



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

STUDIO DELLE CONDIZIONI DI DIGESTIONE DI CAMPIONI
BIOLOGICI PER ANALISI MICRO-RAMAN DI
MICROPLASTICHE

Relatore: Prof. Moreno Meneghetti
Correlatore: Dott. Lucio Litti
Controrelatore: Prof. Marco Roverso

Laureanda: Matilde Castagna
1224353

Anno Accademico: 2021/2022

INDICE

Abstract e scopo della tesi.....	2
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. Che cosa sono le microplastiche	3
1.2. Metodologie	4
1.3. Spettroscopia Raman	6
2. METODI E MATERIALI.....	9
2.1. La scelta di materiali e reagenti	9
2.2. Il protocollo sperimentale	11
2.2.1. Trattamento della carne con la miscela di reazione	11
2.2.2. Trattamento delle microplastiche con la miscela di reazione	13
2.2.3. Trattamento della carne e microplastiche con la miscela di reazione.....	14
2.2.4. La filtrazione	15
2.3. Spettroscopia micro-Raman.....	16
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	17
3.1. Digestione dei campioni di carne e relativa filtrazione	17
3.2. Il trattamento delle microplastiche con la miscela di reazione	18
3.3. Il trattamento della carne e microplastiche con la miscela di reazione.....	29
4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	33
5. RINGRAZIAMENTI.....	34
6. BIBLIOGRAFIA.....	35

Abstract e scopo della tesi

La contaminazione ambientale dovuta a piccoli detriti di plastica, le microplastiche, rappresenta un problema globale a causa del diretto impatto che questi inquinanti hanno nell'ambiente, nonché per i loro potenziali effetti anche sulla salute umana. La diffusione di questi inquinanti può avvenire via terra, via mare e via aerea. La loro ascesa lungo la catena alimentare è quindi praticamente inevitabile. Sono state ritrovate microplastiche in Antartide, all'interno di stomaci di pesci, e negli organi interni dell'uomo, comprese anche nelle placente umane.

Risulta quindi di fondamentale importanza poter disporre di metodologie analitiche e strumentali adatte al rilevamento delle microplastiche all'interno delle varie matrici ove queste possono essere presenti. Quest'ultimo aspetto, ovvero la matrice, pone particolari sfide in ambito di preparativa del campione. Infatti, in caso di campioni particolarmente complessi, come ad esempio i tessuti ed organi di organismi superiori, esistono pochi riferimenti in letteratura che descrivono protocolli di digestione della matrice e, allo stesso tempo, che permettano di mantenere inalterate le microplastiche.

Lo scopo di questa tesi, che ho sviluppato ospite del gruppo *Nanostructures & Optics Laboratory* nel periodo di maggio 2022, è quello di individuare una metodologia che permetta la completa digestione di un campione di carne rossa al cui interno sono disperse microplastiche di varia natura, senza che queste ultime vengano danneggiate. Per la rilevazione e caratterizzazione delle microplastiche verrà utilizzata la spettroscopia micro-Raman.

1. INTRODUZIONE

1.1. Che cosa sono le microplastiche

Le microplastiche rappresentano uno dei problemi ambientali più discussi degli ultimi anni, a causa della ripercussione di quest'ultime sugli ecosistemi marini, terrestri e persino, potenzialmente, sulla salute umana.

L'ampia eterogeneità in composizione, forma e dimensioni, e la difficoltà nel trovare dei criteri di classificazione, ha fatto sì che la definizione di "microplastica" risultasse piuttosto generalista. Secondo l'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (ECHA) possono essere definite microplastiche tutte le particelle di plastica solide, con una forma regolare o irregolare, con un range di dimensione compreso tra 1 µm e 5 mm e composte da miscele di polimeri e additivi funzionali non naturali.¹

La loro classificazione grossolana, sempre secondo ECHA, differenzia con il termine "particelle" il particolato per lo più simmetrico e con dimensioni comprese tra 1 nm e 5 mm, e con "fibre" quello spiccatamente asimmetrico e con lunghezza compresa tra 3 nm e 15 mm.

Data la loro elevata eterogeneità morfologica e dimensionale, possono essere definiti anche altri parametri per classificare le microplastiche, come l'aspect ratio, ovvero il rapporto tra la lunghezza e la larghezza, o il diametro di Feret, ovvero il diametro di un ipotetico cerchio che circoscriva la particella.

Le microplastiche possono classificarsi anche in base alla loro origine: si definiscono primarie quelle che vengono fabbricate come micro-sized ed aggiunte direttamente a prodotti specifici, ad esempio in detersivi e cosmetici, vettori per farmaci, pitture per navi. Mentre vengono classificate come secondarie quelle che si formano accidentalmente quando pezzi di plastica più grandi si usurano, a causa di erosione meccanica, biodegradazione a causa di microrganismi, radiazioni ultraviolette, foto-ossidazione.²

La loro pericolosità è dovuta principalmente a tre fattori:

- I. anzitutto la loro stessa presenza. Ad esempio, è ampiamente riportato come vengano ad accumularsi nello stomaco di pesci ed animali marini influenzandone il senso della fame e portandoli alla morte.
- II. il loro ruolo come vettori per altri agenti, come inquinanti ambientali o additivi plastici
- III. la loro stessa natura chimica, che può scatenare immunoreazioni locali quando assimilate all'interno degli organismi, causando ad esempio la generazione di specie molto reattive, come i ROS (reactive oxygen species).

Riassumendo, la loro tossicità dipende quindi da fattori quali le proprietà fisiche (dimensione, forma e lunghezza), le proprietà chimiche (presenza di additivi e tipo di polimero), ovviamente la loro concentrazione e la presenza e natura del film microbico che le accompagna.

A causa delle loro piccole dimensioni, possono diffondersi non solo via acqua, ma anche per via terrestre e per via atmosferica, la loro ingestione involontaria risulta quindi pressoché inevitabile. Sono state infatti ritrovate in alimenti come il pesce, il sale, l'acqua potabile, entrando di conseguenza nella catena alimentare dell'uomo.³

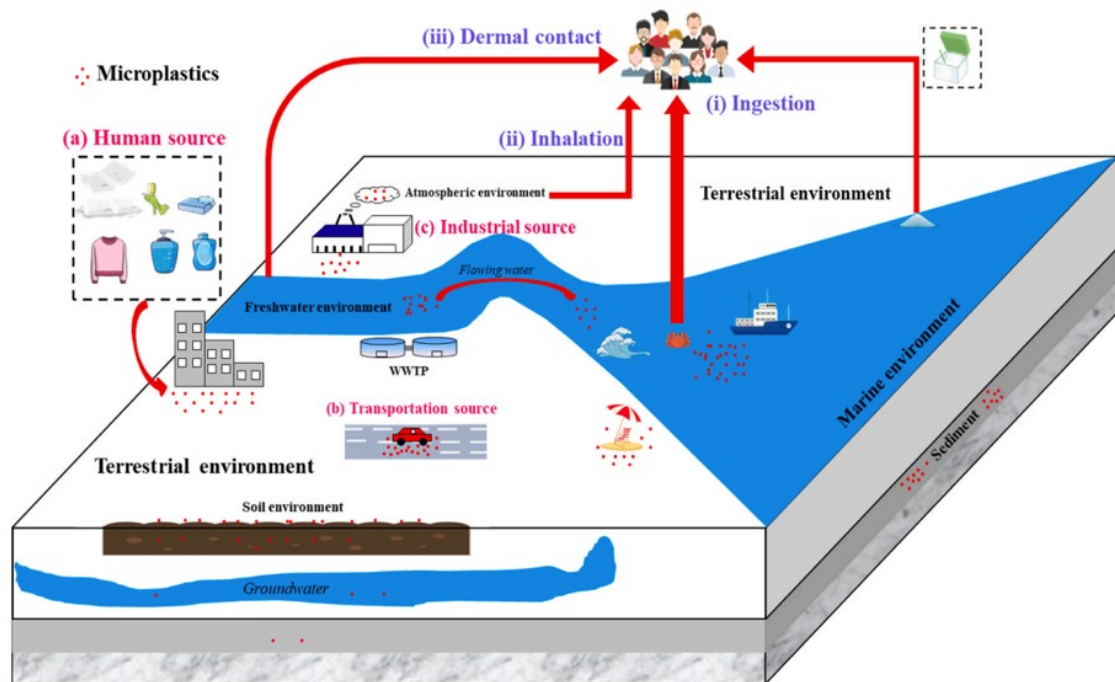


Figura 1.1: la diffusione delle microplastiche (immagine tratta da rif. 3)

Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato l'abilità di alcune nanoparticelle di polistirene di attraversare la barriera placentare, ciò ha portato dunque alla genesi di recenti ricerche volte allo studio della presenza di microplastiche all'interno della placenta umana. Tali studi hanno prodotto esiti positivi per particelle di dimensioni nel range di 5-10 μm , attestandone appunto tale collocazione.¹

Tuttavia, nella letteratura specializzata in questo ambito, anche e soprattutto perché tema molto recente, si riconosce una evidente carenza di studi metodologici su protocolli sperimentali per il trattamento di campioni biologici complessi, volto al rilevamento di microplastiche.

1.2. Metodologie

La raccolta del campione è la prima fase di analisi, che prevede strategie differenti principalmente in base alla matrice in cui si lavora ed alla classe dimensionale d'interesse.²

È importante che per un campionamento efficace si cerchi di evitare qualsiasi contaminazione ambientale, evitando guanti in nylon o acrilico, raccogliendo il campione all'interno di vetreria in pyrex ed utilizzando solo acqua ad alta purezza all'interno di bottiglie di vetro.

Prima che le microplastiche possano essere caratterizzate, visivamente o spettroscopicamente, risulta spesso necessario un pretrattamento, in modo da rimuovere il più possibile le particelle non plastiche od i residui organici. Questo trattamento può essere effettuato con:

- gli *enzimi*, che sono selettivi, ma hanno lo svantaggio di essere molto costosi e di richiedere molto tempo affinché il trattamento risulti efficace;
- *basi* come NaOH o KOH, che possono degradare alcune plastiche (e.g. PET, PA, PVC) e formano molta schiuma a causa della reazione di saponificazione;
- *acidi* concentrati come HNO₃ o HCl, che però possono degradare alcune plastiche (e.g. nylon, PE, PET) o alterare il loro colore o forma (e.g. PVC, PVP);
- *ossidanti* come acqua ossigenata, che viene molto utilizzata, ma che può decolorare i coloranti aggiunti come additivi nelle plastiche.²

Ad esempio, uno studio che valutava l'estrazione di microplastiche dal biota con un approccio di digestione sia acida che basica, ha messo in evidenza come l'utilizzo di una miscela di acido nitrico e acido perclorico portasse ad una completa dissoluzione di poliammidi e poliuretani⁴. Mentre altri polimeri, come il polimetil metacrilato (PMMA) e il polivinil cloruro (PVC), segnalavano una lisciviazione del colore e riduzione della durezza. Testando la digestione di stomaci di pesci in ambiente basico, con una miscela KOH:NaClO, si è invece osservata la completa dissoluzione del tessuto del campione e l'ottima sovrapposizione degli spettri Raman prima e dopo il trattamento chimico.⁴

Nel trattamento di biota o di matrici biologiche complesse, dopo la digestione è necessaria la filtrazione, che permetta quindi l'accumulo delle sole microplastiche nella superficie del filtro. Dal momento che il problema delle microplastiche è stato sollevato solo recentemente, non è ancora stata proposta una tipologia di filtro che risulti ottimale per tutte (o gran parte) delle condizioni: esistono filtri resistenti alle miscele di reazioni, ma che sono IR o Raman attivi, altri che invece risultano ottimi per l'ispezione SEM ma potrebbero inquinare l'analisi di microplastiche.

Le tipologie di filtri preferite nei protocolli per l'analisi delle microplastiche sono a base di:

- *ossido di alluminio*: adatti all'analisi in trasmissione in microFTIR, abbastanza costosi, rigidi e fragili
- *silicio*: la cui forma quadrata li rende difficili da utilizzare nei comuni sistemi da vuoto per filtrazione, sono inoltre molto costosi ed estremamente fragili
- *policarbonato rivestito d'oro*: adatto all'analisi in riflessione con microFTIR, tuttavia la loro superficie altamente riflettente può rendere difficoltoso il riconoscimento di alcune particelle
- *policarbonato track-etched*: resistente a miscele di reazioni molto basiche, che però risulta attivo al Raman.²

Il filtro rappresenta il supporto su cui vengono poi condotte le analisi di caratterizzazione delle microplastiche, per questo è importante che interferisca il meno possibile con la tecnica strumentale prescelta. Nel caso però ci sia interferenza del segnale del filtro e non eventuale contaminazione da parte di quest'ultimo, è possibile eliminare il suo rumore, sottraendo il suo spettro come baseline (procedura comunemente utilizzata in micro-FTIR).

Infine, per analizzare e caratterizzare le microplastiche, si può operare congiuntamente con microscopia e spettroscopia. Lavorando con microscopia ottica si è in grado di classificare e valutare la forma delle microplastiche nel campione, al contrario della loro composizione chimica, la quale, diversamente, viene studiata tramite spettroscopia.

Le tecniche di elezione per la caratterizzazione chimica delle microplastiche sono la spettroscopia IR e Raman.

Si tratta di due tecniche non distruttive e di natura vibrazionale. La prima si basa sull'assorbimento IR, lavorando in trasformata di Fourier permette misure molto veloci, tuttavia è molto sensibile all'acqua, che deve essere quindi rimossa, e la risoluzione spaziale risulta limitata a particelle di circa 10µm.

La tecnica Raman viene invece descritta in modo dedicato nel capitolo seguente.

1.3. Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica vibrazionale basata sullo scattering anelastico della luce, che porta informazioni sulle vibrazioni molecolari di un sistema.⁵ Solitamente viene utilizzata come sorgente una luce monocromatica nel range del visibile, del vicino infrarosso o vicino ultravioletto.

La radiazione elettromagnetica, irraggiando il campione con una frequenza ν_0 , può portare a:

- *diffusione elastica*, dove la frequenza della luce dovuta allo scattering è uguale a quella incidente (ν_0). Si definisce *Rayleigh scattering* ed è la più comune
- *diffusione anelastica*, nel caso in cui la radiazione diffusa abbia energia diversa da quella incidente. In questo caso si parla di *Raman scattering*, è molto meno probabile ed ha una frequenza $\nu_0 \pm \nu_m$, dove ν_m è la frequenza vibrazionale della molecola.

Lo scattering Raman può essere a sua volta suddiviso in:

- *Stokes Raman Scattering*, nel caso in cui $\lambda_{\text{scatter}} > \lambda_{\text{laser}}$, quindi $\nu_0 - \nu_m$, che è più probabile e produce quindi segnali più intensi rispetto allo Scattering Anti-Stokes
- *Anti-Stokes Raman Scattering*, nel caso in cui $\lambda_{\text{scatter}} < \lambda_{\text{laser}}$, quindi $\nu_0 + \nu_m$

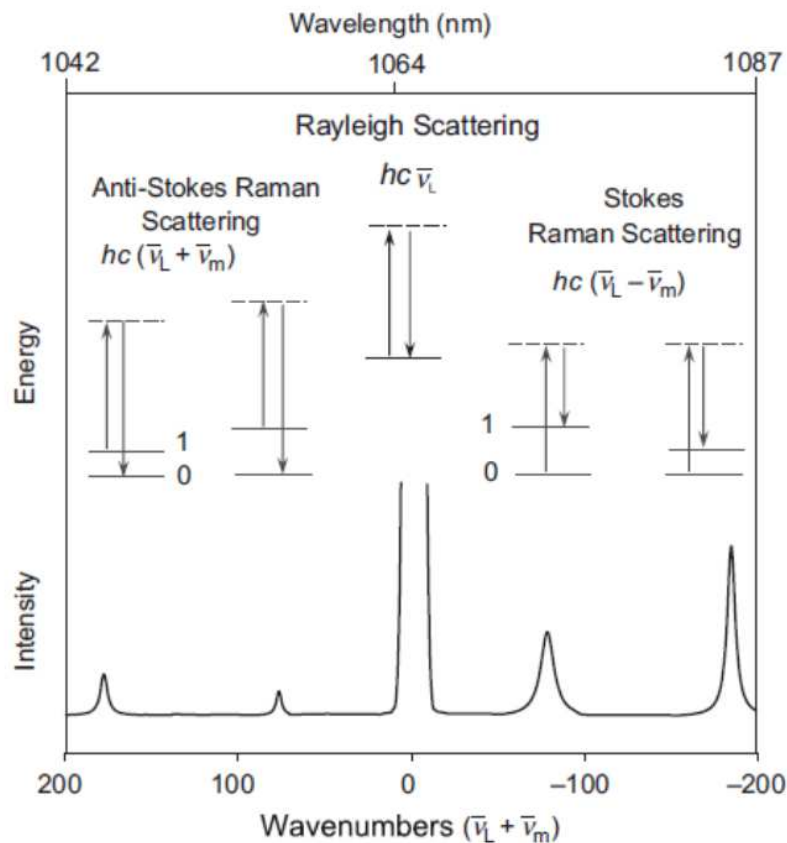


Figura 1.2: rappresentazione schematica dello scattering Rayleigh e Raman (immagine tratta da rif. 6)

In entrambi i casi un fotone incidente di energia $h\nu_0$ porta il sistema da uno stato vibrazionale fondamentale $\nu=0$ ad un livello ad energia maggiore.

Se il sistema rilassa allo stato fondamentale, si tratta di Rayleigh scattering, se invece rilassa ad uno stato vibrazionale eccitato, si formano le righe *Raman Stokes*. Affinché avvenga *Anti-Stokes Raman Scattering*, il sistema deve inizialmente trovarsi ad un livello vibrazionale superiore a $\nu=0$, un fenomeno poco probabile a temperatura ambiente, come afferma la legge di distribuzione di Maxwell-Boltzmann.

Secondo la teoria classica, lo scattering Raman può essere spiegato con il modello seguente. Si definisca l'intensità (in modulo) del campo elettrico (E) dell'onda elettromagnetica come funzione del tempo secondo:

$$E = E_o \cos(\omega_1 t)$$

Equ. 1.1

Dove E_o è l'ampiezza massima e ω_1 la pulsazione dell'onda elettromagnetica. Quest'ultima definita come

$$\omega_1 = 2\pi\nu_1$$

Equ. 1.2

Dove ν_1 è la frequenza del laser usato per l'eccitazione.

Se una molecola diatomica viene irraggiata da questa luce, si induce un momento di dipolo p :

$$p = \alpha \cdot E = \alpha E_o \cos(\omega_1 t)$$

Equ. 1.3

dove α è detta polarizzabilità della molecola, ovvero la proprietà che descrive la capacità della distribuzione elettronica di riarrangiarsi spazialmente a seguito di uno stimolo, come un campo elettrico esterno.

Dal momento che la distribuzione elettronica deriva dalla posizione degli atomi che compongono la molecola, α è funzione di Q_j , definita come la coordinata normale di vibrazione per il modo j -esimo. Nell'equazione 1.4 viene esplicitata Q_j in funzione del tempo, dove si indica ω_k come la frequenza vibrazionale e δ_k il fattore di fase per il modo normale k .

$$Q_j = Q_j^o \cos(\omega_k t + \delta_k)$$

Equ. 1.4

La polarizzabilità, quindi, dipende anche dalla posizione relativa dei nuclei tra di loro. Questa dipendenza può essere descritta come segue, per ciascun modo normale di vibrazione Q_j in funzione del tempo (espansione di Equ 1.5 tagliata al primo termine):

$$\alpha = \alpha_o + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_j} \right)_o Q_j$$

Equ. 1.5

Combinando l'equazione 1.3, 1.4, 1.5, si ricava:

$$\begin{aligned} p &= \alpha E_o \cos(\omega_1 t) = \alpha_o E_o \cos(\omega_1 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_j} \right)_o Q_j E_o \cos(\omega_1 t) \\ &= \alpha_o E_o \cos(\omega_1 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_j} \right)_o Q_j^o E_o \cos(\omega_1 t) \cos(\omega_k t + \delta_k) \end{aligned}$$

Equ. 1.6

Raccogliendo:

$$p = \alpha_o E_o \cos(\omega_1 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_j} \right)_o Q_j^o E_o \cos[\omega_1 t - (\omega_k t + \delta_k)] \\ + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_j} \right)_o Q_j^o E_o \cos[\omega_1 t + (\omega_k t + \delta_k)]$$

Equ. 1.7

dove il primo termine si riferisce allo scattering Rayleigh, il secondo termine Stokes Raman Scattering ed il terzo termine Anti Stokes Raman Scattering.

Da Equ 1.7 deriva la regola di selezione del Raman ovvero, affinché un modo normale di vibrazione Q_j sia Raman-attivo, è necessario che $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_j} \right) \neq 0$.

Questa regola di selezione si differenzia da quella della spettroscopia IR, che invece riguarda la variazione del momento di dipolo.⁶

Confrontandola con la spettroscopia FTIR, la tecnica Raman mostra elevata sensibilità per gruppi funzionali non polari, bassa interferenza dell'acqua e del vetro e bande spettrali strette. Un'importante peculiarità del μ -Raman è la maggior risoluzione quando si lavora con microplastiche molto piccole (<10 μ m), altrimenti impercettibili o comunque non distinguibili usando la tecnica μ -FTIR.

Tuttavia, la tecnica Raman presenta una elevata interferenza dovuta alla fluorescenza del campione (quando presente) poiché, per natura, il segnale è più debole rispetto alla fluorescenza. Quindi, in presenza di analiti o impurità che siano in grado di essere fluorescenti, non sarà più visibile il loro segnale Raman. Inoltre, a causa dell'utilizzo del laser come sorgente, può esserci danneggiamento del campione e di conseguenza anche indurre a cambiamenti all'interno dello spettro Raman.⁵

2. METODI E MATERIALI

2.1. La scelta di materiali e reagenti

Il campione utilizzato, macinato di carne di muscolo di bovino, è stato scelto in quanto miglior compromesso tra semplicità di approvvigionamento e somiglianza con la placenta umana.

Le microplastiche studiate sono state scelte da una selezione di quelle più diffuse in ambiente, considerando i polimeri di cui sono costituiti gli oggetti più comuni. In particolare, in questa tesi ho utilizzato campioni di:

- **PET (polietilene tereftalato)**

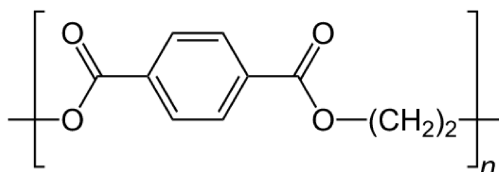


Figura 2.1: struttura chimica del PET

- **PTFE (politetrafluoroetilene)**

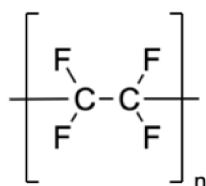


Figura 2.2: struttura chimica del PTFE

- **PA6 (poliammide 6)**

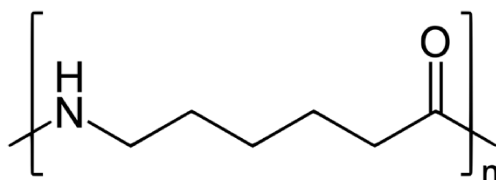


Figura 2.3: struttura chimica della PA6

- **PA12 (poliammide 12)**

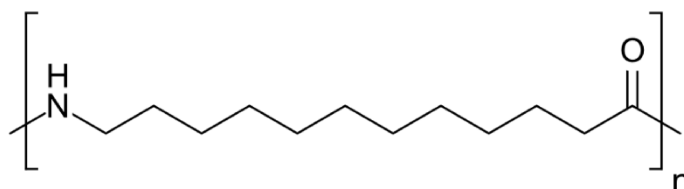


Figura 2.4: struttura chimica della PA12

- **LDPE (polietilene a bassa densità)**

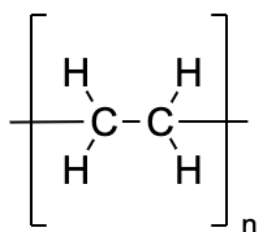


Figura 2.5: struttura chimica del LDPE

Le caratteristiche, dichiarate dal produttore, delle microplastiche testate sono:

Polimero	Dimensione massima delle particelle (µm)	Condizione	Cristallinità
PET	300	Copolimero semicristallino	>40%

Tabella 2.1: le caratteristiche del PET

Polimero	Dimensione media delle particelle (µm)	Condizione
PTFE	20	polvere

Tabella 2.2: le caratteristiche del PTFE

Polimero	Dimensione media delle particelle (µm)	Densità (g/cm ³)	Dimensione delle particelle D10 (µm)
PA6	55	0.525	15-35

Tabella 2.3: le caratteristiche del PA6

Polimero	Dimensione massima delle particelle (µm)	Dimensione delle particelle D50 (m)
PA12	250	90

Tabella 2.4: le caratteristiche del PA12

Polimero	Dimensione massima delle particelle (µm)
LDPE	300

Tabella 2.5: le caratteristiche del LDPE

Per la digestione del campione di carne di bovino si utilizzano i seguenti reagenti:

- KOH, 1120 g/L, in pastiglia, Prolabo
- NaClO, 6-14% cloro attivo, soluzione, Sigma Aldrich
- Acqua Milli-Q in contenitore di vetro

In seguito si farà riferimento a “miscela di reazione” come ad una soluzione 1:1 in volume KOH:NaClO, preparata sciogliendo il KOH in acqua milli-Q, poi aggiunto in NaClO fino a raggiungere la proporzione molare e i volumi voluti.

Per esempio:

massa KOH(g)	volume acqua aggiunto (mL)	volume NaClO (mL)
6.2602 g	5.60	5.60

Tabella 2.6: preparazione della miscela di reazione per il campione

2.2. Il protocollo sperimentale

Nei paragrafi che seguono si presentano le procedure sperimentali che sono state adottate per individuare il miglior protocollo di digestione del campione, che al contempo non deteriorasse le microplastiche in esame. Viene quindi testato dapprima il protocollo su sola carne, poi su sole microplastiche ed infine in una miscela delle due.

Viene assunta una quantità di contaminazione virtuale di microplastiche di 0.25 mg per 1 g di carne.

2.2.1. Trattamento della carne con la miscela di reazione

La miscela di reazione è stata anzitutto testata sul solo campione di carne di bovino (20.2220 g), per osservarne l'efficacia digerente.

In un primo tentativo, il macinato, posto in una vial, viene addizionato con 5 mL di miscela di reazione, preparata come in tabella 2.6, senza alcun altro tipo di trattamento. Il contenitore viene chiuso da un tappo con ago per sfiatare e lasciata agitare con lo strumento in figure 2.6.

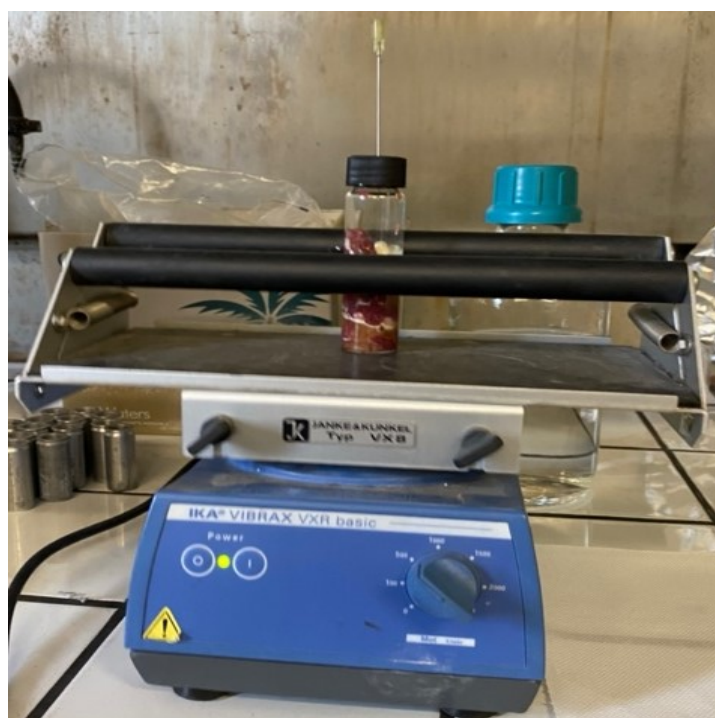


Figura 2.6: agitatore

Dopo circa 24 ore si osserva che la dissoluzione dei tessuti è ancora troppo limitata. L'esperimento viene quindi terminato e ripetuto aggiungendo un ulteriore step di pretrattamento della carne, ovvero la liofilizzazione. Si ritiene infatti che il campione di carne

tal quale risultasse eccessivamente ricco d'acqua, che diluiva la miscela, andando a rallentare tutta la procedura di digestione.

È stato quindi preparato un altro campione di carne, definito campione "bianco", dal peso di 20.0582 g, che è stato inizialmente liofilizzato per ventiquattro ore (come rappresentato in figura 2.7), in modo da eliminare l'acqua dai tessuti.



Figura 2.7: la liofilizzazione del campione "bianco"

Successivamente, dopo aver aggiunto 10 mL della miscela di reazione, si lascia in sonicatore per circa sei ore.

La miscela viene così preparata:

massa KOH (g)	volume acqua aggiunto (mL)	Volume NaClO (mL)
22.4320	20.03	20.03

Tabella 2.7: preparazione della miscela di reazione per il campione

La digestione così effettuata vede una completa dissoluzione dei tessuti, suggerendo che il protocollo individuato, ovvero campione liofilizzato e digerito in bagno sonicatore, possa ben servire allo scopo prefisso.



Figura 2.8: impostazione del sonicatore



Figura 2.9: il campione dopo la digestione

2.2.2. Trattamento delle microplastiche con la miscela di reazione

Lo studio della miscela di reazione a contatto con le microplastiche risulta necessario per verificare che il metodo non sia troppo aggressivo per le plastiche stesse. Per questo motivo si preparano cinque campioni con i polimeri citati nel capitolo 2.1, ed un campione, definito “bianco”, dove non vengono inserite plastiche, ma che viene utilizzato per controllare che non ci siano inquinamenti di plastiche nella miscela o dall'esterno.

Le aliquote vengono preparate come riportato di seguito:

numero campione	campione	massa pesata (g)
1	PTFE	0.0053
2	PET	0.0046
3	LDPE	0.0047
4	PA12	0.0046
5	PA6	0.0052
6	bianco	-

Tabella 2.8: campioni di microplastiche

A questi, vengono aggiunti 5 mL della miscela di reazione, preparata come riportato nella Tabella 2.7.

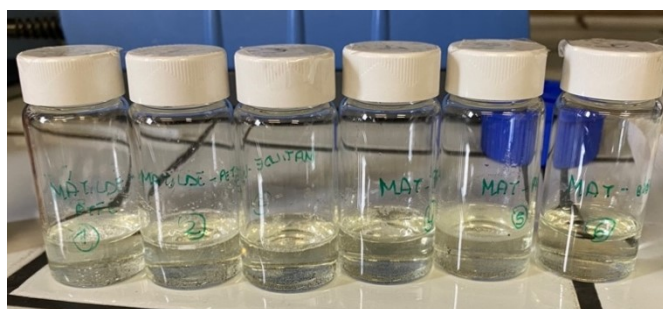


Figura 2.10: i sei campioni con la miscela di reazione

Vengono lasciate sonicare come il campione di bovino citato nel capitolo 2.2.1 e successivamente filtrate.



Figura 2.13: i sei campioni durante la sonicazione



Figura 2.12: il campione 6, PA6, dopo la sonicazione



Figura 2.11: il campione 2, PET, dopo la sonicazione

2.2.3. Trattamento della carne e microplastiche con la miscela di reazione

Infine, viene testata la miscela di reazione con il campione di bovino e microplastiche. I tre campioni analizzati sono il bianco (citato nel capitolo 2.2.1), PA12 e LDPE e vengono preparati nel modo seguente:

campione	massa carne (g)	massa microplastiche (g)
bianco	20.0582	-
PA12	20.5155	0.0056
LDPE	20.6941	0.0052

Tabella 2.9: i campioni di carne e microplastiche

Inizialmente i campioni sono stati liofilizzati per ventiquattro ore.

Si prepara la miscela di digestione nel seguente modo:

massa KOH(g)	volume acqua aggiunto (mL)	Volume NaClO (mL)
11.28	10.07	10.07

Tabella 2.10: preparazione della miscela di reazione per il campione

Si aggiunge ad ogni vial con il campione di carne e microplastiche liofilizzato un'aliquota di 10 mL del reagente. Il volume di miscela di reazione deve essere sufficiente a ricoprire quasi interamente il campione, come in figura 2.14, che era stato precedentemente sminuzzato in modo tale da massimizzare l'area di contatto tra la soluzione ed il campione.



Figura 2.14: il campione di PA12 con la miscela di reazione

Dopo aver lasciato sonicare i campioni per sei ore, si procede con la filtrazione.



Figura 2.15: il campione di carne e LDPE dopo la sonicazione



Figura 2.16: il campione di carne e PA12 dopo la sonicazione

2.2.4. La filtrazione

Dopo aver completato la digestione, si procede con la filtrazione. Come descritto nel capitolo 1.2, esistono pochi filtri con le caratteristiche adatte.

Sono stati provati inizialmente dei filtri a base di alluminosilicati, i quali però, testati con il campione “bianco” delle microplastiche, si sono completamente dissolti.

Sia l'ossido di silicio che quello di alluminio reagiscono in ambiente basico per dare rispettivamente metasilicati e tetraidrossialuminato, a causa di questo il filtro si dissolve a contatto con la miscela di reazione.

È stato perciò testato un altro filtro a membrana, a base di policarbonato track-etched, con un diametro di 12 mm e pori da $0.2\mu\text{m}$ (SPI supplies). Questo resiste bene alla miscela di reazione, nonostante sia risultato Raman attivo. Perciò, al momento della misura Raman è stato necessario trasferire tutto ciò che è stato filtrato su un vetrino, in modo tale da permettere l'analisi micro-Raman senza interferenze. Questa procedura rappresenta un evidente fonte di errore qualora lo scopo dell'analisi fosse una stima quantitativa delle microplastiche, caso che non riguarda il presente studio, dove lo scopo è puramente qualitativo.

L'utilizzo di filtri a base di policarbonato potrebbe rilasciare microplastiche, modificando i dati raccolti. I campioni denominati “bianco” avevano appunto lo scopo di verificare questa ipotesi e si può quindi asserire che, in questo studio, non sono stati registrati inquinamenti da parte del filtro.

La filtrazione è avvenuta tramite l'utilizzo di una beuta con gooch e con pompa a vuoto.

2.3. Spettroscopia micro-Raman

Al fine di stimare in maniera più accurata i piccoli cambiamenti della selezione di microplastiche, le misure sono state effettuate con spettroscopia micro-Raman dopo il trattamento digestivo e la filtrazione.

Le microplastiche rilevate, poste in un vetrino a causa dei problemi legati al filtro, come riportato nel capitolo 2.2.4, sono state inizialmente caratterizzate morfologicamente con un microscopio ottico Leica con obiettivo 10x e 20x, accoppiato ad uno spettrometro Raman Renishaw, utilizzando una sorgente di luce laser 633nm, con potenza 6mW ed un detector CCD. Per le misure viene scelto un range spettrale 150-3500 cm^{-1} . Il Raman era calibrato con uno standard interno di Si. Lo spettro Raman così ricavato è stato sottoposto ad una correzione della baseline e smooth del segnale, per ridurre il rumore ed aumentare la qualità dello spettro. Gli spettri Raman ricavati nelle varie misure sono stati confrontati con gli spettri ottenuti dalle microplastiche non trattate.

Gli spettri Raman sono stati ottenuti attraverso una mappa della zona da esaminare, ricavata andando a selezione diverse particelle dalla superficie del vetrino.

Per esaminare e confrontare i dati è stato utilizzato il programma MatLab, che ha permesso di confrontare e studiare sia lo spettro che le caratteristiche morfologiche da valutare, quali circolarità e diametro di Feret prima e dopo il trattamento.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Digestione dei campioni di carne e relativa filtrazione

La miscela di reazione, come citato nel capitolo 2.1, è una soluzione basica di KOH:NaClO (1:1), che risulta efficiente per la digestione del campione di carne (capitolo 2.2.1). Tuttavia, l'utilizzo della sola miscela di reazione non è sufficiente ed è stato necessario un pretrattamento del campione. Questo, infatti, è stato liofilizzato per ventiquattro ore e poi lasciato sonicare per sei ore nella miscela di reazione.

Anche lo stadio seguente, ovvero la filtrazione, ha richiesto delle ottimizzazioni. Come prima scelta era stato testato un filtro a base di alluminosilicati, considerato ormai uno standard per la raccolta delle microplastiche in campioni ambientali. Purtroppo, però quest'ultimo, una volta a contatto con la miscela, si è dissolto completamente. Si è quindi preferito un filtro a base di policarbonato track-etched.

Durante la filtrazione sono state riscontrate alcune ulteriori difficoltà, in particolare:

- Formazione di cristalli, probabilmente KOH. Si è riscontrato che se si lascia passare troppo tempo (circa sei giorni) tra la sonicazione e la filtrazione della miscela, si verifica la precipitazione di cristalli bianchi ed aghiformi (attribuiti a KOH). All'aggiunta di acqua Milli-Q questi si sciolgono nuovamente ed è possibile procedere alla filtrazione,
- Lo stesso problema del punto precedente può capitare sul filtro, cosa che ha inficiato la bontà delle analisi per il campione di PET.
- Intasamento del filtro. Sebbene del tutto disgregata, a seguito del trattamento la matrice di carne presenta ancora del particolato che tende ad intasare il filtro. Durante la filtrazione della carne con microplastiche si è quindi manifestata la necessità di utilizzare più di un filtro per campione, dato che si intasavano molto velocemente.



Figura 3.1: l'intasamento del filtro

- La carne digerita tende a flocculare. In alcuni campioni si è notata una veloce flocculazione del liquido da filtrare, tanto da rendere necessaria una sonicazione costante del campione, fino a pochi istanti prima della filtrazione.

3.2. Il trattamento delle microplastiche con la miscela di reazione

La miscela di reazione viene inizialmente testata con le microplastiche, come riportato al capitolo 2.2.2. L'analisi dei campioni così ottenuti, dopo la filtrazione, segue il procedimento riportato al capitolo 2.3.

A beneficio di un corretto confronto, viene acquisito lo stesso tipo di caratterizzazione anche su aliquote dei cinque tipi di microplastiche non trattate secondo il protocollo di digestione. Queste misure comprendono la registrazione di immagini al microscopio ottico per determinare dimensione e parametri morfologici medi, oltre che ad analisi μ -Raman. Per ogni campione sono state analizzate un numero variabile tra poche decine a circa un centinaio di particelle. Gli spettri Raman riportati nelle figure seguenti, per tutti i tipi di microplastiche prima e dopo il trattamento, riportano anche le relative deviazioni standard, ad evidenziare quanto lo spettro media sia soggetto o meno a fluttuazioni e, in caso, per quali segnali.

Si procede quindi all'analisi degli spettri Raman delle microplastiche trattate con la miscela di reazione, dove si evidenziano alcuni aspetti importanti.

Il campione di PET, il primo ad essere filtrato, ha evidenziato qualche problema sia nella filtrazione (come citato in precedenza) che nello spettro.

Come si nota in figura 3.2, i due spettri non si sovrappongono perfettamente, presentando alcune differenze.

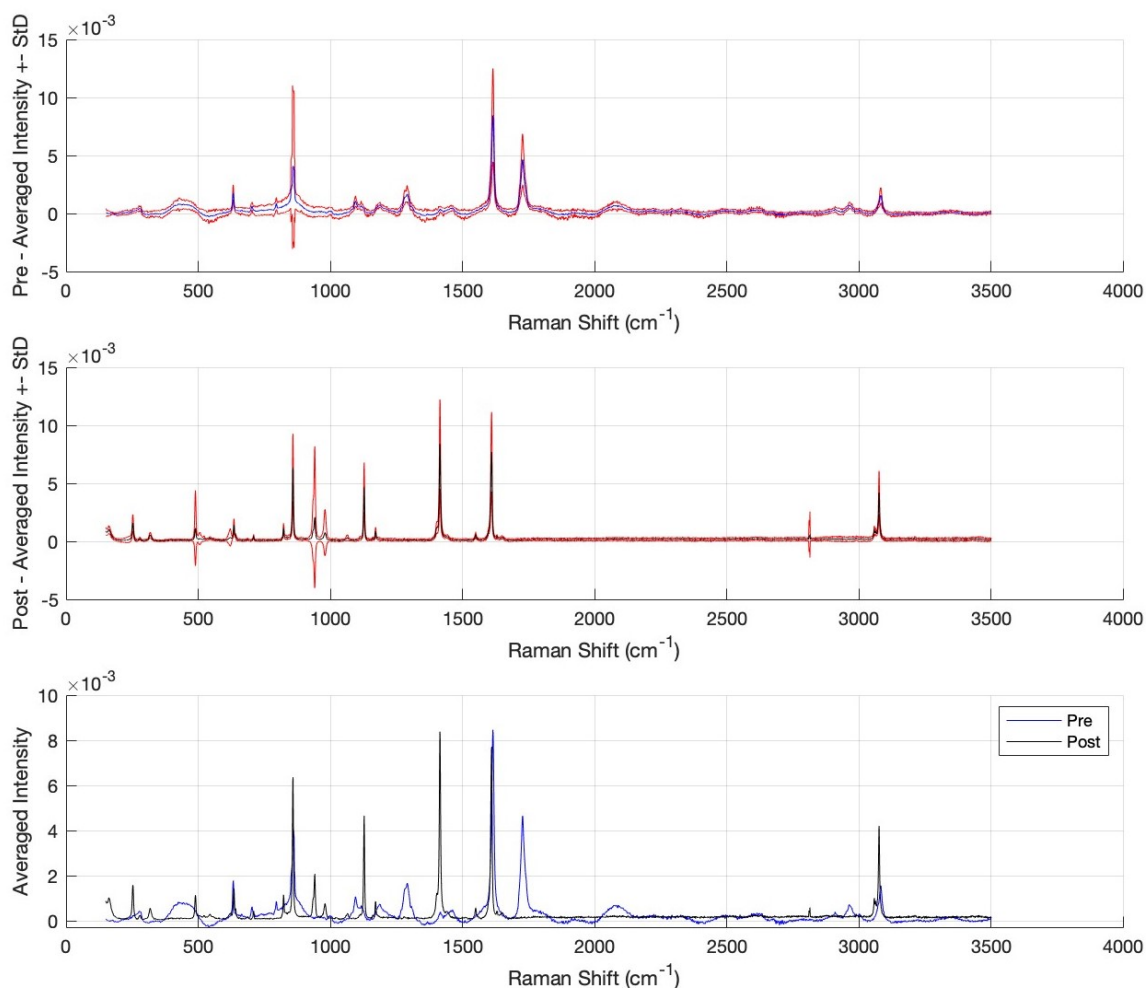


Figura 3.2: in alto lo spettro Raman delle microplastiche prima del trattamento (con deviazione standard), al centro lo spettro Raman dopo il trattamento (con deviazione standard), in basso i due spettri Raman sovrapposti

Ad esempio, il picco a circa 1730 cm^{-1} , tipico dello stretching del legame C=O dell'estere, scompare nel campione digerito. Lo stesso si può dire per il picco a 1280 cm^{-1} , tipico dello stretching del legame C-O degli esteri, non più presente nello spettro del PET trattato con la miscela di reazione.

In uno studio di Enders et al.⁴, trattando campioni di PET con una miscela di KOH saturo, veniva evidenziato un segnale aumentato a 3080 cm^{-1} e a 861 cm^{-1} e nuovi picchi a 1418 cm^{-1} e a 1132 cm^{-1} . Le stesse evidenze sono presenti in Figura 3.2. Tuttavia con una miscela KOH:NaClO (1:1) diluita al 30%, questi effetti sullo spettro non venivano più segnalati.

Da queste evidenze si può ritenere che il trattamento abbia modificato la struttura chimica del PET, od in alternativa ciò dipenda da un eventuale inquinamento del filtro.

Per verificare la prima ipotesi, e scartare la seconda, si può sovrapporre lo spettro del filtro con quello del campione dopo il trattamento, vedi figura 3.3:

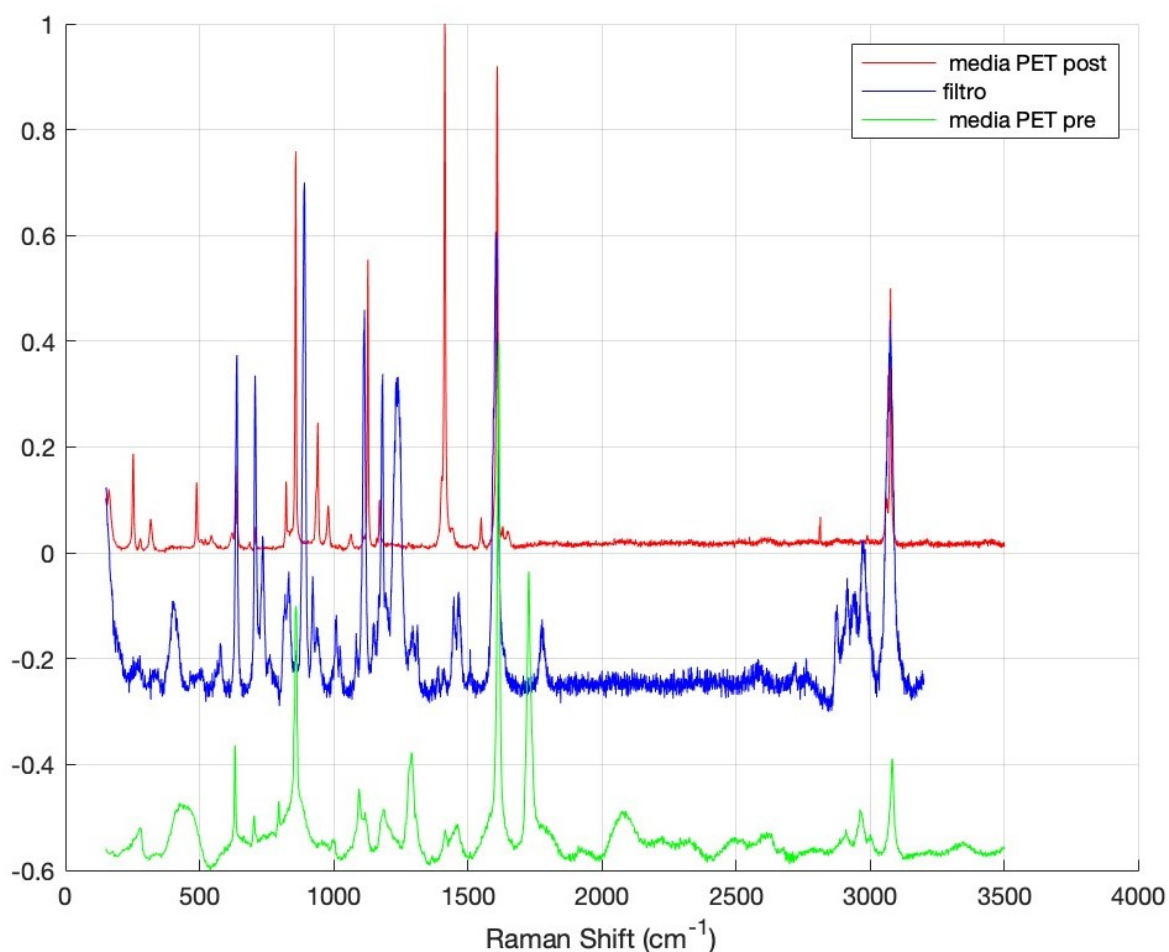


Figura 3.3: in alto lo spettro Raman del PET dopo il trattamento, al centro lo spettro Raman del filtro, in basso lo spettro del PET prima del trattamento

Come si può notare esiste una somiglianza tra lo spettro del PET (sia prima che dopo il trattamento) e quello del filtro, dovuto al fatto che PET e policarbonato hanno entrambi gruppi esterei. Tuttavia, una delle bande più caratterizzanti, a 1730 cm^{-1} , non è presente nel filtro. Si conclude quindi che con ogni probabilità si è verificata una modificazione strutturale del campione, come una reazione di idrolisi basica dell'estere, dal momento che si osserva la totale scomparsa dei segnali tipici del gruppo estereo e l'aumento di altri segnali come quello a 3080 cm^{-1} che potrebbe indicare la presenza di un alcol.

Dall'analisi morfologica delle particelle di PET si nota come queste siano più tondeggianti rispetto a quelle prima del trattamento, alcune hanno mantenuto le stesse dimensioni iniziali, mentre altre probabilmente hanno subito fenomeni di aggregazione.

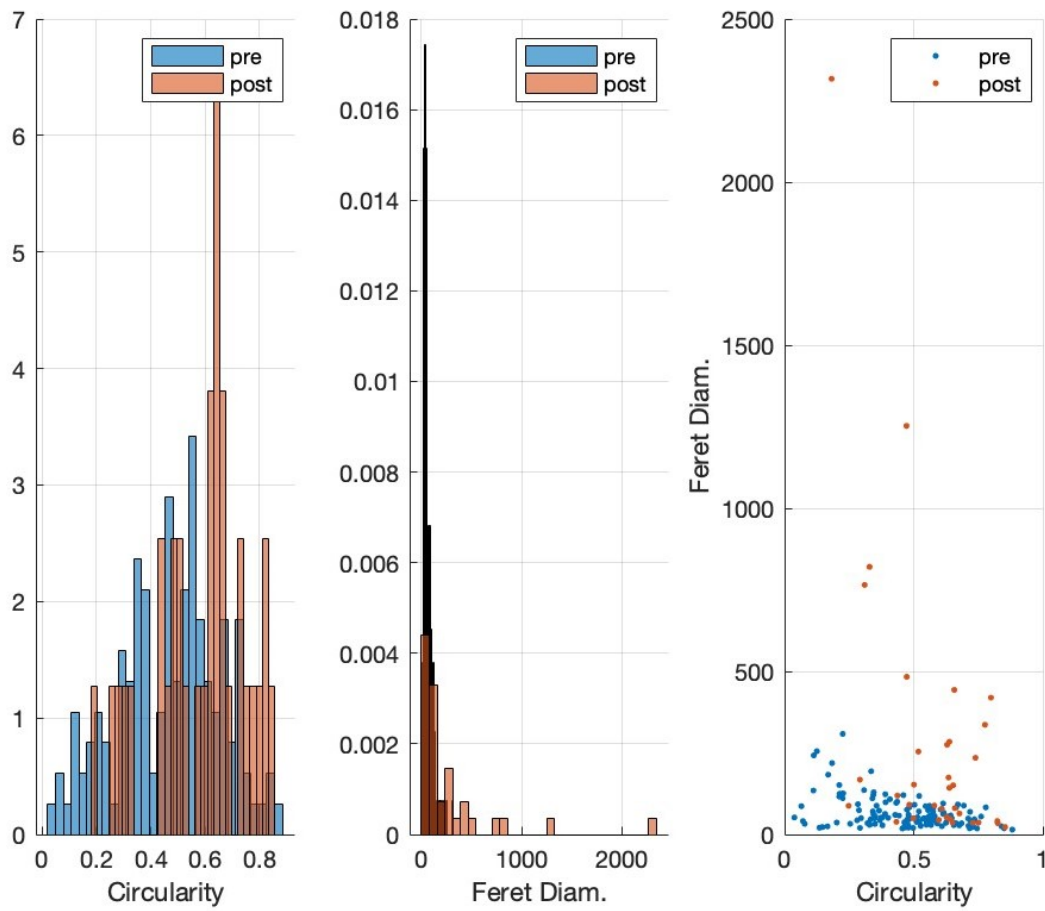


Figura 3.4: a sinistra il confronto della circolarità pre (prima del trattamento) e post (dopo il trattamento), al centro il confronto con il diametro di Feret, a destra il confronto tra circolarità e diametro di Feret del PET

Tutti gli altri campioni non hanno invece registrato nessuna variazione apprezzabile rispetto ai corrispettivi campioni pre-trattamento. Lo spettro di confronto del PTFE (vedi figura 3.5) combacia perfettamente con quello prima del trattamento.

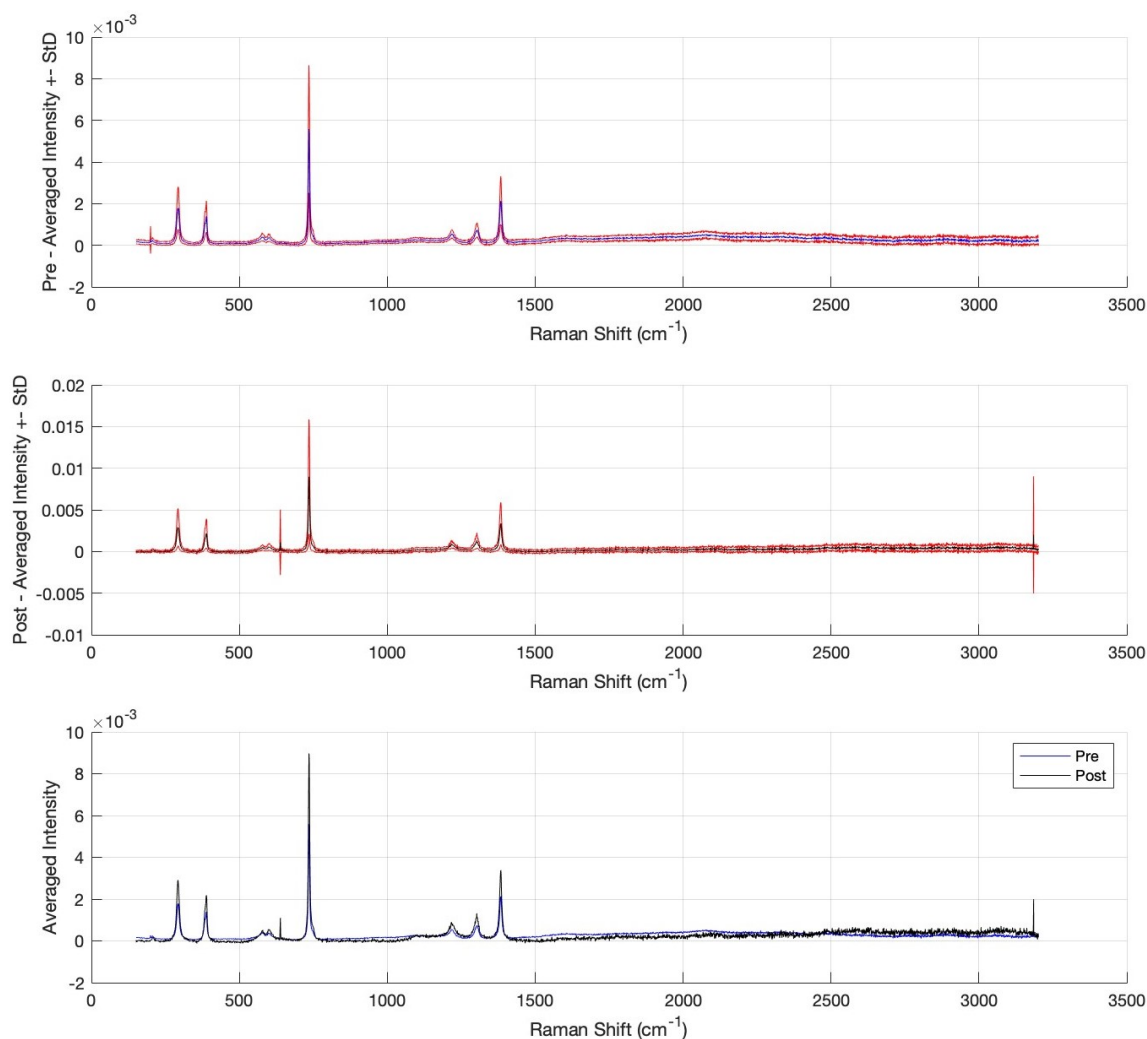


Figura 3.5: in alto lo spettro del PTFE prima del trattamento (con deviazione standard), al centro dopo il trattamento (con deviazione standard) e in basso lo spettro di confronto

I primi due picchi in figura 3.15 rappresentano la vibrazione torsionale del legame CF_2 a 292 cm^{-1} e 385 cm^{-1} , il terzo e il quarto lo stretching simmetrico e asimmetrico del legame CF_2 , rispettivamente a 734 cm^{-1} a 1218 cm^{-1} . Infine, gli ultimi due segnali medio-bassi corrispondono allo stretching del segnale C-C a 1302 cm^{-1} e 1382 cm^{-1} , coincidendo con i valori specificati in letteratura⁷.

Acquisendo la mappa del PTFE ed elaborando le dimensioni con MatLab, si nota un effettivo aumento della circolarità e del diametro di Feret (vedi figura 3.7), che evidenzerebbe un fenomeno di aggregazione delle particelle verso una forma più sferica.

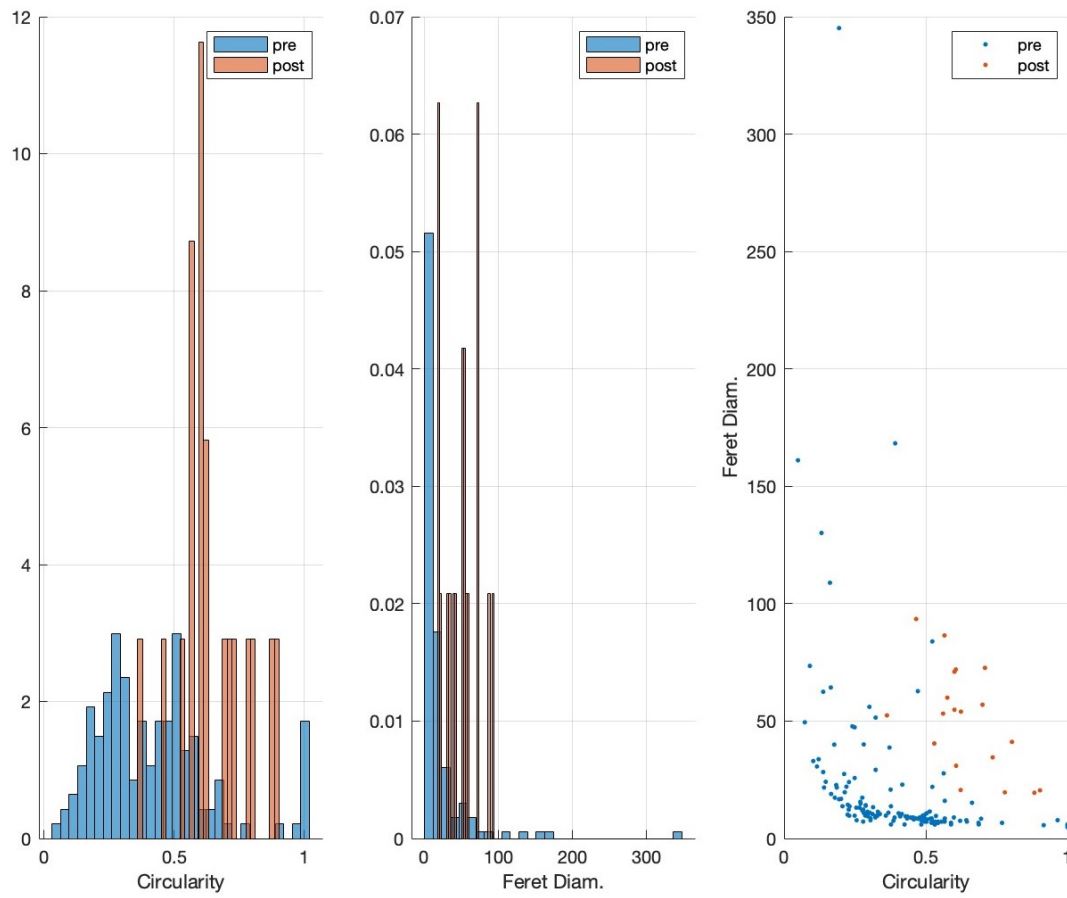


Figura 3.6: a sinistra il confronto della circolarità pre (prima del trattamento) e post (dopo il trattamento), al centro il confronto con il diametro di Feret, a destra il confronto tra circolarità e diametro di Feret del PTFE

Lo spettro di confronto del LDPE (vedi figura 3.6) combacia perfettamente con quello prima del trattamento.

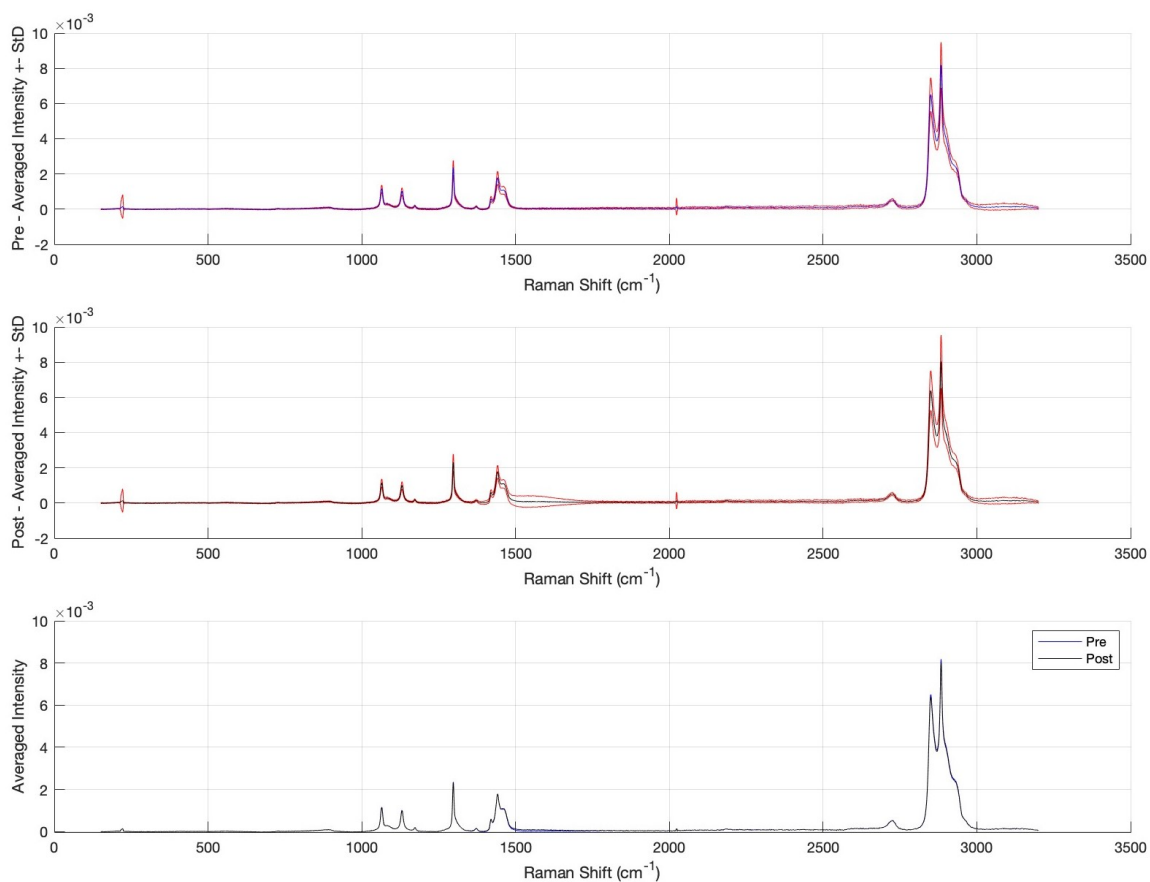


Figura 3.7: in alto lo spettro del LDPE prima del trattamento (con deviazione standard), al centro dopo il trattamento (con deviazione standard) e in basso lo spettro di confronto

I picchi dello spettro del LDPE corrispondono con quelli trovati in letteratura⁸, in particolare si notano:

- a 1100 cm^{-1} il segnale debole di twisting del CH_2
- a 1375 cm^{-1} un segnale medio, tipico del bending simmetrico del CH_3
- un segnale medio a 1463 cm^{-1} , tipico del bending del CH_2
- diversi segnali molto forti tra 2850 cm^{-1} e 2924 cm^{-1} dovuti a stretching simmetrico e asimmetrico del C-H

Per quanto riguarda le dimensioni del LDPE si nota come queste siano polidisperse per la circolarità, mentre il diametro di Feret risulta maggiore rispetto a quello delle microplastiche prima del trattamento, come mostrato in figura 3.8. Anche in questo caso si ritiene probabile la formazione di aggregati.

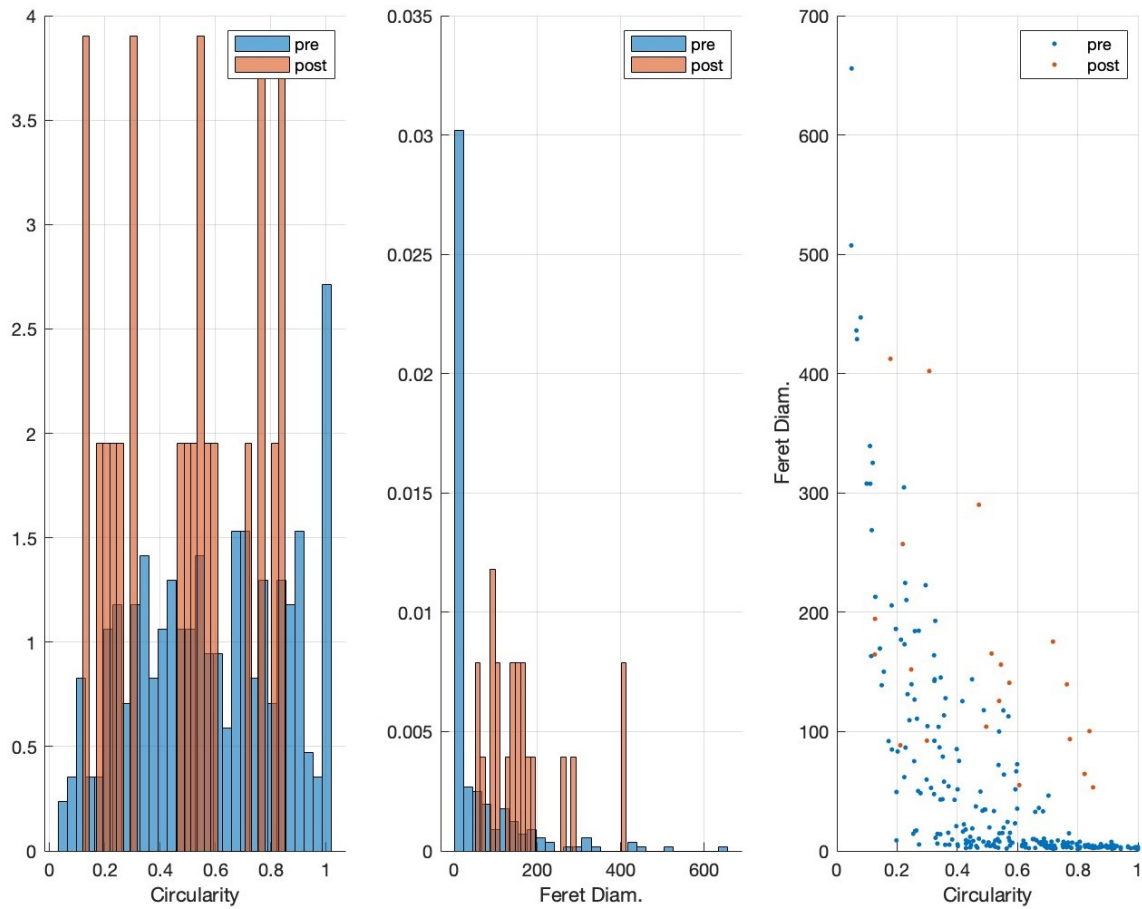


Figura 3.8: a sinistra il confronto della circolarità pre (prima del trattamento) e post (dopo il trattamento), al centro il confronto con il diametro di Feret, a destra il confronto tra circolarità e diametro di Feret del LDPE

Gli spettri Raman di PA6 e PA12 si sovrappongono perfettamente a quelli delle microplastiche prima del trattamento, escludendo un cambiamento della struttura chimica (vedi rispettivamente figura 3.9 e 3.10).

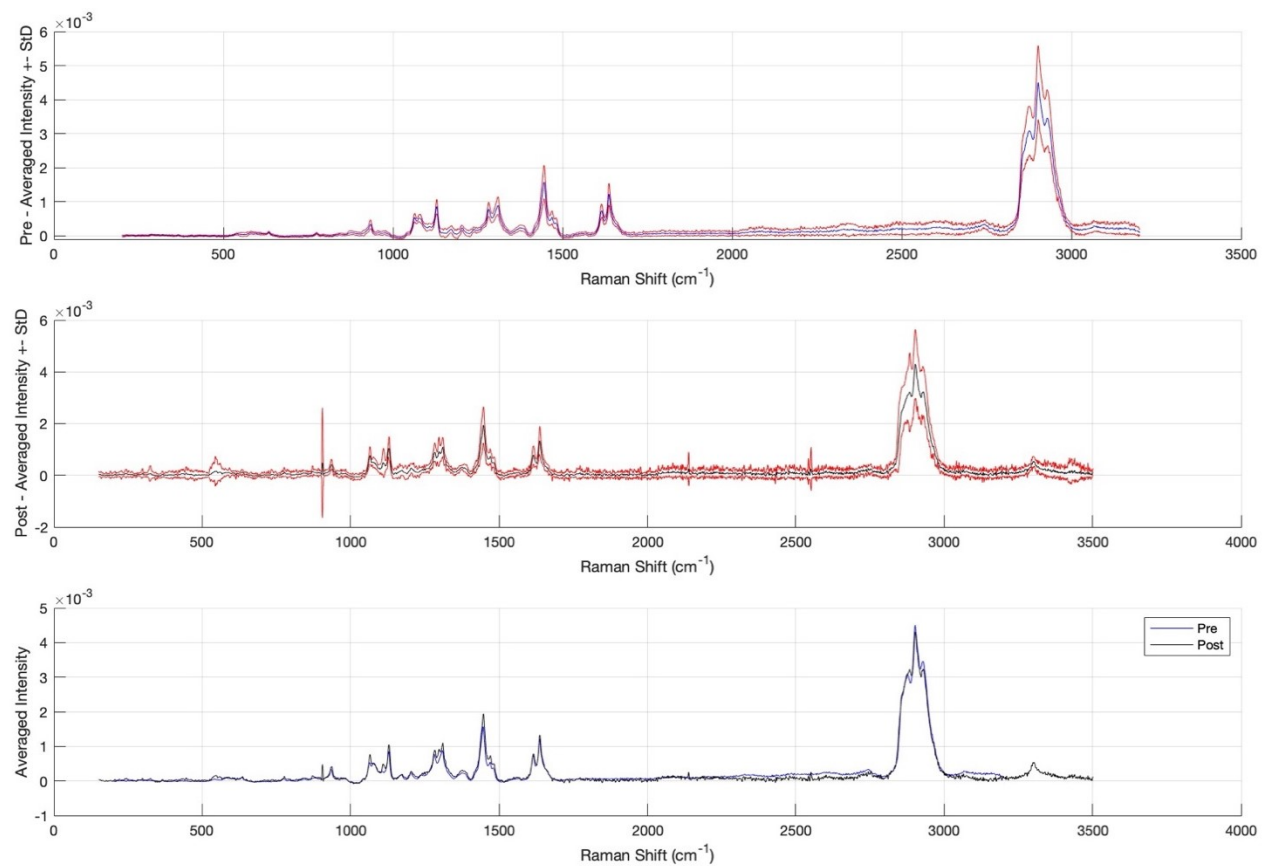


Figura 3.9: in alto lo spettro della PA6 prima del trattamento (con deviazione standard), al centro dopo il trattamento (con deviazione standard) e in basso lo spettro di confronto

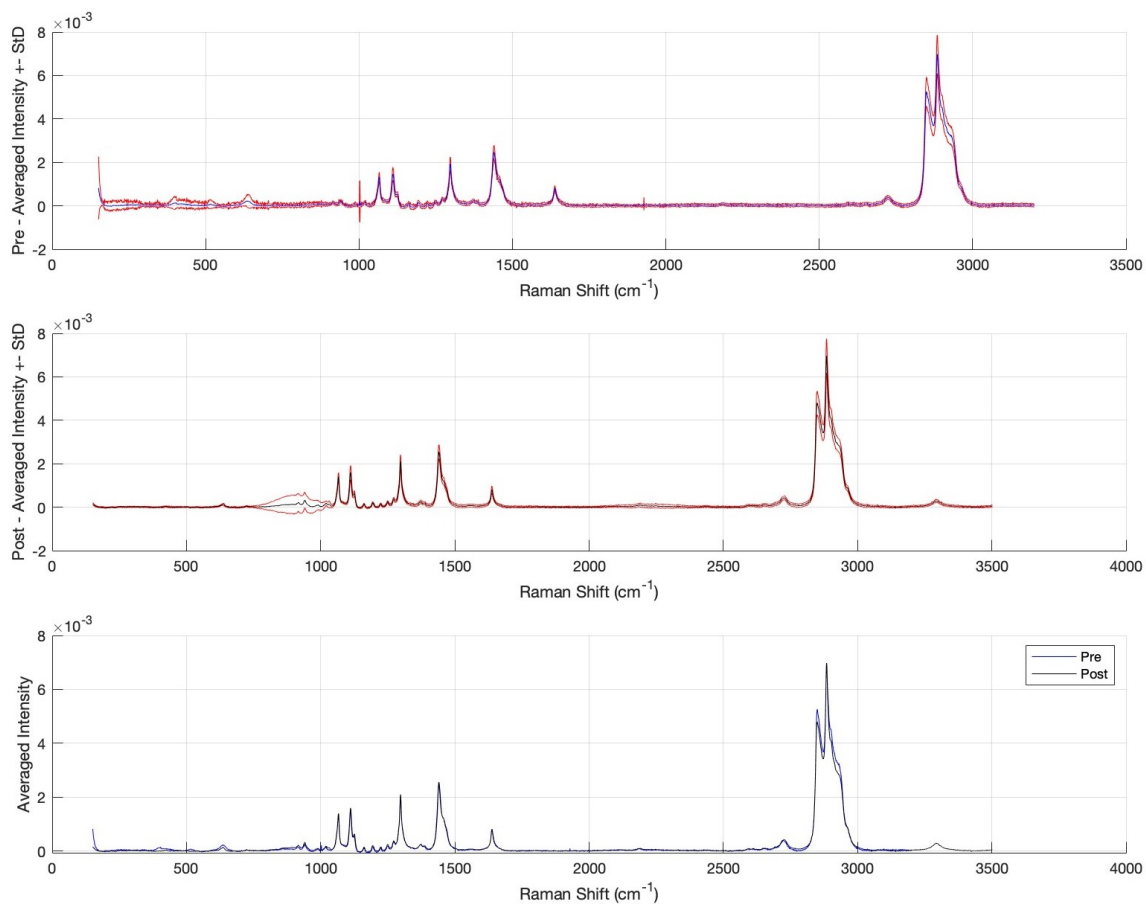


Figura 3.10: in alto lo spettro della PA12 prima del trattamento (con deviazione standard), al centro dopo il trattamento (con deviazione standard) e in basso lo spettro di confronto

Dal confronto con i dati trovati in letteratura⁹, lo spettro Raman di entrambe le poliammidi evidenzia:

- a 1066 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} lo stretching del legame C-C
- il segnale di twisting di CH_2 a 1308 cm^{-1}
- a 1465 cm^{-1} , con un'intensità media, il segnale di stretching del legame C-N
- il picco a 1650 cm^{-1} , tipico del legame C=O delle ammidi
- il segnale di stretching a $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ del legame C-H
- un debole segnale a 3200 cm^{-1} , tipico del legame N-H

Tuttavia, le dimensioni della PA6, in figura 3.11, mostrano valori di circolarità molto più prossimi al valore uno rispetto alle particelle di partenza. Al contempo il diametro di Feret rimane pressoché inalterato. Se ne deduce che la miscela di reazione potrebbe aver eroso o comunque spinto la superficie delle particelle a venire rimodellata in strutture più sferoidali.

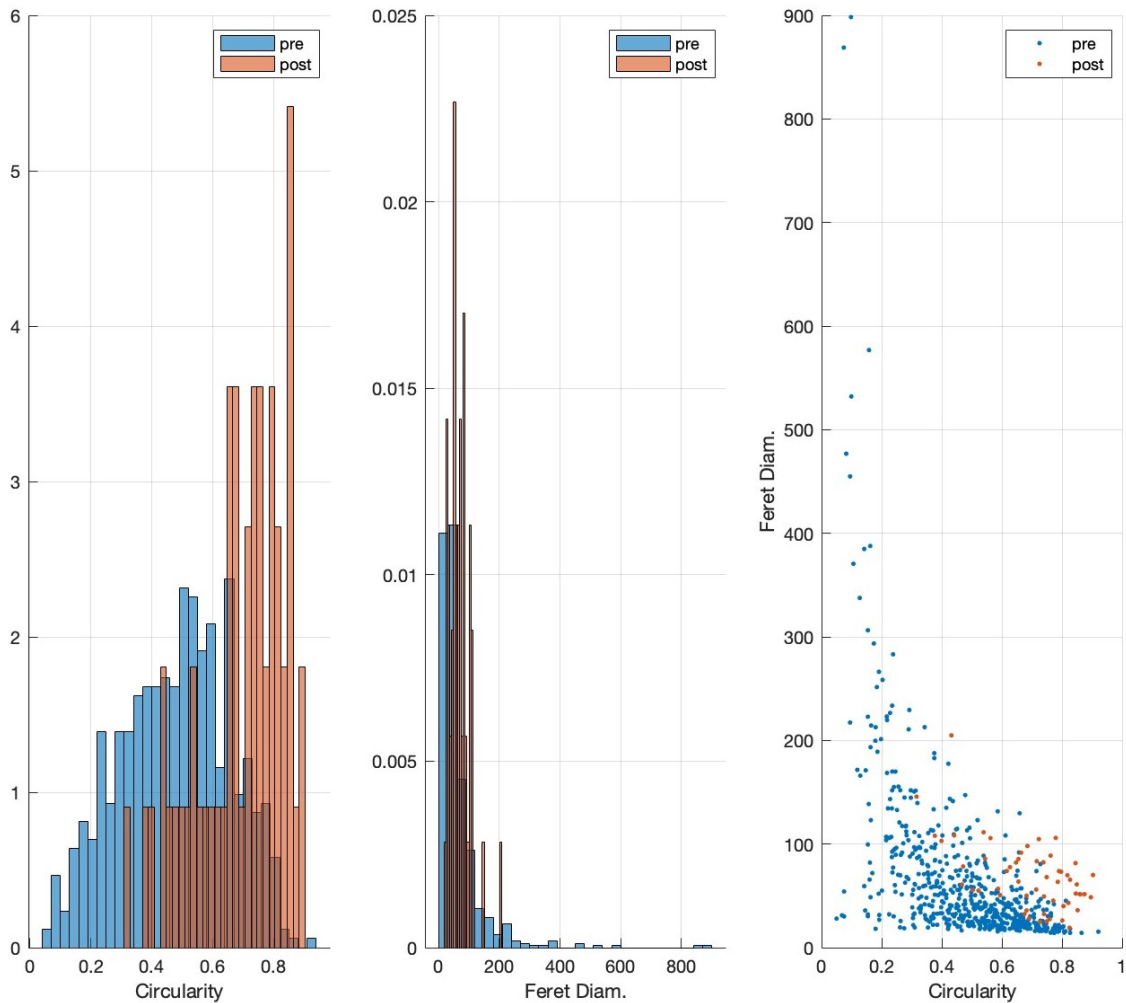


Figura 3.11: a sinistra il confronto della circolarità pre (prima del trattamento) e post (dopo il trattamento), al centro il confronto con il diametro di Feret, a destra il confronto tra circolarità e diametro di Feret della PA6

L'analisi morfologica del campione PA12 (vedi figura 3.12), mostra due popolazioni di particelle per le particelle pre-trattamento (meglio apprezzabile nel plot di destra di figura 3.12). La popolazione a diametri di Feret inferiori non viene più rinvenuta dopo il trattamento, mentre la popolazione a dimensioni maggiori risulta pressoché inalterata. Si può quindi supporre che, in questo caso, le particelle più piccole siano state del tutto dissolte dal trattamento.

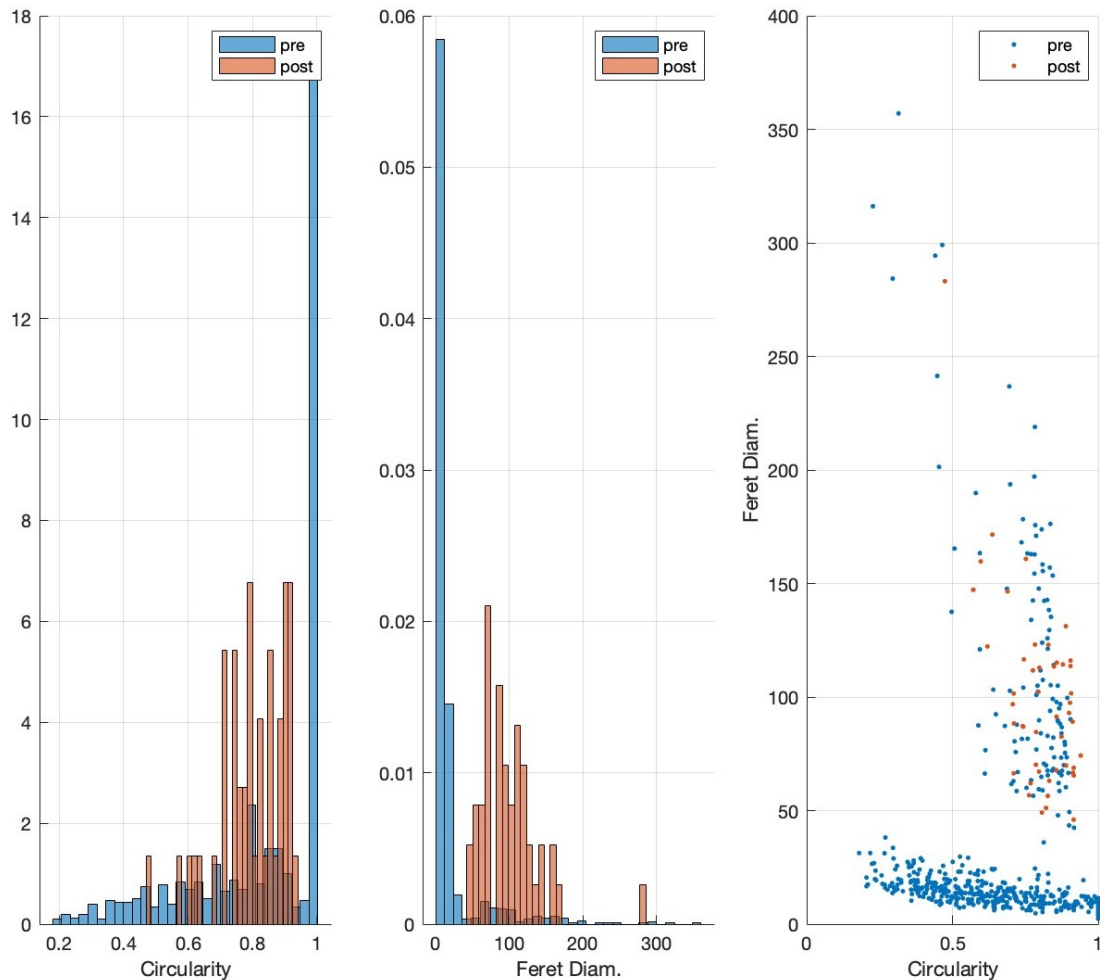


Figura 3.12: a sinistra il confronto della circolarità pre (prima del trattamento) e post (dopo il trattamento), al centro il confronto con il diametro di Feret, a destra il confronto tra circolarità e diametro di Feret della PA12

3.3. Il trattamento della carne e microplastiche con la miscela di reazione

Dopo aver testato la miscela di reazione con le microplastiche ed aver verificato l'influenza che ha il trattamento sui loro spettri Raman e sulla loro forma, viene sperimentato il protocollo digestivo con carne e microplastiche.

Inizialmente viene analizzato il campione "bianco", il cui trattamento digestivo viene esposto nel capitolo 2.2.1. Dal microscopio vengono notate particelle, che però analizzando lo spettro Raman non vengono attribuite come microplastiche, per questo si può affermare che il campione di carne trattato non contiene al suo interno inquinamento rilevante da microplastiche, né che il protocollo messo in atto ne introduca.

Successivamente viene analizzato il campione di PA12, che come descritto nel capitolo 3.1 è stato particolarmente complesso da filtrare. Questo poiché flocculava molto velocemente, perciò è stato necessario sonificarlo fino a poco prima della filtrazione. La sua rapida aggregazione potrebbe essere dovuta sia per interazioni di tipo elettrostatico che per l'interazione idrofobica esistente nel campione di carne. Lo spettro Raman del campione carne-PA12 dopo il trattamento risulta più rumoroso di quello delle analoghe particelle non trattate. Tuttavia, si nota che i segnali corrispondono perfettamente, sebbene con intensità minore, come raffigurato in figura 3.13. Il segnale a 1600 cm^{-1} può essere a volte tanto debole da essere confuso con il rumore di fondo.

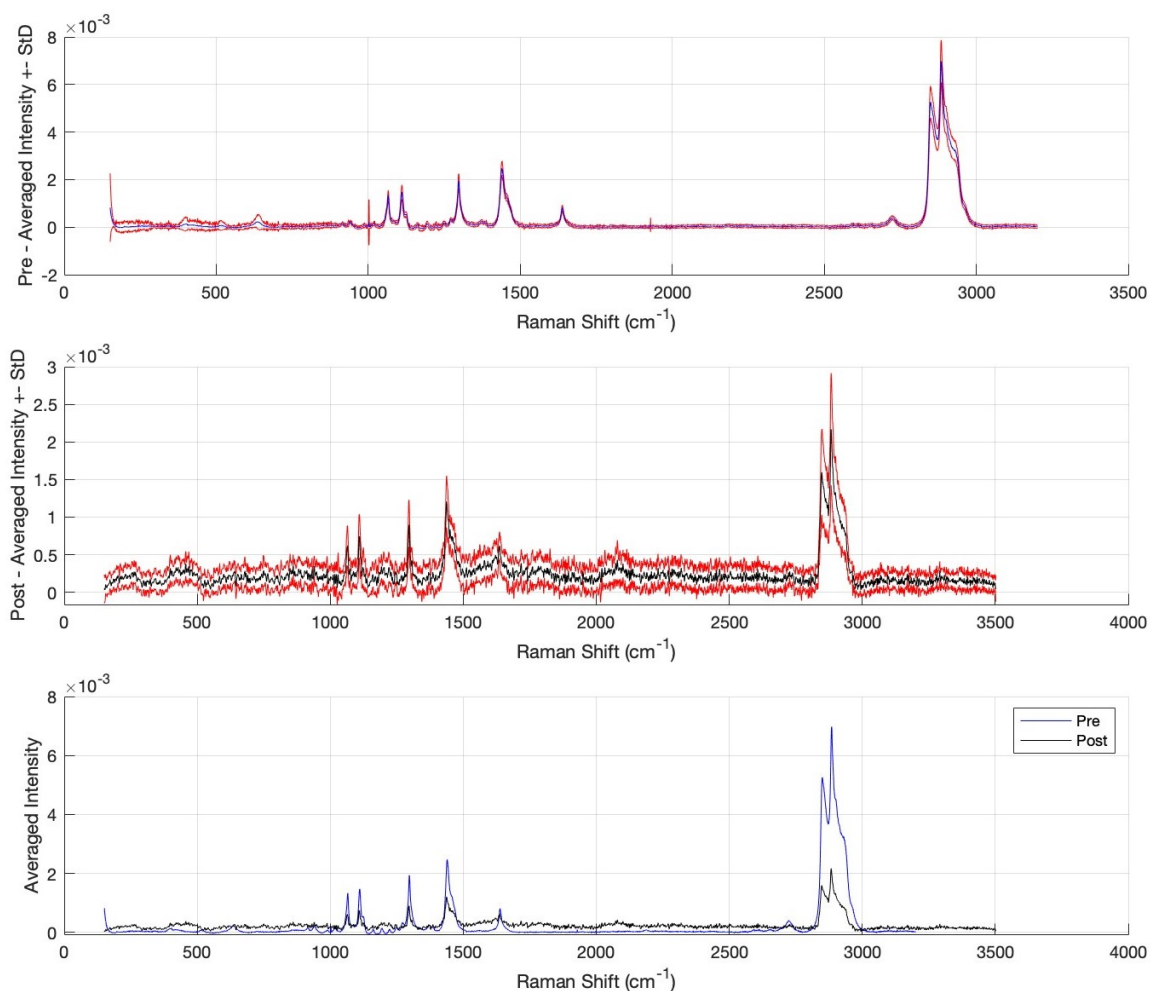


Figura 3.13: in alto lo spettro della PA12 prima del trattamento (con deviazione standard), al centro le plastiche con la carne dopo il trattamento (con deviazione standard) e in basso lo spettro di confronto

Il comportamento delle dimensioni del campione di carne e PA12, in figura 3.14, è equivalente a quelle del campione di PA12 con la miscela di reazione: la popolazione a diametri di Feret inferiori non viene rinvenuta dopo il trattamento, mentre le particelle con dimensioni maggiori rimangono inalterate.

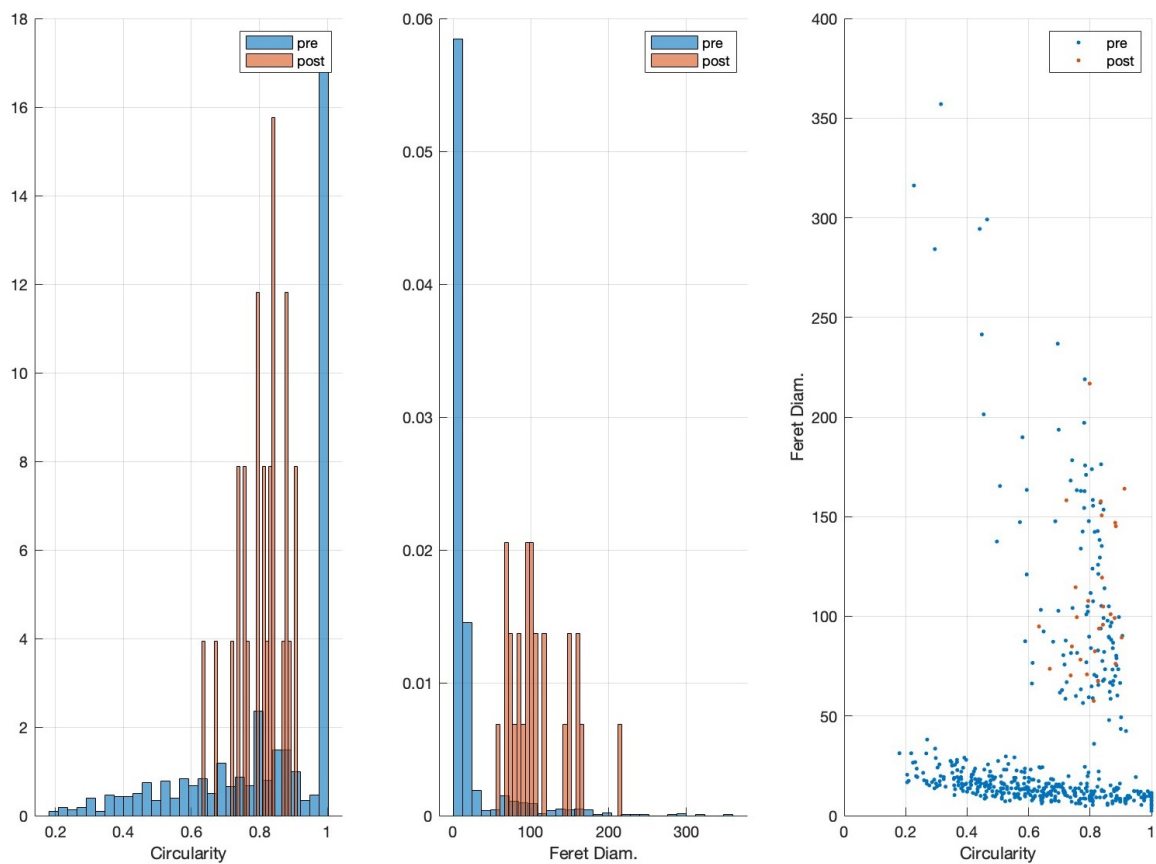


Figura 3.14: a sinistra il confronto della circolarità pre (prima del trattamento) e post (dopo il trattamento), al centro il confronto con il diametro di Feret, a destra il confronto tra circolarità e diametro di Feret della PA12

È quindi possibile asserire che il protocollo applicato non modifica il comportamento delle microplastiche nel caso in cui queste siano o meno all'interno del campione di carne.

Infine, viene rilevato un comportamento simile anche per il campione di carne-LDPE. In questo caso la filtrazione è stata interrotta per cause di forza maggiore ed è stato raccolto il filtrato solo di circa metà del campione. Nonostante ciò, si può affermare che anche in questo caso non ci sia stato mutamento della struttura chimica del composto, come rappresentato in figura 3.15.

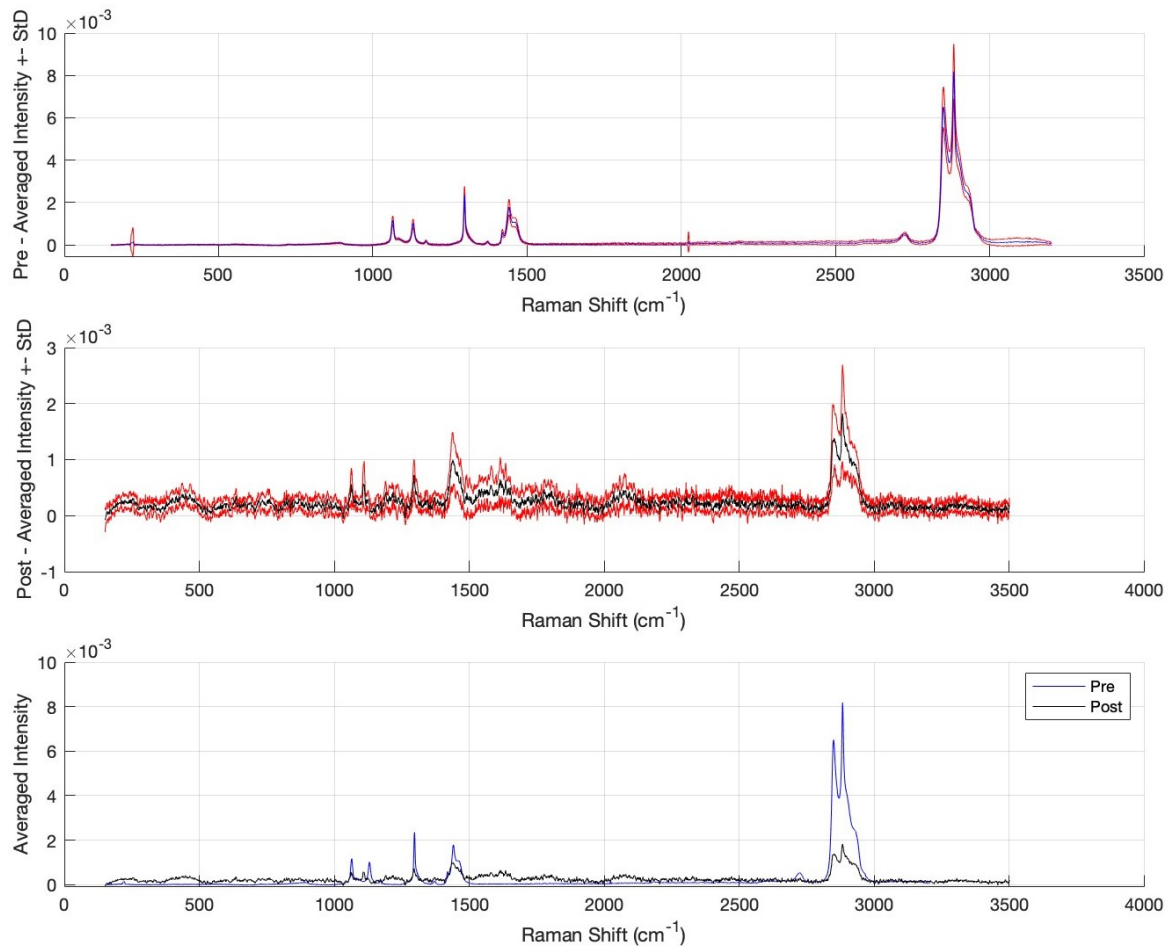


Figura 3.15: in alto lo spettro del LDPE prima del trattamento (con deviazione standard), al centro le plastiche con la carne dopo il trattamento (con deviazione standard) e in basso lo spettro di confronto

Dallo spettro del campione dopo il trattamento si notano gli stessi segnali però con intensità minore.

L'analisi morfologica del campione di carne-LDPE, in figura 3.16, suggerisce l'assenza totale delle particelle piccole e sferiche. Si notano invece particelle con dimensioni variabili, ma per lo più tondeggianti.

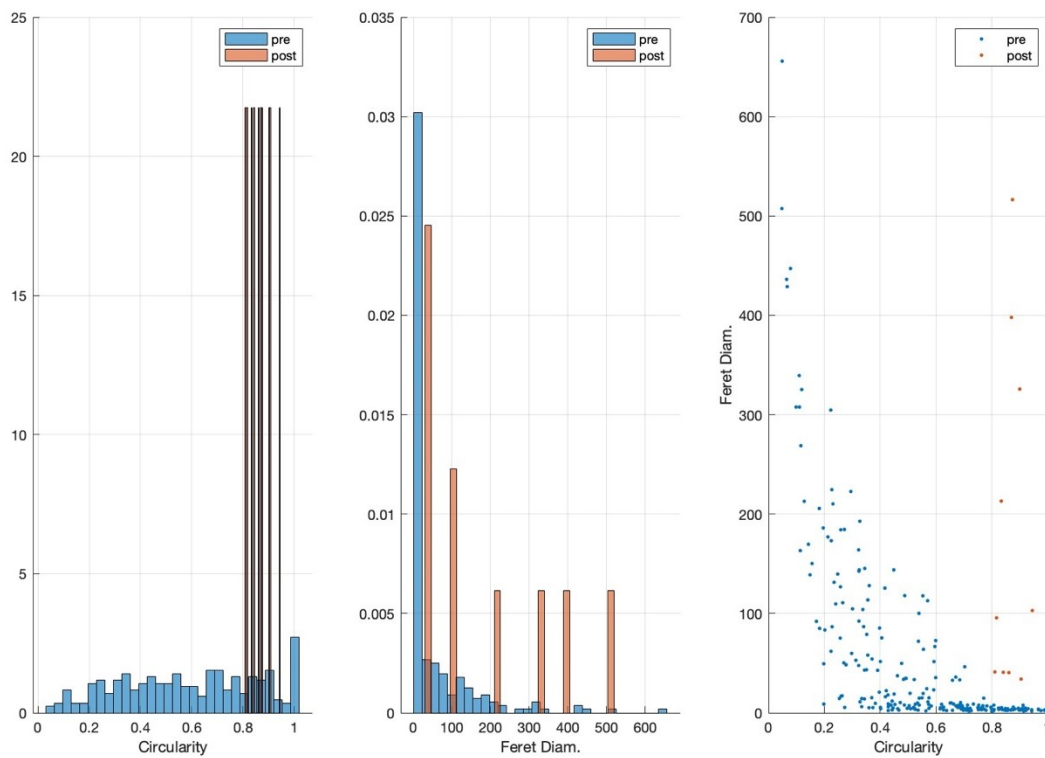


Figura 3.16: a sinistra il confronto della circolarità pre (prima del trattamento) e post (dopo il trattamento), al centro il confronto con il diametro di Feret, a destra il confronto tra circolarità e diametro di Feret del LDPE

4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Questo progetto di tesi ha avuto lo scopo di sviluppare un metodo di digestione di un campione biologico per il rilevamento delle microplastiche. Dato che soltanto in questi ultimi anni si è manifestato un maggior interesse verso questo inquinante, esistono pochi articoli che trattano una rapida digestione di campioni biologici, analoghi alla placenta umana, oggetto di una indagine in corso presso il Dipartimento di Scienze Chimiche.

La miscela di reazione utilizzata, composta da 1:1 di KOH ed NaClO, trae spunto da uno studio di letteratura per la rilevazione di microplastiche da stomaci di pesce. In questo studio viene invece applicata a macinato di carne bovina, matrice evidentemente molto diversa. Si riscontra la necessità di liofilizzare la carne prima di porla in contatto con la miscela di reazione, e lasciare poi reagire in bagno a sonicazione per sei ore.

Una volta accertato il suo potere dissolvente per il campione di carne, vengono testate alcune microplastiche selezionate, in modo tale da appurare se e come queste vengano deteriorate. È stato riscontrato che il campione di PET ha mostrato un chiaro deterioramento, mentre gli spettri Raman prima e dopo il trattamento risultano invariati per tutte le altre microplastiche (LDPE, PTFE, PA6 e PA12).

L'utilizzo della tecnica micro-Raman ha infine permesso di valutare non solo la composizione chimica del composto, ma anche eventuali mutamenti nella struttura delle particelle.

Calcolando i valori di circolarità e di diametro di Feret è stato possibile definire se le particelle aggregano durante la digestione. Da un punto di vista morfologico si riscontra infatti una tendenza pressoché costante a formare particolato di dimensioni più grandi e sferoidali a seguito del trattamento.

Sperimentalmente, la fase più delicata di questo progetto è stata la filtrazione, in particolare a causa del facile intasamento. Infatti, i pori del filtro, di appena 0.2 μm , possono facilmente intasarsi con i tessuti e fibre non del tutto degradati della carne. Ciononostante, l'utilizzo di un filtro a base di policarbonato non sembra aver inquinato i campioni, sebbene sia stato necessario trasferire su vetrino tutti i filtrati per via dei suoi segnali Raman propri.

L'interesse sempre maggiore verso questi microinquinanti potrebbe portare allo sviluppo di nuovi filtri, che siano in grado di resistere alla miscela di reazione e non presentino interferenze con l'analisi Raman del campione, particolarmente importante quando si compie una misura di tipo quantitativo.

Sono stati quindi raggiunti tutti gli obiettivi previsti per questo progetto. Una interessante prospettiva a breve termine, a corollario, potrebbe essere di completare le misure di tutti i campioni di carne con le restanti tipologie di microplastiche, in modo da valutarne l'efficacia con tutte le particelle.

5. RINGRAZIAMENTI

Mi è doveroso dedicare questo spazio del mio elaborato alle persone che hanno contribuito, con il loro supporto, alla realizzazione dello stesso.

Innanzitutto, vorrei ringraziare il mio relatore, Prof. Moreno Meneghetti, ed in particolare il correlatore, Dott. Lucio Litti, per avermi ispirata, accompagnata e guidata durante questo percorso con pazienza e dedizione. Grazie per l'infinità disponibilità e umanità, mostrata in ogni passo di questo progetto. Un ringraziamento speciale anche a tutte le persone del gruppo NOL per avermi accolta, aiutata e supportata.

Un ringraziamento al mio controrelatore, Dott. Marco Roverso e alla Prof.ssa Sara Bogialli per la disponibilità ad usare il loro laboratorio per gli esperimenti di digestione ed il fondamentale apporto nella definizione del metodo sperimentale.

Un grazie alla Dott.ssa Fabiana Corami dell'Istituto di Scienze Polari, CNR sede presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Venezia, per i filtri di alluminosilicati e per i campioni di microplastiche.

Ci tengo a ringraziare anche la Prof.ssa Marina Gobbo per l'utilizzo del liofilizzatore.

Senza il supporto morale dei miei genitori e della mia famiglia, non sarei mai potuto arrivare fin qui. Grazie per essere sempre stati presenti, per avermi sempre sostenuto e per aver appoggiato ogni mia decisione.

Un ringraziamento speciale a Pietro, che mi ha sempre supportata e compresa durante questo percorso. Grazie per tutto il tempo che mi hai dedicato, per la pazienza e per avermi spronato a dare il meglio di me stessa.

Vorrei esprimere la mia gratitudine per le mie amiche Aurora, Elena, Matilde e Rebecca per essere sempre state presenti anche in questo mio percorso universitario, per avermi sostenuta nei momenti più difficili e per le serate di spensieratezza che mi avete regalato.

Infine, vorrei ringraziare i miei compagni di corso per aver preparato insieme ogni esame della nostra carriera universitaria e per aver condiviso sempre gioie e dolori.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Braun, T. *et al.*, **2021**, *Pharmaceutics*, 13
2. Martellone, L., Lucentini, L., Mattei, D., De Vincenzo, M., Favero, G., Bogialli, S., Litti, L., Meneghetti, M., Corami, F., Rosso, B., *Rapporti ISTISAN*, **2021**
3. Wang, C., Zhao, J. & Xing, B. *Journal of Hazardous Materials*, **2021**, vol. 407
4. Enders, K., Lenz, R., Beer, S. & Stedmon, C. A. *ICES Journal of Marine Science*, **2017**, 74, 326–331
5. Araujo, C. F., Nolasco, M. M., Ribeiro, A. M. P. & Ribeiro-Claro, P. J. A. *Water Research*, **2018**, vol. 142 426–440
6. Ferraro, J. R., Nakamoto, K. & Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy*. Elsevier (2003).
7. Schmäzlin, E. *et al.* *Sensors (Switzerland)*, **2014**, 14, 21968–21980
8. Mark, J. *Polymer Data Handbook*, Elsevier (1999).
9. Rytelewska, S. & Dąbrowska, A. *Microplastics* , **2022**, 1, 263–282