



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea magistrale  
in Chimica e Tecnologie Sostenibili  
LM - 54



Consiglio Nazionale  
delle Ricerche

Tesi di Laurea

# **Small microplastics (<100 $\mu\text{m}$ ) e nanoplastiche in matrici ambientali: sviluppo di metodi di pretrattamento, quantificazione e identificazione**

**Relatore**

Prof. Andrea Gambaro

**Correlatore**

Dr. Fabiana Corami CNR-ISP

Dr. Lucio Littì Università degli studi di Padova

**Laureanda**

Giulia Zaia

Matricola

974621

**Anno Accademico**

2021/2022



## INDICE

<b>1. SCOPO E OBIETTIVI</b> .....	1
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	2
2.1 Storia ed utilizzi della plastica.....	2
2.2 Le microplastiche.....	7
2.2.1. Destino e trasporto delle microplastiche nell'ambiente marino.....	9
2.2.2. Degradazione delle microplastiche.....	10
2.2.3. Le microplastiche come vettori di contaminanti nell'ambiente.....	13
2.3. Le nanoplastiche.....	16
<b>3. MATERIALE E METODI</b> .....	18
3.1 Area di ricerca e modalità di campionamento.....	18
3.1.1 La Laguna di Venezia.....	18
3.1.2 Siti di campionamento.....	19
3.1.3 Metodi di campionamento.....	20
3.2 Reagenti.....	20
3.3 Metodo di estrazione e purificazione per l'analisi delle acque lagunari.....	21
3.4 Procedura di filtrazione e purificazione.....	21
3.5 Strumentazione.....	23
3.5.1 Spettroscopia IR.....	23
3.5.2 Micro-FTIR.....	30
3.5.3 Spettroscopia Raman.....	33
3.5.4 Micro-Raman.....	38
3.6 Analisi quantitativa e qualitativa di microplastiche ed additivi tramite Micro-FTIR.....	42
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	45
4.1 Analisi delle microplastiche nelle acque lagunari tramite $\mu$ -FTIR.....	45
4.2 Le microplastiche nelle acque di Sant'Erasmus.....	46
4.3 Le microplastiche nelle acque di Palude Maggiore.....	49
4.4 Confronto tra i siti.....	51
4.5 Metodi non distruttivi per l'analisi di nanoplastiche: applicazione della spettroscopia $\mu$ -Raman.....	53
4.5.1. Le nanoplastiche nelle acque lagunari.....	53
4.5.2. Trattamento del campione.....	54
4.5.3. Analisi qualitativa delle nanoplastiche.....	55
4.5.4. Sant'Erasmus campagna autunno-inverno 2019.....	55
4.5.5. Sant'Erasmus campagna estiva 2020.....	56
4.5.6. Palude Maggiore campagna autunno-inverno 2019.....	57
4.5.7. Palude Maggiore campagna estiva 2020.....	57
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	58
<b>APPENDICE</b> .....	60
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	69

## 1. SCOPO E OBIETTIVI

Le microplastiche sono considerate oramai come un inquinante persistente che interessa tutti i comparti ambientali.

Se da un lato le microplastiche di maggiori dimensioni sono state largamente studiate lo stesso non si può dire per la frazione dimensionale più piccola ovvero le *small microplastics* (SMPs), particelle con dimensioni comprese tra 5  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$  e le nanoplastiche, particelle con dimensioni comprese tra 1 nm e 1000 nm.

Attualmente, infatti, l'entità della contaminazione ambientale per particelle inferiori ai 100  $\mu\text{m}$  resta pressoché sconosciuta a causa del limitato sviluppo degli attuali metodi di rilevamento.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di verificare se il metodo precedentemente elaborato per l'estrazione, purificazione, identificazione e quantificazione delle *small microplastics* (Corami *et al.*, 2021a) potesse essere applicato anche allo studio delle nanoplastiche nella stessa matrice ambientale.

A tale scopo sono stati analizzati dei campioni di acqua superficiale prelevati in sei stazioni distribuite lungo la Laguna di Venezia in diversi intervalli di tempo: autunno-inverno 2019 ed estate 2020.

L'identificazione e l'analisi quantitativa delle microplastiche è stata eseguita tramite lo spettrometro Micro-FTIR presso l'Istituto di Scienze Polari del CNR, sede di Venezia.

In particolare, sono stati esaminati nel dettaglio i siti che presentavano, da studi precedenti, prevalentemente microplastiche di piccole dimensioni, ovvero Sant'Erasmus e Palude Maggiore, al fine poi di ricercare negli stessi particelle inferiori ai 5  $\mu\text{m}$ .

La tecnica strumentale micro-FTIR, in virtù della sua risoluzione spaziale, risulta idonea per indagare particelle a partire dai 5  $\mu\text{m}$  e quindi inadatta agli scopi di questo lavoro di tesi, pertanto si è dovuto ricorrere ad una seconda tecnica, il micro-Raman che, possedendo una risoluzione spaziale di circa 1  $\mu\text{m}$ , si presta meglio allo studio di nanoparticelle.

Verificato che il metodo per l'estrazione e la purificazione messo a punto per le microplastiche risultava adatto al raggiungimento dei nostri obiettivi di ottenere un filtro in cui le nanoparticelle potevano essere agevolmente studiate, si è sviluppato un metodo per la loro identificazione tramite microspettroscopia-Raman. Le analisi sono state eseguite presso l'Università degli studi di Padova.

Vengono inoltre proposte le possibili fonti di contaminazione da microplastiche per i due siti lagunari oggetto di studio.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 Storia ed utilizzi della plastica

Dopo l'età del Bronzo e del Ferro quella che stiamo vivendo può definirsi l'età della plastica, chiamata anche da alcuni scienziati come Plasticene, un'epoca iniziata nel 1950 con il boom economico del dopo guerra.

In relazione agli elevati tassi di produzione mondiale di questo versatile materiale, ogni anno vengono generate enormi quantità di rifiuti plastici che, a causa di una gestione inadeguata, negli anni ha condotto ad un continuo rilascio e accumulo di plastica nell'ambiente.

Allo stato attuale l'inquinamento da plastica è stato riconosciuto come un grave problema ambientale a livello globale, una minaccia per tutti gli ecosistemi.

Un ulteriore problema riguarda il fatto che una volta immessi nell'ambiente i detriti plastici più grandi deteriorandosi tramite processi fisici, chimici e biologici possono produrre particelle secondarie di dimensioni inferiori fino ad arrivare alla micro e nanoscala.

Proprio su queste piccole particelle la comunità scientifica si sta attualmente concentrando.

Il termine plastica viene utilizzato oggi per indicare una vasta categoria di materiali che possono essere di origine semisintetica o sintetica.

Chimicamente i materiali plastici sono costituiti principalmente da polimeri, macromolecole ad alto peso molecolare, costituiti da un'unità ripetitiva di base, chiamata monomero.

Le varie unità di base vengono fatte reagire tra loro tramite reazioni di policondensazione o poliaddizione.

Alla base polimerica possono essere aggiunte una serie di sostanze quali antiossidanti, coloranti, plastificanti, lubrificanti, che hanno lo scopo di modificare le proprietà del materiale finale e renderlo adatto all'applicazione a cui è destinato.

In base al loro diverso comportamento le plastiche possono essere divise in termoplastiche, termoindurenti ed elastomeri.

Le termoplastiche come, per esempio, il polietilene o il polistirene, si presentano come materiali amorfi o parzialmente cristallini ed hanno la peculiarità di diminuire la loro viscosità all'aumentare della temperatura diventando così molto modellabili per poi solidificare a seguito del raffreddamento in modo reversibile.

Nei materiali termoindurenti, come il poliuretano, le proprietà meccaniche variano di poco con l'aumento della temperatura. In un primo momento rammolliscono a causa del riscaldamento per poi irrigidirsi irreversibilmente a causa di una reazione chimica che si traduce nella formazione di una reticolazione polimerica tridimensionale. Questi materiali sono più duri e fragili rispetto ai primi.

Gli elastomeri, come il cloroprene o lo stirene-butadiene, si presentano allo stato amorfo e assumono una certa cristallinità quando sono sottoposti ad una forza di stiro. Si contraddistinguono per la loro eccellente elasticità che mantengono in un range piuttosto ampio di temperature. A seguito dell'allungamento a cui sono sottoposti il materiale ritorna alle dimensioni originarie.

Si stima che circa metà della quantità di plastica prodotta sia stata generata negli ultimi 13 anni (Andrade *et al.*, 2021).

In accordo con la crescita economica e della popolazione oggi giorno la società moderna richiede quantità sempre più ingenti di questo materiale tanto è che si è passati da una produzione mondiale di 2 Mt nel 1950 a 387 Mt nel 2020. Di seguito vengono riportati i grafici relativi alla produzione mondiale ed europea a partire dal 2016 (Fig.1). Possiamo osservare come ci sia sempre stato un trend positivo, tranne che per il 2020 dove si è osservato un arresto della crescita di produzione a causa della pandemia di Covid- 19 (Plastics Europe, 2021).

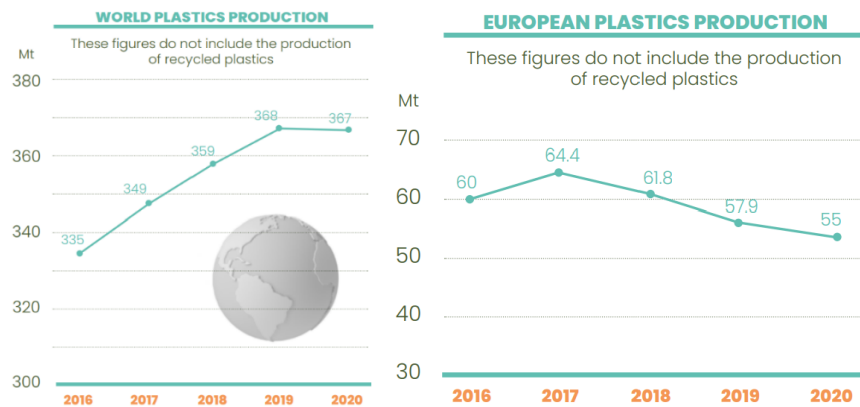


Fig 1: Produzione del materiale plastico dal 2016 al 2020 (Plastics Europe, 2021)

Delle 367 Mt di plastica generata nel mondo la principale produzione è da attribuirsi alla Cina (32%), seguita dalla NAFTA (North American Free Trade Agreement) (19%) e dall'Asia (17%) (Fig.2).

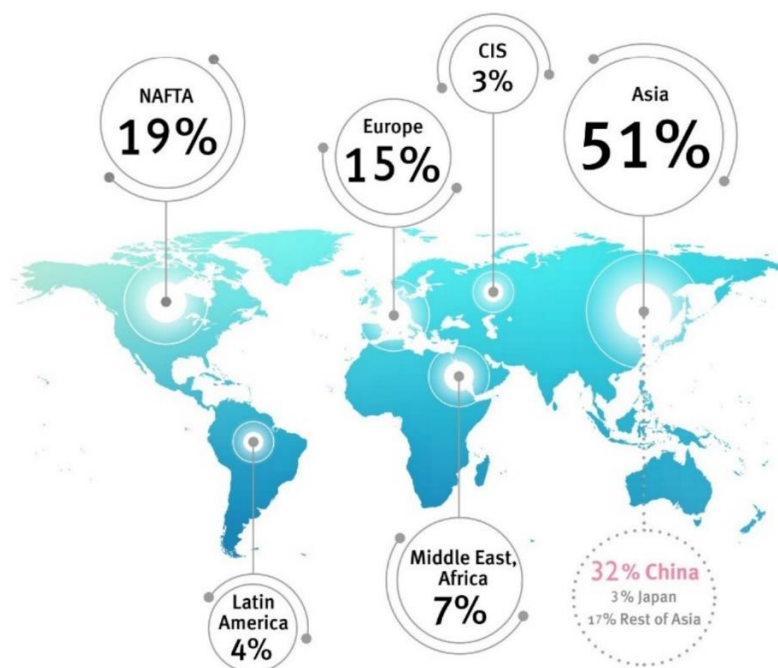


Fig. 2: Distribuzione mondiale di plastica (Plastics Europe, 2021)

I principali mercati della plastica sono il packaging (40,5%), l'edilizia (20,4%) ed il settore automobilistico (8,8%) (Plastics Europe, 2021).

I polimeri più comunemente richiesti per queste produzioni ed applicazioni sono il polipropilene (PP, 19,7%) utilizzato nella produzione di tubi, imballaggi alimentari e nel settore automobilistico; il polietilene a bassa densità e il polietilene a bassa densità lineare (LDPE e LLDPE 17,4%); il polietilene ad alta e media densità (PE-HD e PE-MD, 12,9%) impiegato nella produzione di borse, giochi e prodotti per la casa; il polivinilcloruro (PVC, 9,6%) ed il polietilene tereftalato (PET, 8,4%).

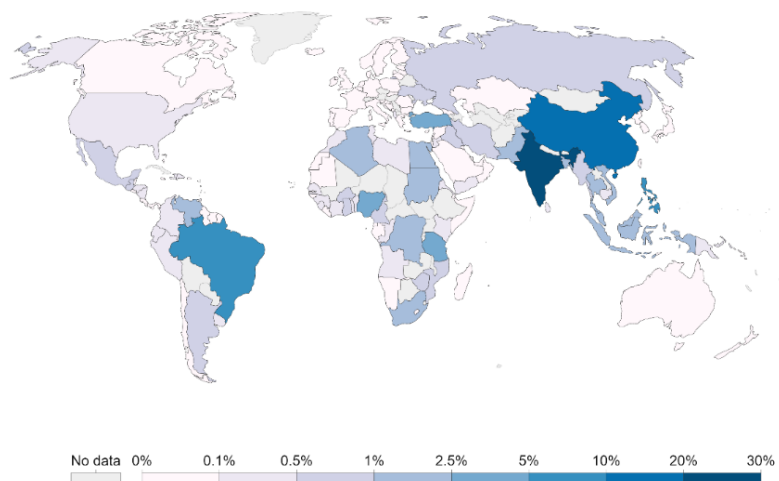
Ad un elevato uso delle plastiche, corrisponde anche una grande quantità di rifiuti.

È stato stimato che circa 6,3 Gt di rifiuti plastici sono stati prodotti fino ad ora.

Sebbene negli ultimi 10 anni il riciclo sia aumentato del 30%, solo il 6-26% viene riciclato, mentre la restante parte viene incenerita o direttamente scaricata nelle discariche o nell'ambiente (Andrade *et al.*, 2021).

Il vero problema per l'ambiente risiede proprio nella mala gestione del rifiuto plastico (Fig.3). Se da un lato, infatti, nei paesi ricchi i rifiuti vengono raccolti nelle discariche, inceneriti o riciclati, nei paesi emergenti tali infrastrutture non sono ancora state sviluppate e quindi moltissimo materiale plastico si disperde nell'ambiente circostante. Nelle Filippine per esempio i rifiuti pro capite gestiti in malo modo sono 100 volte superiori a quelli del Regno Unito (Meijer *et al.*, 2021).

Share of global mismanaged plastic waste, 2019



Source: Meijer et al. (2021). More than 1000 rivers account for 80% of global riverine plastic emissions into the ocean. Science Advances. CC BY

Fig. 3: Quota mondiale di rifiuti di plastica gestite in modo errato (Meijer *et al.*, 2021)

Ovviamente i materiali plastici essendo stati ideati per essere performanti e duraturi piuttosto che biodegradabili una volta riversati nell'ambiente subiscono un processo di accumulo.

Sicuramente un importante ruolo nell'inquinamento globale è da attribuirsi ai prodotti plastici monouso, che ricordiamo essere il 40% della produzione totale di plastica. Questi oggetti, infatti, sebbene abbiano portato molte comodità nella nostra quotidianità hanno un tempo di vita troppo breve, mentre nell'ambiente possono persistere per centinaia d'anni.

Basti pensare che il 50% dei rifiuti marini nell'UE è rappresentata proprio da articoli monouso (sup), come tappi bottiglie, sacchetti mentre, il 27% è costituito da attrezzi da pesca (European Commission, 2021).

Per tale ragione il 5 giugno 2019 è stata pubblicata la Direttiva (UE) 2019/904 del Parlamento europeo e del Consiglio che mira a ridurre il volume e l'incidenza ambientale di alcuni prodotti plastici e ad incentivare un'economia di tipo circolare (European Commission, 2019).

In modo particolare sono stati vietati tutti gli articoli monouso per i quali esistono alternative non plastiche come piatti, posate, cannucce, contenitori alimentari in polistirene espanso e tutti i prodotti generati con plastiche oxo-degradabili, ovvero plastiche che a causa degli additivi che contengono si frammentano tramite ossidazione. Per gli articoli monouso per i quali non esistono attualmente delle alternative sostenibili invece gli Stati membri dovranno mettere appunto un piano per diminuirne il loro utilizzo tramite, per esempio, campagne di sensibilizzazione, introduzione di requisiti di etichettatura per informare i consumatori, requisiti di progettazione ed obblighi di gestione dei rifiuti per i produttori. Obiettivi più specifici sono la raccolta del 90% delle bottiglie di plastica entro il 2029 e l'utilizzo del 30% di plastica riciclata nella loro produzione entro il 2030. Nel 2020 l'Unione Europea ha inoltre introdotto la Plastic tax, un'imposta a carico degli stati membri sui rifiuti plastici da imballaggi con singolo impiego che non sono stati riciclati.

Le sostanze plastiche possono essere dunque rilasciate durante l'intero ciclo della loro vita e ciò comporta un'esposizione pericolosa per un'ampia gamma di organismi appartenenti a tutti i livelli di organizzazione biologica incluso l'uomo (Bridson *et al.*, 2021). Sono già note oltre 600 specie colpite dalla plastica, soprattutto attraverso l'ingestione (Wiesinger, Wang and Hellweg, 2021).

Un ulteriore problema di questa tipologia di rifiuti dispersi nell'ambiente oltre che al loro accumulo è la frammentazione che subiscono a causa di una serie di processi naturali.

In questo modo le macroplastiche si trasformano nelle micro e nano plastiche.

Di conseguenza, sebbene il processo di degradazione sia lento, circa il 90% dei detriti plastici diventano microplastiche nell'ambiente marino (Do, Ha and Kwon, 2022).

Circa 8 milioni di tonnellate di plastica vengono riversate ogni anno nell'oceano, ed è stato previsto che nel 2050 la percentuale di plastica in mare supererà quella dei pesci (Zhao *et al.*, 2022).

Nelle acque superficiali dei nostri oceani sono già presenti sette grandi isole di plastica: due situate nel Pacifico (est-ovest), due nell'oceano Atlantico (nord-sud), una nell'oceano Indiano, come riportato in figura e, di più recente scoperta abbiamo, l'isola nel mar dei Sargassi e quella nel mare di Barents, in prossimità del circolo polare artico (Fig. 4).



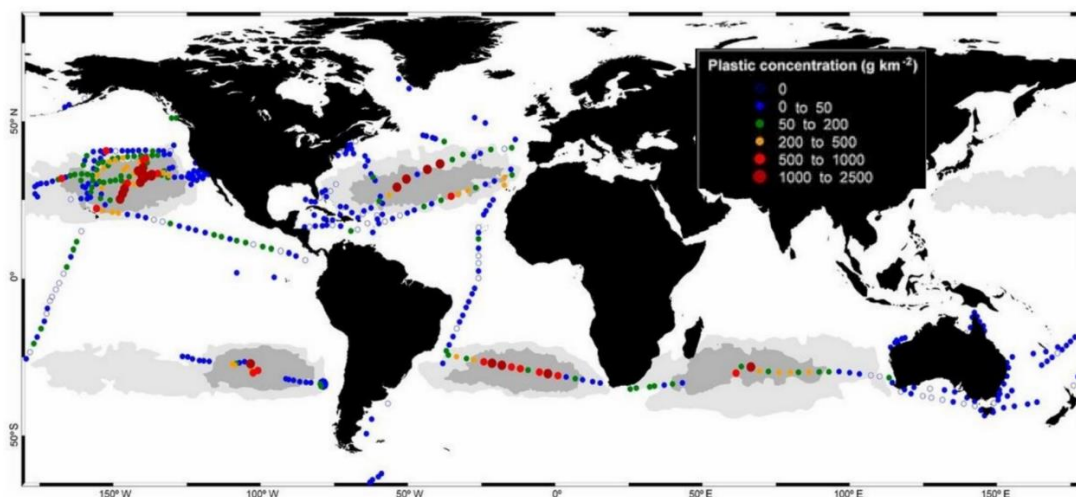


Fig. 4: Principale zone di accumulo di materie plastiche nell'oceano (Cózar et al., 2015)

Questi accumuli di detriti si concentrano nella parte centrale del bacino oceanico piuttosto che lungo i perimetri. Ciò è essenzialmente dovuto al fatto che essendo la plastica un materiale tipicamente galleggiante il suo moto nell'ambiente acquoso è influenzato dai venti ma soprattutto dalle correnti superficiali. In modo particolare il punto di incontro delle correnti marine, chiamati vortici oceanici, con il loro movimento circolare, attirano i detriti che tendono a concentrarsi nella loro zona centrale, dove rimangono poi intrappolati.

L'esempio di isola di plastica più estesa è quella situata nell'Oceano Pacifico, chiamata Great Pacific Garbage Patch (GPGP). In realtà la GPGP è composta dalla Eastern Garbage Patch localizzata tra la California e le Hawaii e la Western Garbage Patch situata nei pressi del Giappone che sono collegate tra di loro tramite la zona di convergenza subtropicale.

In quest'area, infatti, le acque fredde che provengono dall'Artico si incontrano con quelle calde del Pacifico Meridionale formando un vortice oceanico che con il suo movimento raccoglie i detriti plastici marini.

Il GPGP nel 2018 comprendeva 1,8 trillioni di pezzi di plastica con una massa di 79 mila tonnellate.

Di questi il 52% era composto da detriti derivanti dalla pesca e il restante 47% da plastica dura, fogli e film (Lebreton et al., 2018).

A livello globale l'80% della plastica oceanica proviene da fonti terrestri mentre il 20% da fonti marine che sono prevalentemente costituite dal rilascio di materiale durante la pesca commerciale (Li, Tse and Fok, 2016a).

## 2.2 Le microplastiche

I frammenti plastici sono classificati in base alla loro grandezza come macroplastiche, mesoplastiche, microplastiche (MPs) e nanoplastiche (NPs), come riportato in (Fig.5) (Alprol, Gaballah and Hassaan, 2021a).

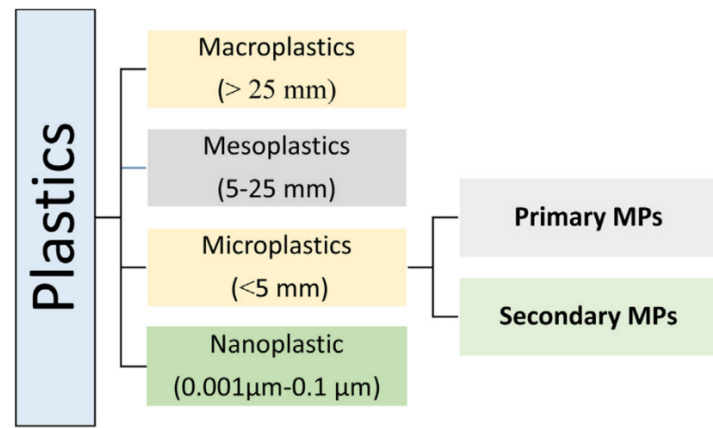


Fig.5: Classificazione delle dimensioni delle particelle plastiche (Alprol et al., 2021b)

Il termine microplastica è stato coniato da Thompson nel 2004, con un susseguirsi di definizioni relative alle dimensioni delle microplastiche, spesso in poco accordo fra loro. Una definizione più universale è stata proposta nel 2019 dall' European Chemicals Agency (ECHA), che ha definito le microplastiche come particelle solide costituite da polimeri sintetici contenenti altre sostanze come additivi, plastificanti, ecc., con un range dimensionale compreso tra 5 mm e 1 mm e compreso tra 3 nm e 15 nm nel caso delle fibre (ECHA., 2019).

Le microplastiche, rappresentando il maggior numero di particelle presenti nell'ambiente, sono diventate un *hotspot* nella ricerca scientifica. Dal 2010 al 2022 sono stati pubblicati 2181 articoli relativi alle MPs in Scopus e PubMed, con un massimo nell'anno 2021, evidenziando un trend positivo della produzione scientifica annuale in questo argomento (Ab Rashid et al., 2022).

In base alla loro fonte di origine le microplastiche possono essere divise in microplastiche primarie e secondarie.

Le MPs primarie sono plastiche fabbricate intenzionalmente per avere una dimensione microscopica (Li, Tse and Fok, 2016a). In base alle loro caratteristiche tecniche possono essere impiegate nella medicina come vettori di farmaci, nell'agricoltura dove sono presenti nei fertilizzanti, nella produzione di prodotti cosmetici e detergenti (scrub per la pelle, dentifrici, incapsulamento di fragranze), nelle sostanze abrasive utilizzate nell'industria (Patil et al., 2022).

Tra le sorgenti principali che immettono direttamente nell'ambiente queste particelle troviamo il lavaggio di capi contenenti fibre sintetiche, che contribuisce per il 35% al rilascio di MPs primarie e l'abrasione degli pneumatici nel manto stradale (28%) (Cosa, 2018). È stato stimato che per 6 kg di carico vengano rilasciate 700000 fibre plastiche (Gruber et al., 2022). Ulteriori fonti possono essere le acque reflue ed i rifiuti solidi urbani. Per MPs secondarie si intendono invece particelle originate dalla frammentazione di manufatti plastici di dimensioni maggiori come bottiglie, reti da pesca, attraverso processi fisici, biologici e chimici (azione meccanica di venti ed onde, esposizione solare, biofouling) che avvengono in ambiente, dagli oceani all'atmosfera. Durante il processo di frammentazione le particelle possono essere sottoposte ad alterazioni di diverse proprietà quali la morfologia della superficie, il colore, la cristallinità e la densità (Fig. 6) (Tirkey et al., 2021; Patil et al., 2022).

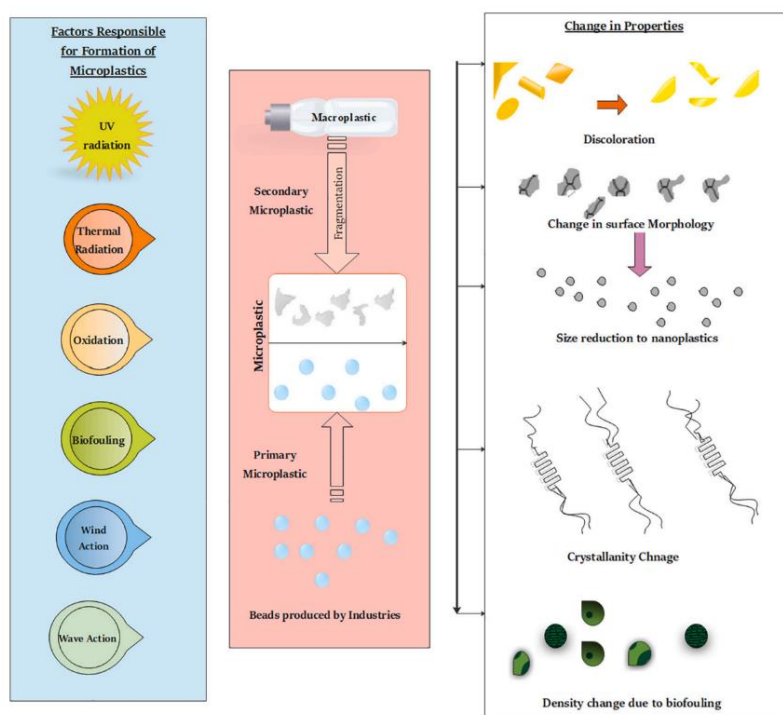


Fig.6: Degradazione delle MPs ed alterazione delle proprietà chimico-fisiche (Tirkey and Upadhyay, 2021)

Le microplastiche non differiscono soltanto per le loro dimensioni, uno dei fattori chiave che determina le interazioni con il biota, ma anche per il loro aspetto.

In natura sono state rinvenute diverse forme di MPs come fibre, sfere, film, frammenti, la cui abbondanza varia molto in base al compartimento ambientale che si sta analizzando (Ali et al., 2021).

Le fibre, per esempio, sono la forma più abbondante nella colonna d'acqua (52%) e nei sedimenti marini (45%), seguite dai frammenti e dalle sfere. Le fibre sono inoltre predominanti anche nell'atmosfera. (Hu et al., 2022).

La forma delle MPs dipende prevalentemente dal tempo di residenza della particella nell'ambiente, dalla forma che presentava la MP primaria e dai processi di alterazione che subiscono le particelle una volta immesse nell'ambiente (Ali *et al.*, 2021).

Allo stato attuale tracce di microplastiche sono state rinvenute anche nei luoghi più remoti del nostro pianeta dove la loro presenza è inaspettata come l'Everest e la fossa delle Marianne, la depressione oceanica più profonda al mondo (Patil *et al.*, 2022). Ciò ci suggerisce che le particelle plastiche possono essere trasportate per lunghe distanze e per tale ragione le fonti puntuali possono essere di difficile identificazione.

### 2.2.1 Destino e trasporto delle microplastiche nell'ambiente marino

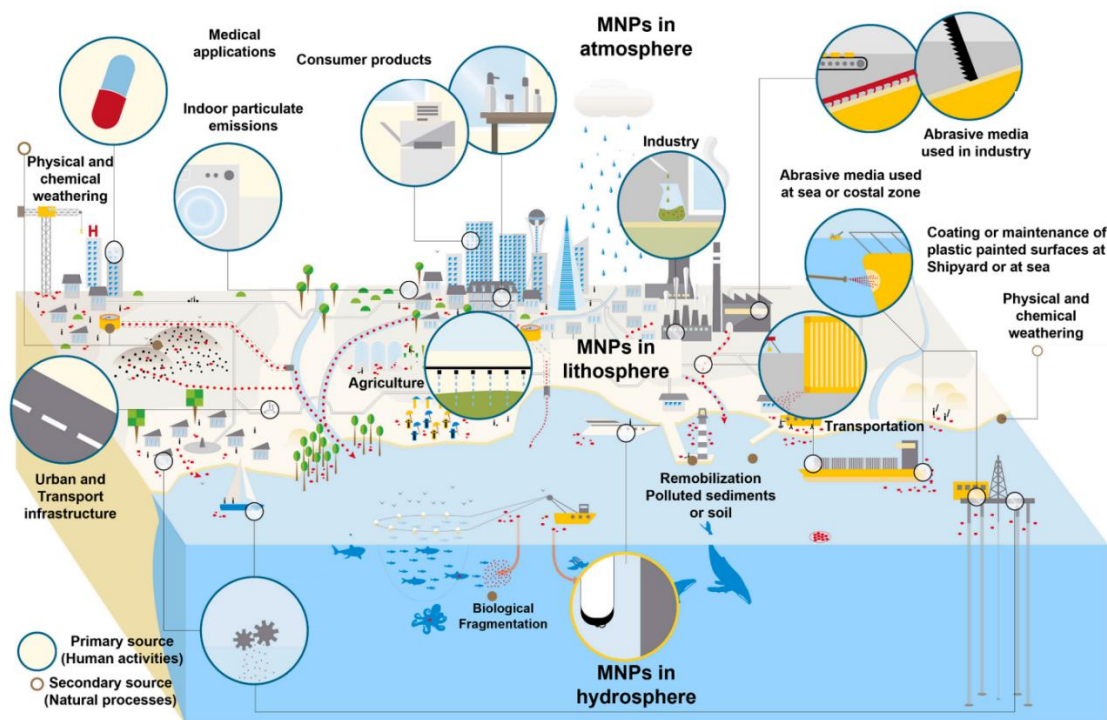


Fig.7: Fonti delle microplastiche nella biosfera (Patil *et al.*, 2022)

Oltre l'80% delle microplastiche vengono originate nella terraferma e meno del 20% nel mare (Yee *et al.*, 2021). Ciò si spiega col fatto che proprio nell'ambiente terrestre si concentrano le principali attività antropogeniche che producono rifiuti plastici (Fig.7).

Si stima che più di 800 milioni di tonnellate di plastica in mare siano state originate nella terraferma (Yee *et al.*, 2021) e veicolate principalmente dai corsi d'acqua.

Oltre che attraverso i sistemi di drenaggio, che raccolgono le particelle prodotte nella terraferma, l'incremento delle microplastiche nei mari si verifica anche per opera di attività marittime quali la pesca, l'acquacoltura e il turismo costiero (Xi *et al.*, 2022).

In aggiunta il mare è in contatto diretto con le spiagge che sono un importante punto di accumulo delle MPs a causa sia di fattori antropogenici che naturali (Li *et al.*, 2016b).

L'ambiente marino è una regione molto dinamica sottoposta ad effetti continui di forti attività climatiche ed idrodinamiche, come il moto ondoso e le maree, che determinano di conseguenza la distribuzione spaziale e temporale delle microplastiche in questo ambiente (K.L. *et al.*, 2022).

Per quanto riguarda la distribuzione verticale nella colonna d'acqua delle microplastiche essa è principalmente stabilita dalla densità specifica delle stesse.

Particelle con densità inferiore rispetto a quella dell'acqua marina ( $1,025 \text{ g/cm}^3$ ) tendono a galleggiare nello strato più superficiale della colonna d'acqua, quindi la loro concentrazione potrebbe diminuire lungo la colonna d'acqua, contrariamente a quanto succede per le particelle ad elevata densità che tendono a sprofondare più velocemente lungo la colonna d'acqua (Hu *et al.*, 2022).

Infatti, il PP e il PE avendo densità inferiore a  $1 \text{ g/cm}^3$  sono in grado di galleggiare nella superficie dell'acqua, mentre per esempio il PVC e PET, avendo una densità superiore, pari a  $1,3 - 1,7 \text{ g/cm}^3$ , tendono a sedimentare piuttosto che a restare sospesi nelle acque superficiali (Koelmans *et al.*, 2019).

Le particelle immerse possono però subire un aumento della loro densità, con conseguente diminuzione della capacità di galleggiamento a causa di diversi fenomeni come il biofouling e la formazione di aggregati.

Il biofouling è l'acquisizione di un film microbico sulla superficie delle particelle che viene favorito dalla presenza di gruppi funzionali idrofobici sulle MPs (Miao *et al.*, 2019).

L'aggregazione delle particelle plastiche è favorita dalle alte concentrazioni di altro particolato sospeso negli ambienti acquatici ma anche dalle stesse proprietà delle MPs (Wang *et al.*, 2021). Infatti, le piccole dimensioni delle particelle ne diminuiscono la stabilità e facilitano processi di aggregazione tra le stesse (Li *et al.*, 2022).

Anche diversi meccanismi di degradazione delle MPs, modificando i gruppi funzionali e le cariche superficiali, influenzano l'aggregazione.

Anche la forma delle particelle influenza il tasso di sedimentazione; frammenti e sfere sono più prone a sedimentare rispetto alle fibre e ai film che restano sospese per periodi più lunghi.

La disposizione delle MPs appena descritta può subire alterazioni a causa dei moti ondosi ed dei forti venti che potenzialmente sono in grado di indurre una miscelazione verticale dell'intera colonna d'acqua, risospesando la plastica dal fondale (Chinfak *et al.*, 2021).

### **2.2.2 Degradazione delle microplastiche**

Una volta nell'ambiente le microplastiche subiscono modificazioni chimiche, fisiche e biologiche che ne causano la degradazione (Fig.8).

La degradazione polimerica è un processo chimico attraverso il quale la struttura e le proprietà del polimero vengono alterate. Tale processo è diverso per ogni polimero poiché intrinsecamente correlato alla particolare struttura chimica dello stesso (Mofijur *et al.*, 2021).

Più specificatamente la degradazione è associata al fatto che i polimeri contengono dei punti più deboli che possono essere intaccati come gruppi carbonilici e gruppi idrossilici alla fine della catena, doppi legami o la presenza di ramificazioni.

Sebbene convenzionalmente i materiali plastici siano resistenti alla degradazione, tant'è vero che la loro persistenza ambientale è stimata in centinaia o addirittura migliaia di anni, diversi processi biotici o abiotici, anche se molto lentamente, ne provocano la frammentazione, modificazioni della morfologia della loro superficie come l'aumento della rugosità, ma anche cambiamenti nella composizione chimica tra cui l'incremento di gruppi funzionali contenenti ossigeno che alterano la polarità, la carica e l'idrofilicità della superficie della particella (Luo *et al.*, 2022).

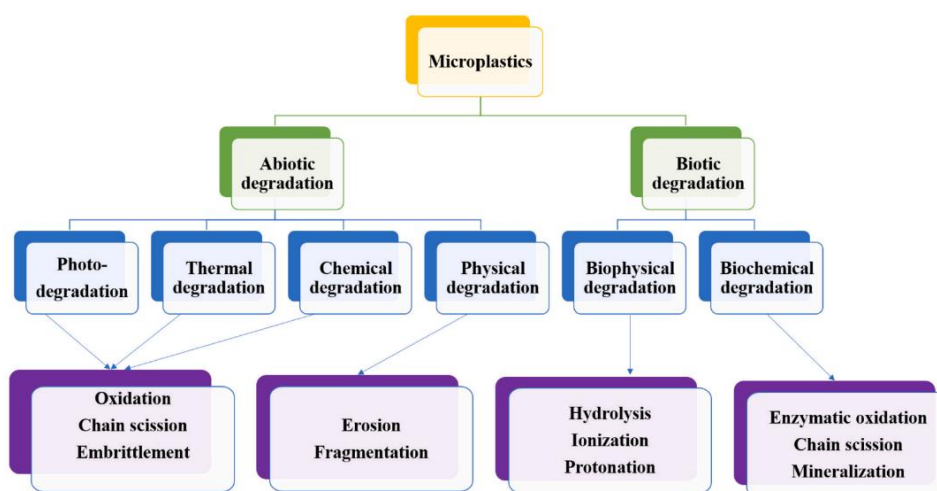


Fig.8: Schematizzazione dei principali processi coinvolti nella degradazione delle microplastiche (Luo *et al.*, 2022)

Di seguito vengono descritti le principali vie di degradazione che comportano la formazione di microplastiche:

- Fotodegradazione:** Durante il processo di fotodegradazione i gruppi cromofori fotosensibili presenti lungo la catena polimerica possono assorbire la luce, tipicamente radiazioni UV ad alta energia con lunghezze d'onda comprese tra i 290 e i 440 nm, che induce la formazione di radicali liberi che a loro volta innescano la scissione dei legami C-C e C-H presenti nelle MPs (Duan *et al.*, 2021). L'azione dei raggi UV è inoltre condizionata sia dal grado di cristallinità del polimero, che può limitarne la capacità di penetrazione, sia dalla presenza di additivi che agiscono o assorbendo loro stessi la radiazione o interagendo con il polimero foto-eccitato assorbendone l'energia prima che si innescino reazioni sulla catena polimerica (Sánchez-Solís *et al.*, 1996; K.L. *et al.*, 2022). Alcuni esempi di polimeri suscettibili alla fotodegradazione sono il nylon, il polistirene e il polivinilcloruro mentre il polietilene risultata essere resistente a questo tipo di degradazione in accordo con l'assenza di gruppi cromofori; anche se difetti strutturali durante la fabbricazione o la presenza di

impurità possono agire da gruppi fotosensibili innescando comunque il processo (Hu *et al.*, 2022; K.L. *et al.*, 2022).

L'esposizione ai raggi UV provoca la frammentazione delle particelle, alterazioni del colore, cambiamenti morfologici e la riorganizzazione dei gruppi chimici presenti sulla superficie come, per esempio, l'incremento di gruppi carbonilici, di gruppi funzionali contenenti ossigeno che causano un'alterazione delle proprietà chimico-fisiche delle microplastiche come la polarità, l'idrofobicità e la carica superficiale. Inoltre, lo strato ossidato formatosi sulla superficie delle particelle durante la foto ossidazione le rende più soggette ad attacco microbico e può accelerare il tasso di mineralizzazione (K.L. *et al.*, 2022).

- **Degradazione termica:** La degradazione termica si verifica quando le elevate temperature distruggono i legami C-C e provocano la formazione di radicali liberi, proprio come avveniva nel caso della fotodegradazione.  
La temperatura richiesta varia in base alle proprietà termiche del polimero ( $T_m$  e  $T_g$ ) nonché dalla disponibilità di ossigeno (Zhang *et al.*, 2021). Nell'ambiente è probabile che si verifichi una lenta ossidazione termica in concomitanza con la fotodegradazione nei luoghi maggiormente esposti alle radiazioni solari. Inoltre, è stato riscontrato che in presenza di un ambiente umido l'energia di attivazione richiesta per il deterioramento indotto dalla temperatura si riduce.
- **Degradazione meccanica:** La frammentazione meccanica si origina a causa di forze esterne nell'ambiente tra cui il vento, le maree, l'abrasione con le rocce e fenomeni di congelamento e scongelamento.  
Essa determina l'indebolimento e la perdita della stabilità meccanica dei polimeri. L'entità dell'effetto determinato dalle forze esterne varia in base alle proprietà meccaniche intrinseche di ciascun materiale plastico. La degradazione meccanica è particolarmente importante quando si parla di rilascio di fibre microplastiche durante il lavaggio degli indumenti.
- **Degradazione chimica:** La degradazione per via chimica avviene attraverso reazioni di idrolisi o di ossidazione. Le reazioni di idrolisi sono caratteristiche delle plastiche che al loro interno contengono legami covalenti idrolizzabili come il gruppo amminico, etereo, carbammico e sono influenzate da diversi fattori quali la temperatura ed il pH. Per esempio, alte concentrazioni di ioni  $H^+$  o  $OH^-$  nell'ambiente acquatico catalizzano la degradazione di plastiche suscettibili all'idrolisi come le poliammidi.
- **Biodegradazione:** Quando le particelle entrano nell'ambiente alcuni organismi come funghi, batteri o alghe, possono formare un biofilm sulla loro superficie che determina un cambiamento significativo delle proprietà chimico-fisiche come il peso molecolare, la forza alla trazione, la cristallinità, l'idrofilicità e la morfologia della superficie.  
La presenza del biofilm può inoltre aumentare la capacità di assorbimento di contaminanti presenti nell'ambiente da parte delle microplastiche ed influenzarne la biodisponibilità.

I batteri o i funghi colonizzatori rilasciano enzimi extracellulari (lipasi, ossigenasi, esterasi) che alterano la struttura molecolare depolimerizzando il materiale per produrre oligomeri, dimeri e monomeri che possono essere successivamente metabolizzati dagli organismi stessi per formare come prodotti finali acqua ed anidride carbonica in condizioni aerobiche, metano ed anidride carbonica in condizioni anaerobiche (Liu *et al.*, 2022). Tale percorso è generalmente favorito in polimeri idrolizzabili (PA, PET, PUR), rispetto al PVC, PP o al PE che non lo sono, poiché possono essere intaccati da enzimi extracellulari come l'idrolasi che sono già coinvolte nella degradazione di macromolecole naturali come la lignina o le proteine (Zhang *et al.*, 2021).

Le caratteristiche ambientali che influenzano la degradazione nell'ambiente marino includono la salinità, il pH, la quantità di O<sub>2</sub> presente, la temperatura e la torbidità dell'acqua.

### **2.2.3 Le microplastiche come vettori di contaminanti nell'ambiente**

Le microplastiche possono fungere da vettore per il trasporto, l'assorbimento e l'accumulo di contaminanti nei diversi ecosistemi (Bridson *et al.*, 2021).

Siccome le microplastiche possono essere ingerite o decomposte dal biota, queste sostanze tossiche possono essere rilasciate nel loro organismo e successivamente essere trasferite lungo la catena alimentare minacciando infine anche l'uomo.

Le microplastiche vengono associate a due tipologie di inquinanti: le sostanze contaminanti già presenti nell'ambiente, che vengono adsorbite sulla superficie delle particelle plastiche come gli inquinanti organici persistenti (POPs) e i contaminanti organici idrofobi (HOC) e le sostanze che vengono deliberatamente aggiunte durante il processo di fabbricazione della plastica stessa, ovvero gli additivi, che possono essere rilasciate durante la permanenza ambientale delle microplastiche.

Il meccanismo di adsorbimento è influenzato sia da fattori ambientali come la salinità, il pH e la temperatura che dalle specifiche interazioni che si creano tra la superficie delle microplastiche e le molecole organiche quali interazioni idrofobiche, elettrostatiche ed interazioni  $\pi$ - $\pi$  (Santana-Viera *et al.*, 2021).

Inquinanti organici persistenti come il PCB e il DDE si accumulano nelle microplastiche con concentrazioni 10<sup>6</sup> volte maggiori rispetto all'ambiente circostante (Mato *et al.*, 2001).

Gli stessi processi di deterioramento che le microplastiche sperimentano nell'ambiente possono incrementare la loro capacità di adsorbimento in quanto modificano le loro proprietà superficiali come la carica, la polarità o l'area superficiale.

Il processo di diffusione all'interno del polimero è descritto dalla legge di Fick ed è controllato dal gradiente di concentrazione e dal coefficiente di diffusione per il sistema polimero-additivo.

In questo caso particolare il coefficiente di diffusione dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'additivo come le dimensioni, il peso molecolare, la concentrazione e dalle



interazioni con la matrice polimerica. In ambiente acquoso la ripartizione tra la fase liquida e solida è controllata anche dalla solubilità dell'additivo nel mezzo (Bridson *et al.*, 2021). Tra le proprietà del materiale plastico che influenzano il processo di diffusione degli additivi troviamo anche la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), ovvero la temperatura al di sotto della quale la frazione amorfa presente nel polimero si comporta da solido vetroso e viceversa al di sopra della quale assume un comportamento più flessibile. Essendo che gli additivi possono occupare solamente la frazione amorfa la loro diffusione attraverso il polimero aumenta quando il materiale plastico si trova al di sopra della  $T_g$ . A temperature ambiente polimeri quali il PVC ed il PS sono al di sotto della loro  $T_g$  mentre PP e PE al di sopra (Andrade *et al.*, 2021).

In aggiunta la temperatura, il pH, le radiazioni UV oltre che a rappresentare i fattori chiave per cui un polimero si degrada governano anche il fenomeno del leaching degli additivi dalle microplastiche.

Elevate temperature o stress fisici che causano la frammentazione dei polimeri plastici possono aumentare il meccanismo di rilascio anche in relazione al fatto che gli additivi non sono direttamente legati ai polimeri attraverso legami chimici.

Gli additivi sono delle sostanze chimiche che vengono intenzionalmente miscelate ai polimeri durante il loro processo produttivo per conferire al materiale delle particolari proprietà chimiche o fisiche e per aumentarne il tempo di vita incrementando la resistenza del materiale rispetto all'esposizione al calore, ai raggi UV, all'umidità, ecc (Fig. 9).

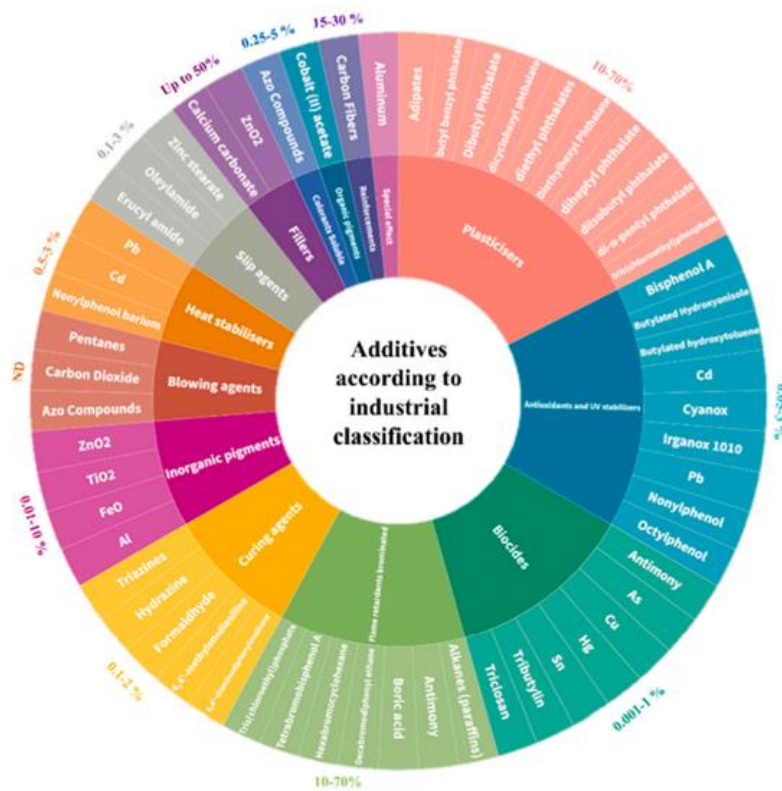


Fig.9: I principali additivi nelle materie plastiche (Sendra *et al.*, 2021)

Come riportato nell'immagine sovrastante, esistono diverse tipologie di additivi. Le famiglie principali sono i protettori della superficie (agenti antistatici, antifrizione), i protettori del materiale (antiossidanti, stabilizzanti termici), miglioratori delle proprietà chimico fisiche (ritardanti di fiamma), agenti funzionalizzanti (coloranti) e gli additivi per la processabilità (lubrificanti, plasticizzanti, agenti espandenti).

Alcuni esempi di additivi sono:

- **Plastificanti:** aumentano la fluidità della plastica durante la lavorazione e la flessibilità a temperatura ambiente. Presenti con una percentuale dal 10% al 70%. Sono un esempio gli ftalati o le paraffine cloridrate. Vengono utilizzati soprattutto nel PVC.
- **Ritardanti di fiamma:** organobromuri che proteggono il materiale durante gli incendi.
- **Stabilizzatori della luce:** impediscono l'ossidazione causata dalla luce durante la vita del prodotto plastico.
- **Coloranti:** sostanze organiche o inorganiche che conferiscono al polimero il colore desiderato

La frazione di additivi presenti nella matrice polimerica può variare, per esempio negli antiossidanti e nei fotostabilizzanti è pari al 0,1-3%, nei ritardanti di fiamma 25% e nei plasticizzanti più del 70%.

Diversi studi condotti su un ampio range di organismi come batteri, artropodi e vertebrati hanno dimostrato l'ecotossicità di alcune tra le sostanze comunemente utilizzate come additivi osservando effetti quali la cancerogenità, la mutagenicità, stress ossidativo e la loro azione come distruttori endocrini.

Per tale ragione l'ECHA caratterizza l'utilizzo degli additivi ed il loro potenziale rilascio dai materiali plastici in modo da garantire la sicurezza di tali sostanze chimiche prima del loro utilizzo, soprattutto in ambito alimentare.

### 2.3 Le nanoplastiche

In seguito al grande interesse che la comunità scientifica ha rivolto nei confronti delle microplastiche è stato sollevato un nuovo problema ambientale ad esse correlato ovvero quello delle nanoplastiche.

Sebbene la definizione specifica di nanoplastiche sia ancora in discussione, è comune utilizzare questo termine per riferirsi a particelle plastiche di dimensioni comprese fra i 1000 nm e 1 nm, anche se molti studiosi fissano il limite superiore a 100 nm.

Tipicamente queste nanoparticelle si originano dalla frammentazione delle microplastiche quando sottoposte ai diversi stress ambientali. Durante questo processo il numero delle particelle totali e l'area superficiale aumentano mentre la massa della singola particella diminuisce.

Pertanto, una delle grandi questioni che ci si sta ponendo è se le nanoplastiche siano semplicemente delle microplastiche più piccole o se il loro range dimensionale impartisca alle stesse particolari proprietà proprio come accade per i nanomateriali.

Tale fatto è di elevata importanza in quanto potrebbe influenzare il destino ambientale delle nanoplastiche, le loro interazioni con il biota ma anche l'approccio analitico da applicare per un'efficiente identificazione e quantificazione.

Dai primi studi sulle nanoplastiche sono emerse delle caratteristiche che le distinguono dalle microplastiche.

In primo luogo, le NPs nell'ambiente hanno una particolare inclinazione a formare degli eteroaggregati sia con sostanze naturali che di origine antropogenica che influiscono direttamente sulle proprietà di dispersione delle nanoplastiche in quanto gli aggregati sedimentano mentre le NPS disperse possono diffondersi ed essere più biodisponibili (Gonçalves and Bebianno, 2021).

La predisposizione a formare degli aggregati dipende anche dalla forza ionica.

(Gigault *et al.*, 2018) hanno dimostrato che particelle nanometriche di polistirene in una soluzione acquosa contenente 500 mmol/L di cloruro di sodio si aggregano irreversibilmente mentre in una soluzione contenente 350 mmol/L di NaCl sono stabili.

I meccanismi di sedimentazione e galleggiamento per la scala nano sono governate dal moto browniano caratterizzato dal movimento casuale delle particelle in un mezzo di sospensione.

Le nanoparticelle, infatti, in ambiente acquoso possono collidere con le molecole d'acqua o con le specie ioniche presenti che ne impediscono la sedimentazione anche se sono costituite da un polimero ad elevata densità come il polivinilcloruro.

La diminuzione delle dimensioni delle particelle plastiche è correlata ad un aumento della loro reattività biologica (Gonçalves *et al.*, 2021).

A causa delle piccole dimensioni, infatti, le NPs riescono ad eludere i sistemi di difesa biologica degli organismi perché vengono erroneamente identificate come molecole fisiologiche. In questo modo riescono ad attraversare le membrane cellulari per diffusione passiva ed endocitosi (Cai *et al.*, 2021a).

Una volta penetrate nell'organismo le nanoplastiche possono essere traslocate nelle varie parti del corpo, per esempio, particelle < 1 µm hanno una maggiore tendenza a trovarsi nel

sistema linfatico o di entrare nel flusso sanguigno, dove potranno poi verificarsi diversi eventi biochimici.

(Kihara *et al.*, 2021) hanno osservato in cellule epiteliali umane in vitro e organismi quali il danio zebbrato che l'elevata area superficiale delle NPs causa una eccessiva generazione di specie ossigeno reattive ( $H_2O_2$ , idroperossido lipidico, perossinitrito) che possono recare danni al DNA, alle proteine o alle membrane cellulari.

Dobbiamo però considerare che tutti gli studi relativi alla tossicità di queste particelle sul biota o sull'uomo sono ancora troppo scarsi per una accurata valutazione del rischio.

Attualmente non esistono delle procedure standardizzate per l'identificazione e la quantificazione delle nanoplastiche nelle diverse matrici; anche perché i metodi analitici tipicamente impiegati nello studio delle microplastiche non possono essere direttamente applicate alle NPs a causa delle limitazioni dovute alle loro piccole dimensioni e alla concentrazione ridotta.

Quindi per esempio le tecniche di estrazione e purificazione del campione adottate per le MPs potrebbero essere utilizzate inserendo però un metodo di pre-concentrazione in modo da avere un rapporto particelle su massa sufficiente per svolgere le successive analisi (Mitrano *et al.*, 2021)

Infine, sebbene le particelle di piccole dimensioni vengano tipicamente identificate utilizzando la microscopia FT-IR, tale tecnica non può essere applicata nel caso delle nanoparticelle a causa del limite di diffrazione del microscopio ottico ( $0,3 \mu m$ ) e dal fatto che più le particelle sono piccole più lo strumento deve avere un'elevata risoluzione.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Area di ricerca e modalità di campionamento

##### 3.1.1 La laguna di Venezia

La laguna di Venezia (Fig. 10) è un vasto ambiente di transizione collocato nella costa nord del mare Adriatico che presenta una morfologia eterogenea caratterizzata da un dedalo di canali, che possono arrivare ad una profondità massima superiore ai 15 metri se si considerano i canali di navigazione, che attraversano una vasta area di fondali bassi con una profondità media pari a 1 metro (Rova *et al.*, 2015).

Essa ospita una grande varietà di habitat sia terrestri che acquatici come isole, paludi, saline, piane di marea su cui si affacciano due centri urbani principali ovvero Chioggia (49.735 abitanti) e Venezia (56.000 abitanti) (Vianello *et al.*, 2013).

La laguna copre un'area di circa 550 km<sup>2</sup> di cui 390 km<sup>2</sup> costituiti da laguna aperta della quale 70 km<sup>2</sup> sono saline, 40 km<sup>2</sup> canali di marea e 90 km<sup>2</sup> allevamenti ittici (Madricardo *et al.*, 2019).

Tre bocche di porto collegano la laguna al mare aperto e sono rispettivamente da nord a sud, Lido, Malamocco e Chioggia; attraverso queste insenature la laguna scambia 385 · 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> di acqua al giorno, il che consente un rinnovo di circa il 60% dell'acqua lagunare ogni 12 ore (Caliceti *et al.*, 2002).

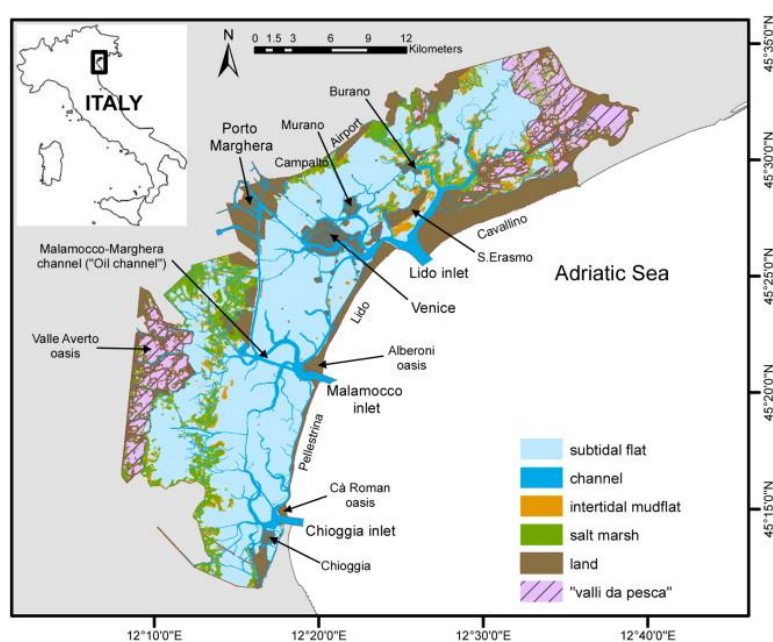


Fig.10: La laguna di Venezia (Rova *et al.*, 2015)

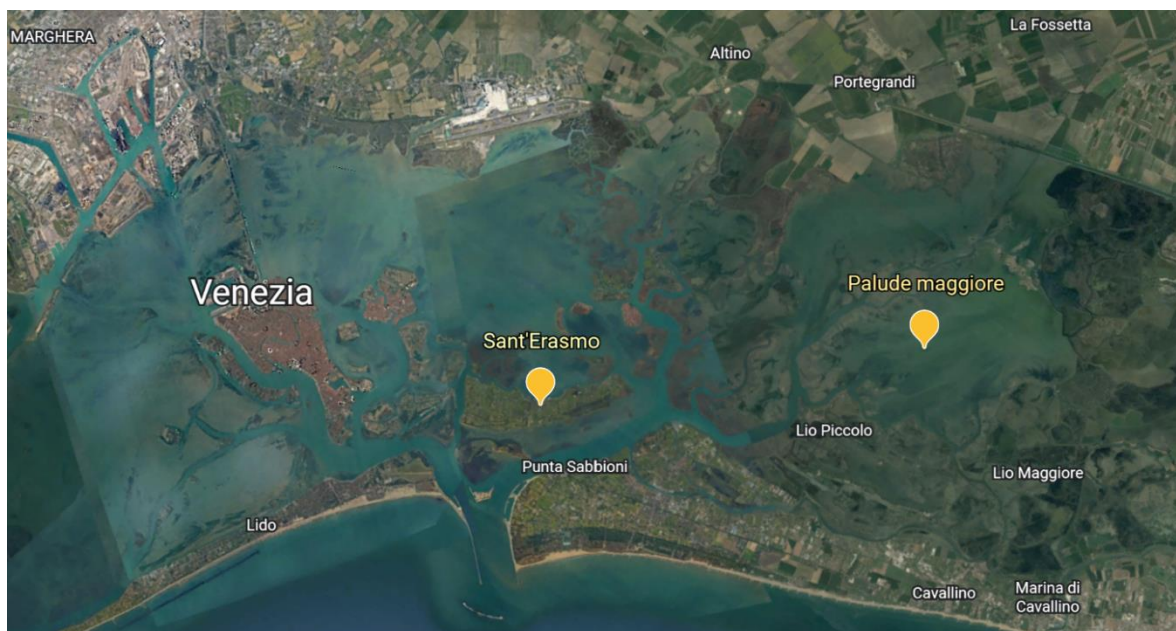
La laguna può essere suddivisa in tre bacini principali: quello meridionale caratterizzato da grandi canali adibiti alla navigazione, quello centrale nel quale è presente la città di Venezia ed infine quello settentrionale.

Diversi interventi antropici nel corso degli anni hanno modificato la morfologia della laguna come, per esempio, la deviazione dei principali corsi d'acqua che sfociavano in laguna ovvero il Brenta e il Piave che trasportando elevate quantità di sedimenti compromettevano la funzione dei canali (Rova *et al.*, 2015).

La complessità della laguna è ulteriormente accresciuta a causa delle attività economiche che si svolgono. Il distretto industriale di Porto Marghera per esempio ha influenzato negativamente le condizioni ambientali lagunari, così come la presenza di cittadine come Marghera, Mestre e il centro storico di Venezia che solo recentemente sono stati collegati agli impianti di depurazione (Caliceti *et al.*, 2002).

Un altro fenomeno da considerare è l'overtourism. La città di Venezia ha infatti registrato circa 5,5 milioni di arrivi nel 2019 ma solo 53 mila vivono effettivamente nel centro storico. Questo grande afflusso di persone provoca inevitabilmente emissione di rifiuti solidi tra cui materiale plastico e scarichi fognari (Cecchi, 2021).

### 3.1.2 Siti di campionamento



*Fig.11: Siti di campionamento nella laguna di venezia: Sant'Erasmus e Palude Maggiore*

I campioni di acqua lagunare sono stati prelevati in sei stazioni diverse distribuite lungo la laguna in diversi intervalli di tempo: autunno-inverno 2019 ed estate 2020.

In modo particolare in questo lavoro di tesi si esamineranno nel dettaglio i campioni di acqua derivanti da due siti differenti, Sant'Erasmus e Palude Maggiore, relativi ai due periodi di campionamento (Fig.11).

Sant'Erasmus ( $45^{\circ}28' 22.12''N$ ,  $12^{\circ}25'42.45''E$ ) è l'isola più vasta del bacino settentrionale della laguna, con una superficie di  $3,26 \text{ km}^2$ .

È situata verso al mare in prossimità di insenature che presentano un'elevata dinamica. Sull'isola è presente un piccolo centro abitato, 598 abitanti, anche se la maggior parte della superficie è adibita a scopi agricoli grazie alla presenza di terreni argillosi molto fertili.

Palude Maggiore (45°30' 07"N, 12°29'07"E) zona paludosa caratterizzata da bassa profondità delle acque collocata della parte nord della laguna. Essendo una valle aperta il regime idraulico naturale può esprimersi senza ostacoli di alcun tipo; per tale ragione tale area può fornire informazioni utili per avere una panoramica dell'area lagunare.

### 3.1.3 Metodi di campionamento

Allo stato attuale non esistono metodi standardizzati per il campionamento delle microplastiche in acqua (Karlsson *et al.*, 2020), certamente però esso deve essere eseguito in modo da considerare l'eterogeneità dimensionale che le contraddistingue.

Inoltre, in relazione al fatto che le MPs presentano dimensioni, densità relativa e peso ridotte esse tendono ad accumularsi preferibilmente nello strato superficiale della colonna d'acqua; per tale ragione i campioni di acqua lagunare sono stati prelevati a 30 cm al di sotto della superficie dell'acqua mediante bottiglie di acciaio (capacità 20L), precedentemente decontaminate, in condizioni di mare calmo al fine di minimizzare fenomeni di rimescolamento dovuti al moto ondoso.

Le bottiglie di acciaio sono state preferite rispetto ai classici metodi di campionamento che prevedono l'utilizzo di una rete di tipo manta, caratterizzata da una maglia di rete di 330 µm, in modo da non perdere la frazione di particelle di dimensioni più piccole, essendo infatti le small microplastics (<100 µm) l'oggetto di studio di questo lavoro di tesi.

Una volta arrivati in laboratorio i campioni sono stati trasferiti in bottiglie di vetro ambrato decontaminate, con una capacità di 2,5 L, ad ognuno dei quali sono stati aggiunti 50 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per degradare la parte organica.

A questo punto i campioni sono stati conservati a 4° fino al pretrattamento.

### 3.2 Reagenti

- *Contrad 2000* (DeconLaboratories Limited, UK)
- Acqua ultrapura (UW; Elga Lab Water, Veolia, High Wycombe, UK)
- Acetone (for HPLC, ≥99.9%, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt Germany)
- Etanolo (absolute, for HPLC, ≥99.8%, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt Germany)
- Metanolo (for HPLC, ≥99,9%, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt Germany)
- Olio di semi di girasole (Crudolio biologico estratto a freddo)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (ACS reagent, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany)
- esano (puriss. ≥99% (GC), Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany)

### 3.3 Metodo di estrazione e purificazione per l'analisi delle acque lagunari

Tutte le procedure preanalitiche sono state effettuate all'interno di una *Clean Room* ISO 7 per organici, quindi interamente costituita da acciaio, che permette il controllo della contaminazione tramite il monitoraggio delle particelle sospese e superficiali. La camera risulta essere plastic-free, anche per quanto riguarda il sistema di filtrazione.

Per scongiurare ulteriormente contaminazioni sono stati utilizzati camici da laboratorio in cotone, guanti in nitrile ed utensili in acciaio.

La vetreria e gli utensili prima di ogni utilizzo sono stati lavati con una soluzione al 2% di *Contrad 2000* quindi risciacquati diverse volte con acqua ultrapura e acetone.

Infine, la vetreria viene decontaminata con una miscela etanolo-metanolo in rapporto 7:3. Per l'estrazione delle SMPs e dei vari componenti del microlitter (additivi, plastificanti, fibre sintetiche naturali e non plastiche) è stato utilizzato il metodo dell'oleo-estrazione (Corami et al., 2021).

Il campione di acqua lagunare viene dapprima agitato in modo da omogeneizzarlo.

Quindi, un'aliquota di 200 mL viene prelevata e posta in un imbuto separatore da 500 mL assieme a 200 mL di acqua ultrapura per diminuirne la salinità ed evitare interferenze spettrali durante l'analisi, 5 mL di olio di semi di girasole, utilizzato per favorire l'estrazione delle SMPs presenti sfruttandone la lipofilità e 5 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per promuovere l'eliminazione del particolato organico senza favorire fenomeni di denaturazione e/o degradazione dei polimeri.

L'imbuto separatore è stato agitato e lasciato riposare per 3 ore in modo da permettere la separazione di fase.

Trascorso tale tempo, la fase acquosa è stata trasferita in un secondo imbuto separatore, precedentemente decontaminato, dove è stata ripetuta la procedura di oleo-estrazione aggiungendo ancora 5 mL di olio e 5 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le due fasi oleose ottenute dalle due estrazioni sono state recuperate ciascuna con 20 mL di esano e 20 mL di etanolo all'interno di una beuta di Erlenmeyer.

Ciascun campione è stato estratto in triplicato.

### 3.4 Procedura di filtrazione e purificazione

A questo punto si procede con la filtrazione dell'estratto oleoso su filtri in ossido di alluminio Anodisc (*Anopore Inorganic Membrane*, 0,2 µm, 47 mm Whatman™) servendosi di un sistema di filtrazione in vetro sottovuoto Laboport®.

Ciascun filtro viene inizialmente purificato con 50 ml di una soluzione etanolo-metanolo in rapporto 7:3.

Durante la filtrazione l'estratto oleoso è stato versato in più aliquote alternando per la purificazione la soluzione alcolica e 10 mL di esano necessario per fluidificare l'olio ed evitare che questo aderisca al filtro.

Infine, il filtro viene risciacquato più volte con etanolo puro e la soluzione etanolo-metanolo in rapporto 7:3 v/v.



I filtri così ottenuti vengono conservati in capsule Petri, precedentemente decontaminate, e lasciati ad asciugare per 72 ore sotto cappa aspirante. Dopo di che le capsule vengono rivestite con fogli di alluminio e conservate in *clean room* a temperatura ambiente fino al giorno dell'analisi strumentale effettuata mediante Micro-FTIR Nicolet iN10 (ThermoFischer Scientific) presso il laboratorio CNR-ISP di Venezia.

Per valutare con certezza che non ci siano state delle contaminazioni durante le procedure preanalitiche sono stati effettuati i bianchi procedurali e dei reagenti (perossido di idrogeno, metanolo, etanolo e acqua ultrapura).

## 3.5 Strumentazione

### 3.5.1 Spettroscopia IR

La spettroscopia infrarossa è una tecnica spettroscopica di assorbimento che si basa sull'interazione della radiazione infrarossa con la materia.

Questa tecnica viene largamente impiegata per l'identificazione e la quantificazione di composti organici o inorganici allo stato solido, liquido o gassoso.

Con radiazione infrarossa si intende quella zona dello spettro elettromagnetico compresa tra la regione del visibile e quella delle microonde. Essa può essere ulteriormente suddivisa in tre zone:

IR vicino (NIR) →  $13.000 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$

IR medio (MIR) →  $4.000 - 200 \text{ cm}^{-1}$

IR lontano (FIR) →  $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$

La zona di maggiore interesse analitico è quella compresa tra i  $4000$  e i  $400 \text{ cm}^{-1}$ , in quanto le transizioni vibrazionali di molecole e cristalli cadono in questo range, fornendo quindi importanti informazioni sull'identità delle strutture molecolari sotto esame.

L'energia fornita dalla radiazione infrarossa viene quindi assorbita dalle molecole sotto forma di transizioni vibrazionali.

Generalmente possiamo affermare che una molecola poliatomiche, costituita da  $N$  atomi, possiede  $3N$  gradi di libertà totali. Tale valore è comprensivo di tutti i movimenti della molecola: traslazioni, rotazioni e vibrazioni.

Di questi  $3N$  gradi di libertà, 3 vengono utilizzati per la descrizione del moto traslazionale (moto del baricentro), mentre si useranno 2 gradi di libertà nel caso di una molecola lineare oppure 3 nel caso in cui la molecola non sia lineare, per descrivere il moto rotazionale.

Quindi, escludendo i gradi di libertà utilizzati per la descrizione di questi due moti, ne restano  $(3N-6)$  o  $(3N-5)$  per descrivere le vibrazioni molecolari.

Il moto vibrazionale di una molecola risulta essere molto complesso in quanto coinvolge lo spostamento di tutti gli atomi, ma esso può essere scomposto in  $3N-6$  modi normali indipendenti tra loro, la cui sovrapposizione costituirà il moto reale di vibrazione della molecola.

In un modo normale tutti i nuclei si muovono con la stessa frequenza, stessa fase ma con ampiezza diversa. Esso può essere visto come la misura della partecipazione di ciascun atomo al moto.

I modi normali vibrazionali che coinvolgono due atomi possono essere di due tipi:

- *Stretching*: quando si ha uno stiramento lungo l'asse di legame con aumento e diminuzione della distanza interatomica.

- *Bending*: quando si ha una variazione dell'angolo di legame rispetto all'asse nella posizione di equilibrio. Generalmente richiede meno energia dello stretching e si verifica quindi a  $\lambda$  maggiori (e frequenze minori).

Quando invece, come nella maggior parte dei casi, il sistema in esame è composto da più di due atomi, si hanno modi vibrazionali complessi e riconducibili a combinazioni dei due precedentemente citati. Possiamo avere ad esempio delle deformazioni nel piano (Scissoring – Rocking) oppure fuori dal piano (Wagging – Twisting) (Fig. 12).

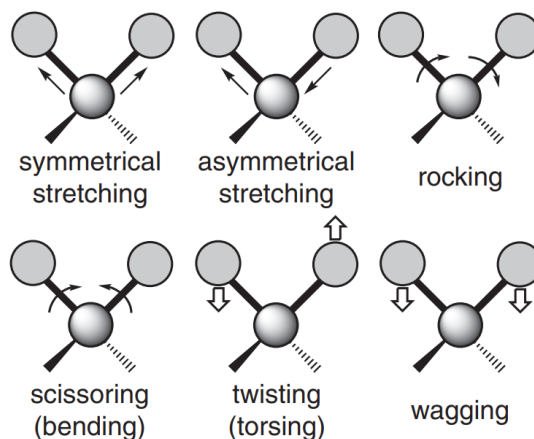


Fig.12: Modi normali vibrazionali (Blum and John, 2012)

Una molecola può dare assorbimento solo quando la frequenza della radiazione IR incidente è equivalente ad una sua transizione vibrazionale, cioè quando siamo in condizioni di risonanza.

Inoltre, secondo la regola di selezione generale, solo i modi normali che corrispondono ad una variazione del momento di dipolo elettrico possono dare fenomeni di assorbimento ed essere quindi IR attivi. In aggiunta per la regola di selezione specifica, una transizione può avvenire solo se si ha una variazione di una unità del numero quantico vibrazionale  $\Delta v = \pm 1$ , ovvero essa avviene tra livelli contigui.

Lo spettro infrarosso si presenta come un insieme di bande di assorbimento registrate in funzione del numero d'onda.

Lo spettro di un campione in fase gassosa risulterà molto più complesso rispetto allo spettro di un campione in fase liquida o solida, in quanto le bande sono prodotte da transizioni vibro-rotazionali.

In generale ciascuna banda è caratterizzata da:

- *Posizione*: La posizione di una banda viene indicata più frequentemente in numero d'onda  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) e più raramente con la sua  $\lambda_{\max}$  ( $\mu\text{m}$ ). La frequenza della vibrazione è direttamente proporzionale alla forza del legame. Più il legame è rigido, maggiore sarà l'energia richiesta per la vibrazione.

- *Intensità*: Esprime la quantità di fotoni assorbita per una data frequenza. L'intensità di una transizione è proporzionale al quadrato del momento della transizione quindi all'aumentare dell'entità del momento di dipolo durante la transizione aumenterà l'intensità della banda. Infine, essa risulta essere dipendente anche dalla popolazione del livello iniziale da cui parte la transizione.

L'intensità viene generalmente espressa in percentuale di radiazione trasmessa dal campione, cioè in termini di percentuale di trasmittanza (%T), oppure in termini di assorbanza (A), secondo l'espressione  $A = \log \frac{1}{T}$ . L'assorbanza, inoltre, risulta essere collegata alla concentrazione del campione tramite la legge di Lambert-Beer:  $A = \epsilon lc$ . Dove,  $\epsilon$  = Coefficiente di Estinzione Molare,  $l$  = Cammino ottico e  $c$  = Concentrazione. Le bande di assorbimento IR sono classificate come Strong (s), Medium (m) e Weak (w) in funzione delle loro intensità relative nello spettro infrarosso. Possono inoltre avere diverse forme in funzione del gruppo funzionale considerato e del suo intorno. Possono essere strette (sharp), larghe (broad), a spalla, ecc. In una molecola complessa le vibrazioni, descritte dai modi normali, corrispondono alla vibrazione simultanea di molti atomi. Siccome non tutti gli atomi si spostano con la stessa ampiezza, gli spostamenti più rilevanti sono dominati da un gruppo più ristretto di atomi, cioè quelli che si spostano maggiormente. Si parla allora di vibrazioni di gruppo. I valori delle frequenze di gruppo sono abbastanza simili in tutti i composti che contengono tali gruppi e per questo motivo sono un importante strumento per analisi qualitative. Le frequenze di assorbimento infrarosso dei principali gruppi funzionali vengono riportate di seguito (Fig. 13):

Gruppo	Classe di composti	Intervallo (cm <sup>-1</sup> )	Intensità
C-H	Aldeide	2900-2700	w
	Alchino	3300	s
	Alchene	3095-3010	m
		(stretch)	
		700-1000 (bend)	s
	-CH <sub>2</sub>	1465	m
	-CH <sub>3</sub>	1450 (bend)	m
1380 (bend)		m	
Alcano	2965-2850 (stretch)	f	
C-C	Alchino	2260-2100	variabile
	Alchene	1680-1620	variabile
	Alcano	700-1200	w
C=O	Chetone	1715	s
	Estere	1735	s
	Acido carbossilico	1710	s
	Aldeide	1725	s
	Ammide	1650	s
	Anidride	1820-1760	s
C-O	Alcoli, Esteri, eteri, acidi carbossilici	1300-1000	s
O-H	Monomero	3650-3590	variabile
	Legato con legame H	3400-2500	s, allargata
	Acido carbossilico Legato con legame H	3500 (stretch)	m
N-H	Ammina 1°, Ammide	3500 (stretch)	m
	Ammina 2°, Ammide	3500 (stretch)	m
CN	Nitrile	2260-2240	m
C-X	Ioduro	500	s
	Bromuro	600-500	s
	Cloruro	800-600	s
	Fluoruro	1400-1000	m

Fig. 13: frequenze di assorbimento specifiche per ogni gruppo funzionale

Considerando la zona di maggiore interesse organico, cioè il range tra i 4000 e i 400  $\text{cm}^{-1}$ , lo spettro può essere diviso in due zone caratteristiche (Fig. 14):

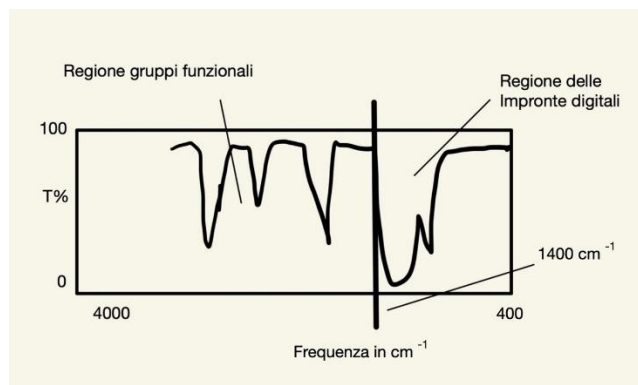


Fig.14: Principali zone di assorbimento che caratterizzano uno spettro IR

Dai 4000 ai 1400  $\text{cm}^{-1}$  troviamo la zona dei gruppi funzionali dove si possono osservare le frequenze di gruppo caratteristiche. Per la maggior parte dei casi si tratta di bande dovute alle vibrazioni di stretching di legami multipli (C=O, C=C, N=N, N=O, ecc.) oppure allo stretching di legami singoli dove è coinvolto l'atomo di idrogeno (N-H, C-H, O-H).

Dai 1400 ai 400  $\text{cm}^{-1}$  troviamo invece la *zona delle impronte digitali (fingerprint)*, caratterizzata da vibrazioni complesse che dipendono dall'intero scheletro della molecola, dove i modi sono fortemente accoppiati tra loro.

In questa zona le bande sono dovute sia a vibrazioni di bending di gruppi di atomi che a vibrazioni di stretching di legami singoli, escluso il legame C-H.

Tale zona risulta essere caratteristica di ogni molecola.

In spettroscopia vibrazionale ci sono due tipologie di strumenti:

- Spettrofotometri a dispersione
- Spettrofotometri a interferenza o a trasformata di Fourier (FT-IR)

Gli spettrofotometri a dispersione sono presenti sul mercato ormai da molto tempo (Fig. 15).

La radiazione infrarossa viene prodotta da una sorgente ad incandescenza che può essere un filamento di Tungsteno oppure un filamento di Nernst.

Siccome solitamente si lavora a doppio raggio, la radiazione emessa viene suddivisa in due raggi di uguale intensità da un dispositivo chiamato chopper. Uno dei due raggi attraverserà il campione, mentre l'altro il riferimento, che nel caso di soluzioni sarà costituito dal solvente puro. Dopo di che i due fasci vengono nuovamente riuniti.

A questo punto si ha il monocromatore costituito a sua volta da una fenditura per far entrare la luce policromatica che viene successivamente dispersa nelle sue componenti spettrali tramite l'uso di un reticolo di riflessione e quindi rifocalizzata verso la fenditura di uscita (scansione della lunghezza d'onda).

Le varie componenti della radiazione possono essere analizzate istante per istante, secondo le diverse lunghezze d'onda, dal rilevatore.

Il rilevatore utilizzato è di tipo termico, quindi esso si riscalderà in modo proporzionale all'intensità della radiazione.

Il sistema di elaborazione e registrazione infine sarà in grado di convertire la radiazione termica in un segnale elettrico e quindi in un grafico  $T\% / \nu$  (frequenza).

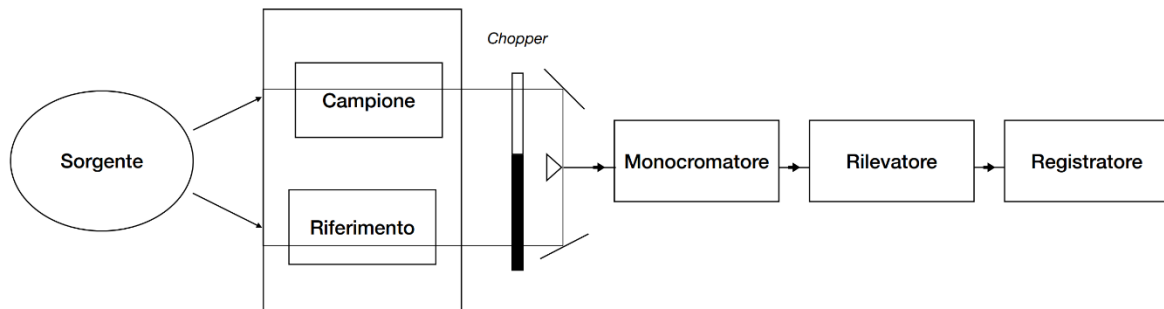


Fig.15: Schema a blocchi spettrofotometro

La spettrofotometria a trasformata di Fourier (FT-IR) si tratta invece di una tecnica di più recente sviluppo grazie al progresso della computerizzazione strumentale (Fig. 16).

Tali strumenti si differenziano rispetto a quelli classici in dispersione per l'uso dell'interferometro di Michelson al posto del monocromatore che permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione infrarossa generata dalla sorgente.

Il raggio emesso dalla sorgente viene inviato ad uno specchio semiriflettente (*beam splitter*), costituito da una lastra di CsBr rivestita da Germanio, che lo suddivide in due fasci. Il primo percorre un cammino ottico fisso per raggiungere uno specchio fisso (*static mirror*), mentre l'altro colpisce uno specchio mobile (*moving mirror*), posto a una distanza variabile, che deve muoversi con una velocità costante in modo che la sua posizione possa essere nota in ogni istante.

I due semiraggi riflessi dagli specchi vengono ricongiunti sul beam splitter.

Anche se i due raggi arrivano congiunti al rilevatore essi hanno compiuto cammini ottici differenti in quanto il cammino ottico del secondo semiraggio è modulato in funzione della variazione della posizione del *moving mirror* rispetto al beam splitter.

Quindi i due raggi possono non essere perfettamente in fase nel momento del ricongiungimento e quindi dare origine al fenomeno dell'interferenza, che può essere costruttiva o distruttiva in base alla differenza tra i cammini ottici.

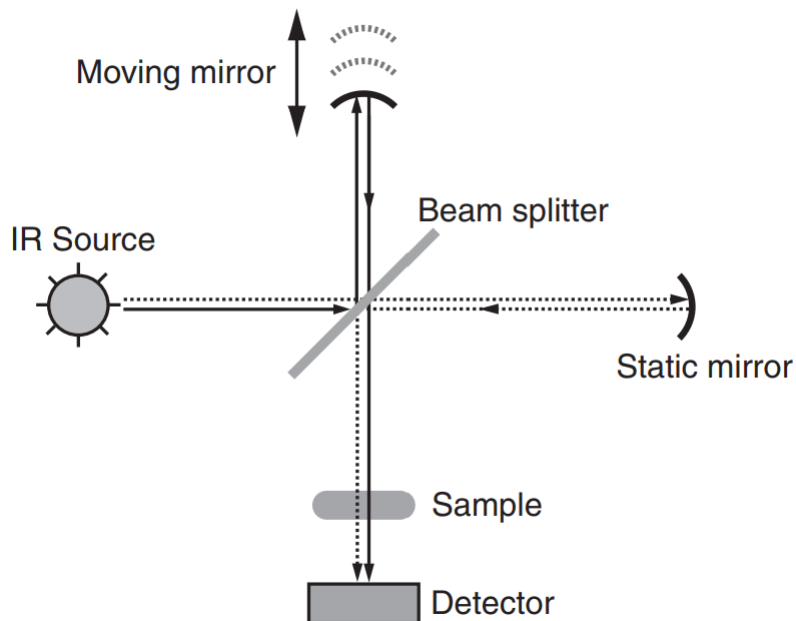


Fig. 16: Schema a blocchi spettrometro FTIR (Blum and John, 2012)

A questo punto il fascio prodotto dall'interferenza attraversa il campione e giunge infine al rilevatore, il quale fornisce l'intensità della luce in arrivo in funzione dello spostamento dello specchio mobile e non rispetto alla lunghezza d'onda.

In questo modo si ottiene un grafico chiamato *interferogramma* che rappresenta dell'intensità del segnale in funzione dello spostamento dello specchio, il quale si può anche descrivere come funzione del tempo.

Successivamente, si effettua la trasformata di Fourier che fornirà lo spettro infrarosso finale dove l'intensità luminosa viene riportata contro il dominio della frequenza (Fig. 17).

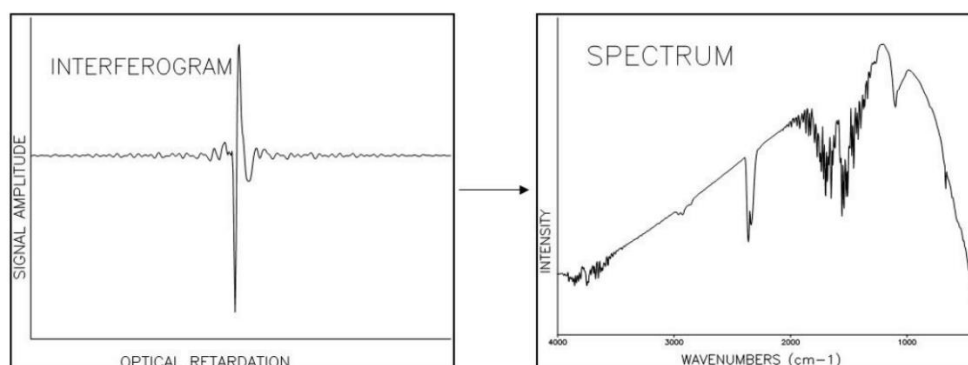


Fig. 17: Passaggio dall'interferogramma allo spettro IR tramite la trasformata di Fourier (Thompson, 2018)

Rispetto ad una tecnica convenzionale, la spettrofotometria in trasformata di Fourier garantisce prestazioni più elevate grazie a:

- Tempi di analisi ridotti in quanto l'acquisizione dello spettro è immediata (pochi secondi) grazie al fatto che la radiazione di tutte le lunghezze d'onda viene registrata contemporaneamente dal rilevatore.
- Assenza di riscaldamento del campione.
- Miglior rapporto segnale rumore in quanto si riesce ad avere una minor perdita di potenza della radiazione emessa dalla sorgente dovuta ad elementi di dispersione e dalla selezione della lunghezza d'onda.
- Elevata precisione dei numeri d'onda grazie alla sovrapposizione del segnale con una radiazione monocromatica generata da una sorgente laser (standard interno) la cui frequenza è nota con precisione.



### 3.5.2 Micro-FTIR

La tecnica Micro-FTIR combina la microscopia ottica con la spettroscopia infrarossa. Grazie allo sviluppo dei detector MTC (Mercurio Cadmio Tellurio), tale tecnica sta riscontrando sempre più interesse in quanto permette la caratterizzazione di composti a partire dai 5-10  $\mu\text{m}$  che risultano troppo piccoli per poter essere analizzati con tecniche FTIR convenzionali.

Può essere inoltre impiegata nello studio di una vasta gamma di materiali, analisi stratigrafiche, campioni complessi organici ed inorganici.

Permette di svolgere analisi in situ non distruttive, senza alterare chimicamente il campione.

La dimensione del raggio è tipicamente compresa tra i 20 e i 100  $\mu\text{m}$  utilizzando una sorgente IR convenzionale ma può essere ridotta a 3-5  $\mu\text{m}$  impiegando una sorgente a sincrotrone (Della Ventura *et al.*, 2010).

Tale tecnica permette di registrare segnali IR con un'elevata risoluzione spaziale.

La risoluzione spaziale è fisicamente limitata a circa 10  $\mu\text{m}$  in quanto influenzata dal limite di diffrazione, dal design ottico (obiettivo e apertura), dal contrasto dell'immagine e dalla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata nell'esperimento (Schymanski *et al.*, 2021).

Unendo i concetti di risoluzione e di contrasto dell'immagine possiamo definire la visibilità, ovvero la capacità di distinguere punti molto vicini spazialmente come componenti separati.

La visibilità è direttamente collegata al rapporto segnale-rumore (SNR) dell'immagine acquisita (image data) e ci permette di capire che oggetti piccoli sono associati a bassi contrasti e quindi per poterli risolvere spazialmente abbiamo bisogno di un maggior numero di fotoni per l'acquisizione di un'immagine in cui risultino ben visibili rispetto allo sfondo (Della Ventura *et al.*, 2010).

La tecnica Micro-FTIR può essere eseguita in tre diverse modalità: trasmissione, riflettanza e riflessione totale interna attenuata (ATR).

La scelta tra queste dipenderà dalla tipologia di substrato scelto per l'analisi.

La modalità in trasmissione possiede un'elevata sensibilità e sfrutta la massima energia IR per acquisire spettri di elevata qualità in brevi tempi.

Il raggio IR emesso dalla sorgente attraversa il campione e successivamente il detector rileva la quantità di luce che viene trasmessa da quest'ultimo.

Per tale motivo, per poter sfruttare al meglio questa tecnica, la preparazione del campione è fondamentale in quanto solo campioni sufficientemente sottili permettono il passaggio di una buona quantità di luce. Particelle troppo spesse o scure non possono essere correttamente identificate in quanto danno assorbimento totale.

In modalità riflettanza, la radiazione IR viene riflessa dalla superficie del campione che deve essere sufficientemente lucida e liscia. Gli spettri registrati hanno una minore qualità spettrale rispetto a quelli in trasmissione in quanto sono presenti degli effetti di light-scattering sulla superficie delle particelle.

Il segnale risultante viene processato con una trasformazione matematica, *Kramers-Kronig transformation*, che si basa sull'indice di rifrazione e sul coefficiente di estinzione molare del campione in modo da spostare le bande in una posizione paragonabile agli spettri ottenuti con la trasmissione.

Praticamente lo spettro complesso in riflettanza viene matematicamente scomposto in due spettri diversi; quello relativo al coefficiente di estinzione, utilizzato per calcolare lo spettro in assorbanza, e lo spettro dell'indice di rifrazione (Lichvár, Liška and Galusek, 2002).

Infine, la modalità in riflessione totale interna sfrutta le proprietà di un'onda evanescente in condizioni di riflessione totale.

Il campione viene posto a stretto contatto con un elemento ottico costituito da un cristallo (IRE, Internal Reflection Element), per esempio in Germanio, scelto in modo da avere un indice di rifrazione maggiore rispetto a quello del campione.

Il raggio IR emesso dalla sorgente dovrà attraversare l'IRE prima di arrivare al campione.

In questa tecnica si lavora in condizioni di riflessione totale che si verificano quando la radiazione passa dal mezzo più rifrangente (IRE) a quello meno rifrangente (campione) con un angolo di incidenza maggiore dell'angolo critico.

In tali condizioni l'onda rifratta scompare e solo la riflessione diventa possibile.

Si genera quindi un'onda superficiale, chiamata onda evanescente, che decade esponenzialmente all'esterno del mezzo più denso.

La capacità di penetrazione è data dalla seguente espressione:

$$d_p = \frac{\lambda}{2 \pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta_i - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}$$

Come si può osservare essa dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione emessa dalla sorgente, dall'angolo di incidenza e dagli indici di rifrazione del campione e del cristallo.

Quindi, all'aumentare della  $\lambda$  aumenta la capacità di penetrazione dell'onda e in questo modo sarà possibile indagare diversi spessori del campione.

Mediamente lo spessore di penetrazione varia tra i 0,5 e i 2  $\mu\text{m}$ .

È possibile definire anche la capacità di penetrazione effettiva per analogia con il cammino ottico della legge di Lambert-Beer come:  $A = -\log(R) = d_{\text{eff}} \epsilon c$

Lo spettro ATR viene ottenuto misurando l'interazione tra campione e onda evanescente.

Se si mette a stretto contatto un cristallo ATR con un materiale che assorbe, l'onda evanescente verrà assorbita dal campione in determinate zone dello spettro IR e di conseguenza si osserverà una diminuzione dell'intensità della radiazione riflessa, successivamente rilevata dal detector.

In aggiunta, l'introduzione dell'elemento ottico porta a spettri IR con un miglior rapporto SNR rispetto all'FTIR (Li *et al.*, 2007).

Ovviamente non essendo una tecnica in trasmissione il campionamento è solo superficiale. Tale tecnica può essere impiegata nel caso di polveri, film di polimeri, liquidi, gel, oppure nel caso di materiali troppo scuri o spessi per essere analizzati tramite trasmissione.

Essa però presenta una bassa sensibilità, circa 3-4 volte in meno della trasmissione.

Ovviamente non essendo una tecnica in trasmissione il campionamento è solo superficiale. Tale tecnica può essere impiegata nel caso di polveri, film di polimeri, liquidi, gel, oppure nel caso di materiali troppo scuri o spessi per essere analizzati tramite trasmissione.

Essa però presenta una bassa sensibilità, circa 3-4 volte in meno della trasmissione.

L'accoppiamento dell'FTIR con la microscopia ottica permette la visualizzazione e mappatura dell'abbondanza di gruppi funzionali e delle disposizioni molecolari in regioni 2D e 3D.

In modalità mapping, lo spettro IR di ogni punto campionato viene misurato ed integrato e i parametri come l'area del picco in regioni spettrali definite sono poi utilizzate per mappare le distribuzioni dei gruppi funzionali (Della Ventura *et al.*, 2010).

Il tempo di acquisizione dipende molto dal set-up sperimentale come il numero totale di punti di campionamento e il numero di scansioni per ognuno di essi.

Le analisi al Micro-FTIR possono richiedere tempi estremamente lunghi, quando si analizzano centinaia o migliaia di particelle una ad una.

Le tempistiche possono però essere ridotte utilizzando l'imaging FTIR con matrici bidimensionali, per esempio utilizzando il focal plane array detector (FPA), che permette di acquisire l'immagine completa tramite un'unica raccolta dati utilizzando un rivelatore multicanale.

Oltre che alla registrazione degli spettri IR dei punti di interesse è necessario registrare anche lo spettro relativo al background mantenendo però inalterati i parametri strumentali precedentemente utilizzati per il campione.

È infatti necessario considerare anche il rumore di fondo causato da sostanze IR attive come, per esempio, l'anidride carbonica e il vapore acqueo che si trovano nell'ambiente in quanto creano fenomeni di interferenza durante l'analisi.

Lo spettro del background viene registrato solitamente su un punto pulito del filtro nel quale è stato depositato il campione e mediante l'utilizzo del software strumentale sottratto a quello del campione in modo da ottenere lo spettro corretto.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un Micro-FTIR Nicolet™ iN™ 10 (ThermoFischer Scientific) (Fig. 18). Questo strumento è dotato di due tipologie di detector:

- Il detector Mercury Cadmium Telluride (MCT), che possiede un'elevata risoluzione spaziale ma deve essere raffreddato con azoto liquido.

- Il detector Deuterato Triglicina solfato (DTG), che lavora a temperatura ambiente, caratterizzato da un rumore maggiore rispetto all'MCT e di conseguenza anche da una sensibilità inferiore.



Fig. 18: Micro-FTIR Nicolet iN10

### 3.5.3 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica di spettroscopia vibrazionale come la spettroscopia IR. Al contrario di quest'ultima però non si basa sull'assorbimento ma bensì sulla diffusione anelastica di una luce laser monocromatica, in modo da ottenere informazioni sulle vibrazioni molecolari di un determinato sistema. (Araujo *et al.*, 2018)

È un potente strumento analitico applicabile in misure quantitative e qualitative di una vasta gamma di materiali, indagini strutturali, studio di processi di cristallizzazione ma può essere impiegata anche nello studio di cinetiche o per seguire il decorso delle reazioni chimiche (Krishna, Unsworth and Edge, 2016).

Inoltre, alcune delle caratteristiche più importanti di tale tecnica sono la sua applicabilità nello studio di campioni in diversi stati fisici (solido, liquido, gassoso, cristallino, amorfo), la richiesta di una quantità minima di campione e la capacità di poter svolgere analisi in situ, per via di strumentazioni compatte e portatili.

Per tutte queste caratteristiche è molto utilizzata in diversi ambiti scientifici come le scienze dei materiali, l'ambito biologico e farmaceutico, le nanotecnologie, analisi dei beni culturali ed analisi di inquinanti ambientali. (Goh, Ismail and Ng, 2017).

Quando la luce interagisce con la materia i fotoni che la compongono possono essere:

- *Assorbiti* quando la radiazione possiede un'energia pari ad una possibile transizione tra il ground state e un livello energetico superiore. In questo caso il fotone viene assorbito e la molecola promossa ad uno stato energetico eccitato (IR).
- *Riflessi* se i fotoni non interagiscono con la materia
- *Diffusi* se interagiscono con la materia ma in questo caso non è necessario che il fotone abbia un'energia che equivale alla differenza di energia tra due livelli energetici della molecola.

Nel Raman scattering il campo elettromagnetico della radiazione incidente induce una polarizzazione della nuvola elettronica attorno ai nuclei della molecola ed il sistema viene eccitato ad un livello virtuale, non quantizzato, di breve vita che non corrisponde a nessun livello stazionario della molecola.

Esso è così instabile che in un tempo pari a  $10^{-14}$  secondi la stessa radiazione viene ri-emessa come luce diffusa.

Dal momento che la distribuzione elettronica di una molecola è influenzata dalla posizione degli atomi che la compongono, il processo appena descritto ha una certa probabilità di venire influenzato dai moti vibrazionali molecolari.

Se nella diffusione è coinvolta solo la distorsione della nuvola elettronica e non avviene alcun accoppiamento con i modi normali di vibrazione, tale processo è considerato come scattering elastico e i fotoni verranno emessi alla stessa lunghezza d'onda della radiazione incidente.

Tale processo è chiamato *Reyleight scattering* e costituisce l'evento più probabile (Fig.19).

D'altra parte, se il processo di diffusione viene modulato dai modi normali di vibrazione, possiamo incorrere due situazioni diverse.

Si assiste ad un effetto noto come *Raman scattering Stokes* se la molecola guadagna energia dal fotone, ovvero viene eccitata e successivamente decade ad uno stato

vibrazionale eccitato. Di conseguenza, il fotone diffuso perde energia rispetto al fotone incidente e quindi la sua  $\lambda$  aumenta ( $\nu^l = \nu_o - \nu_1$ ).

Si ha invece l'effetto *Raman scattering anti-Stokes* se la molecola è già presente in uno stato vibrazionale eccitato e decade a quello fondamentale, emettendo quindi un fotone ad energia maggiore rispetto a quella del fotone incidente e quindi la sua  $\lambda$  diminuisce ( $\nu^l = \nu_o + \nu_1$ ).

Il processo di Raman Scattering, conseguenza di un'interazione di tipo anelastico, è molto poco probabile in quanto interessa solo 1 fotone ogni  $10^6$ - $10^8$  (Edwards, 2005).

Le differenze in frequenza tra la luce incidente e quella emessa corrispondono a differenze di energia vibrazionale, o rotazionale, del campione.

Poiché a temperatura ambiente gran parte delle molecole si trova nel livello vibrazionale fondamentale, il fenomeno di Raman scattering Stokes è più probabile e le corrispondenti bande nello spettro più intense rispetto all'anti-Stokes (Granite, 2020).

In modo particolare, lo scattering Raman presenta bande con intensità pari a  $10^{-7} - 10^{-10}$  rispetto all'intensità della radiazione incidente, mentre lo scattering Rayleigh  $10^{-3} - 10^{-5}$ .

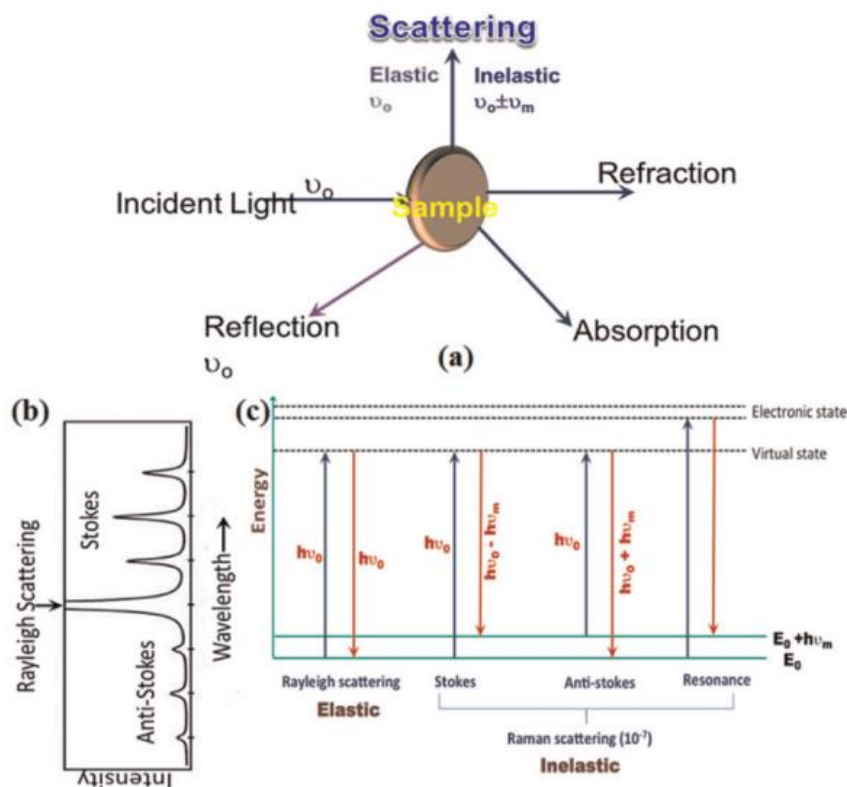


Fig. 19: (a) Meccanismo di Scattering, (b) spettro che mostra le bande Raman (Stokes e anti-Stokes) e quella del Rayleigh scattering, (c) energie delle transizioni Rayleigh e Raman. (Krishna, Unsworth and Edge, 2016)

Nello spettro Raman viene riportata l'intensità dell'emissione luminosa in funzione del Raman shift, definito come la differenza (in  $\text{cm}^{-1}$ ) tra la lunghezza d'onda della radiazione incidente e quella della luce diffusa.

Quindi si ha:  $\bar{\nu} = \bar{\nu}_o - \bar{\nu}_s$

Dove  $\bar{\nu}_0$  è la lunghezza d'onda della radiazione incidente (laser) sul campione e  $\bar{\nu}_s$  la lunghezza d'onda della luce diffusa dal campione.

Un esperimento di diffusione, in funzione di ciò che è stato detto in precedenza, sarà quindi costituito da 3 segnali principali:

La riga Raylight, ovvero quella più intensa che non fornisce alcuna informazione sugli stati energetici del campione e viene soppressa per esempio utilizzando un filtro olografico nello spettrometro.

Le righe Stokes ed anti-Stokes disposte simmetricamente rispetto a quella di Raylight, che contengono le stesse informazioni.

Siccome le righe anti-Stokes hanno un'intensità generalmente molto bassa, e sono molto influenzate dalla temperatura ambientale, si usano quasi esclusivamente dalle righe Stokes. Tali righe forniscono un fingerprint della molecola analizzata in quanto legate ai modi vibrazionali dei gruppi funzionali della molecola e permette quindi la sua identificazione.

Poiché la diffusione Raman fornisce un segnale intrinsecamente debole è necessario che i componenti ottici dello spettrometro siano ottimizzati e ben integrati tra loro.

Inoltre, dal momento che il fenomeno dello scattering Raman è indipendente dalla lunghezza d'onda incidente, si prediligono comunemente eccitazioni laser nell'intervallo del visibile. Per di più è interessante puntualizzare che la probabilità di un evento di scattering è più probabile tanto più corta è la lunghezza d'onda incidente. Per questo motivo il potere risolutivo di uno spettrometro Raman è molto più alto di quello di uno spettrometro IR, che usa lunghezze d'onda più grandi.

Le bande osservate alla spettroscopia Raman non corrispondono sempre alle bande di assorbimento della spettroscopia infrarossa poiché i fenomeni che stanno alla base delle due tecniche sono differenti, così come le regole di selezione.

La condizione necessaria affinché sia possibile l'effetto Raman è si verifichi una variazione della polarizzazione durante la vibrazione molecolare.

Quanto detto si può rappresentare dall'integrale  $M_{fi}$ , sotto riportato:

$$M_{fi} = \int \psi_{vf}^* \alpha \psi_{vi} d\tau \neq 0$$

Un modo vibrazionale sarà Raman attivo solo se  $M_{fi} \neq 0$ , ovvero se  $\alpha$ , ovvero la polarizzabilità, subisce una variazione lungo la coordinata normale di vibrazione.

Ricordiamo inoltre che con il termine polarizzabilità si intende la tendenza di una distribuzione di carica, in questo caso degli elettroni che circondano i nuclei delle molecole, di deformarsi per effetto di un campo elettrico. La polarizzabilità è una proprietà intrinseca della molecola ed è anisotropa.

Per effetto di questa deformazione si origina un momento di dipolo elettrico indotto  $\mu$  proporzionale al campo secondo la relazione:  $\mu = \alpha E$

La regola di selezione specifica è invece data da  $\Delta v = \pm 1$

Quindi gli spettri IR e Raman, benchè siano entrambi degli spettri vibrazionali, possono differire a causa innanzitutto delle regole di selezione diverse tra le due spettroscopie, che influenzano sia le intensità che la presenza o assenza di bande.

In una molecola biatomica sia omonucleare che eteronucleare la vibrazione provoca una variazione della polarizzabilità e sono quindi Raman attive.

Se le molecole possiedono un centro di inversione, per effetto della regola della mutua esclusione, un modo normale non può essere contemporaneamente Raman ed IR attivo.

In generale, molecole che presentano una grande variazione di dipolo sono ben visibili all'IR mentre molecole con variazioni di dipolo deboli o con un'elevata simmetria sono più visibili con la spettroscopia Raman. Possiamo affermare che le due tecniche siano complementari. Inoltre, al contrario della spettroscopia infrarossa, l'acqua ed il vetro non causano interferenze in un esperimento Raman.

Le frequenze caratteristiche dei principali gruppi funzionali Raman attivi cadono nel range spettrale compreso tra i 3000 e i 700  $\text{cm}^{-1}$ .

Sotto i 1500  $\text{cm}^{-1}$  troviamo la fingerprint region.

Dai 1500 ai 2000  $\text{cm}^{-1}$  ci sono i doppi legami, tra cui il legame C=C che danno segnali molto forti al Raman.

Dai 2000 ai 2500  $\text{cm}^{-1}$  troviamo invece i legami multipli, come il  $\text{C}\equiv\text{C}$  o il  $\text{C}\equiv\text{N}$  che sono molto intensi ed infine dai 2500 ai 4000  $\text{cm}^{-1}$  i legami singoli (X-H).

Di seguito viene riportata l'immagine (Fig. 20) contenente i principali segnali Raman la cui intensità aumenta all'aumentare dello spessore della riga verticale.

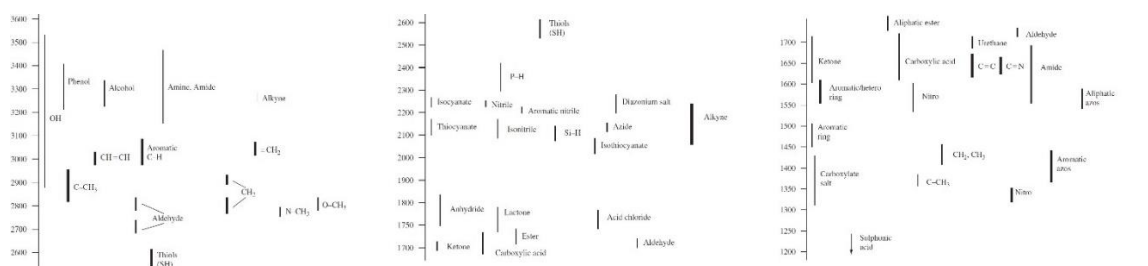


Fig. 20: Frequenze Raman dei principali gruppi funzionali (Edwards, 2005)

Uno spettrometro Raman è composto da diversi elementi: una sorgente, un sistema di campionamento, lo spettrometro, il rivelatore e un sistema di gestione ed elaborazione dei dati.

La luce incidente utilizzata per irradiare il campione può avere qualsiasi frequenza in quanto il Raman shift dipende solamente dalla variazione di energia tra due stati vibrazionali della molecola considerata.

Deve essere però molto intensità, in quanto la radiazione diffusa è debole e quindi diventa necessario utilizzare una radiazione eccitatrice intensa e monocromatica per poter studiare efficacemente l'effetto Raman, in quanto gli spostamenti in frequenza della radiazione diffusa rispetto a quella incidente sono piccoli.

Un problema che può sorgere dall'utilizzo di sorgente ad elevata intensità è che potrebbe causare fenomeni di alterazione del campione, soprattutto se allo stato solido, a seguito di effetti termici e fotochimici.

Solitamente vengono quindi utilizzate sorgenti laser monocromatiche, con un piccolo diametro (1-2 mm) che lavorano nel vicino UV, nel VIS e nel vicino IR. Alcuni esempi sono:

laser ad Argon (488 nm o 514,4 nm), laser a He-Ne (632,8 nm), laser Nd-YAG (1064 nm) e laser a diodo (785 e 820 nm).

Dal momento che le molecole possono essere maggiormente inclini a manifestare fluorescenza quando vengono utilizzate sorgenti con  $\lambda$  basse, anche se queste generano segnali Raman più intensi, generalmente si tende ad utilizzare sorgenti monocromatiche con  $\lambda$  maggiori come i laser a diodo.

Inoltre, siccome questo fenomeno, che è un limite non irrilevante per questo tipo di spettroscopia in quanto oscura le bande vibrazionali Raman, è spesso originato da impurezze presenti nel campione, un modo per diminuirlo è quello di effettuare una buona purificazione del campione.



### 3.5.4 Micro-Raman

La microscopia Raman è una tecnica che combina le abilità identificative di uno spettrometro Raman con la precisione di un microscopio ottico che, focalizzando la luce derivante dalla sorgente laser sul campione, permette di indagare aree circoscritte fino a pochi micrometri.

Tale strumento unisce quindi l'imaging, dal quale si ottengono informazioni di tipo morfologico, con la misura Raman che consente di identificare le singole particelle (Schymanski *et al.*, 2021).

Se solo alcune componenti del campione sono di particolare interesse è possibile focalizzare la misura Raman solo su queste per perfezionare l'analisi chimica.

Lo strumento permette anche di effettuare analisi del campione in profondità (confocale) ed ottenere delle mappe 2D o 3D.

Essendo che il Raman imaging viene solitamente eseguito point-by-point esso risulta nella maggior parte dei casi molto time consuming, soprattutto quando le particelle sono inferiori ai 10  $\mu\text{m}$  (Schymanski *et al.*, 2021).

La microscopia Raman, possedendo una risoluzione spaziale di circa 1  $\mu\text{m}$ , più elevata rispetto a quella del  $\mu\text{-FTIR}$ , si presta maggiormente ad indagare particelle in un range dimensionale inarrivabile per un  $\mu\text{-FTIR}$ , da 1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ , che comincia già a perdere capacità nell'identificare particelle tra gli 11  $\mu\text{m}$  e i 20  $\mu\text{m}$ . Questo avviene in quanto si ha un abbassamento della qualità spettrale a causa del debole rapporto segnale rumore, conseguenza diretta dell'avvicinamento delle dimensioni delle particelle al limite di diffrazione dello strumento (Araujo *et al.*, 2018).

Generalmente, la risoluzione spaziale dello strumento dipende dalla lunghezza d'onda della sorgente impiegata e dal tipo di obiettivo utilizzato nel microscopio (Krishna, Unsworth and Edge, 2016). Questo è una caratteristica molto importante perché influenza la nitidezza con cui si riescono a vedere gli oggetti.

Per quanto riguarda la risoluzione laterale, uno strumento Raman è in grado di raggiungere un valore pari a circa 1  $\mu\text{m}$  fino a 250 nm, mentre la risoluzione in profondità può variare da 1 a 6  $\mu\text{m}$ . Entrambi i parametri dipendono comunque molto dalla tipologia del campione analizzato e dal set up strumentale.

Per ottenere la massima risoluzione in entrambe le aree è spesso necessario utilizzare uno strumento  $\mu\text{-Raman}$  confocale.

In questo progetto di tesi è stato utilizzato uno spettrometro Raman Renishaw inVia.

Esso è costituito da una sorgente eccitatrice, un sistema per la focalizzazione e la raccolta della radiazione diffusa, uno spettrometro ed infine il rilevatore.

Lo strumento è equipaggiato con diverse sorgenti laser:

- Laser Argon con una  $\lambda = 488$  e  $514$  nm
- Laser He-Ne con una  $\lambda = 632,8$  nm
- Laser a diodo con una  $\lambda = 785$  nm

Un microscopio ottico (Leica), dotato di diversi obiettivi con vari ingrandimenti (5x, 10x, 20x, 50x, 100x) viene utilizzato per focalizzare la radiazione incidente su un'area molto piccola del campione, in modo da ridurre al minimo la perdita della luce diffusa, che verrà poi raccolta dallo stesso microscopio. Siccome la luce diffusa Rayleigh ha un'intensità tale da coprire le righe Raman, vengono utilizzati dei filtri edge per eliminarla.

A questo punto la luce viene raccolta da uno specchio collimatore che la riflette sul reticolo di diffrazione, ovvero un sistema ottico che ha la funzione di scomporre il fascio luminoso nelle varie lunghezze d'onda che la compongono. Quindi viene infine diretta verso uno specchio focalizzatore che la riflette verso la fenditura d'uscita che permette di selezionare una sola lunghezza d'onda.

La rivelazione finale è resa possibile grazie a una camera CCD (Charge Coupled Devices), costituita da una serie di fotodiodi al Silicio capaci di trasformare i fotoni che arrivano sulla sua superficie in segnali elettronici digitali che vengono poi utilizzati per produrre l'imaging digitale.

La CCD è costituita da un circuito integrato contenente una serie di condensatori collegati o accoppiati tra loro che si comportano come piccoli pixel. La luce, colpendo il pixel, viene convertita in una carica elettrica proporzionale all'intensità della radiazione elettromagnetica che viene poi convogliata in un registro di lettura.

Il segnale viene quindi amplificato, elaborato e convertito in digitale.

In questo lavoro di tesi la microscopia Raman è stata applicata alla ricerca di microplastiche in campioni di acqua marina precedente analizzati tramite microscopia FTIR.

Utilizzando la combinazione delle due spettroscopie, le difficoltà riscontrate nell'analisi delle MPs in una tecnica possono essere superate dall'altra, per esempio, particelle che danno assorbimento totale all'FTIR in modalità trasmissione possono essere identificate al Raman (Käppler *et al.*, 2015).

L'imaging Raman risulta per alcuni versi più performante rispetto all'FTIR sia perché gode di un'elevata sensibilità nella zona del fingerprint sia perché offre un'elevata risoluzione spaziale che lo porta ad essere una tecnica maggiormente adatta allo studio di nanoparticelle di MPs, che sono abbondanti in numero ma non in massa ed esibiscono una minaccia ambientale potenzialmente maggiore (Anger *et al.*, 2018a) (Kundu *et al.*, 2021). D'altra parte, il principale svantaggio del Raman imaging è il tempo di misurazione più lungo rispetto all'imaging FTIR. Questo può essere ridotto modificando i parametri della misura a discapito però della qualità spettrale e quindi della quantità di MPs effettivamente rilevabili.

Un'altra cosa da considerare è che tra le due tecniche spettroscopiche non variano solo il numero e le dimensioni dei polimeri che possono essere identificati ma anche la tipologia, per esempio, le particelle di PVC vengono determinate più efficacemente con il Raman così come i composti aromatici, mentre l'FTIR è maggiormente sensibile al poliestere e ai composti alifatici (Käppler *et al.*, 2016).

Una scelta ponderata dei parametri strumentali ( $\lambda$  e potenza del laser, tempi di acquisizione, modalità confocale, ecc) utilizzati durante l'analisi è una condizione necessaria per minimizzare le interferenze ed ottenere buoni risultati sperimentali.

In modo particolare i principali fattori limitanti per l'ottenimento di buoni spettri Raman sono:

- La distruzione del campione a causa di una potenza del laser troppo elevata, fenomeno che si verifica con una probabilità maggiore quando le particelle risultano essere piccole e scure.

Solitamente è consigliabile testare la potenza del laser applicabile per ogni singolo campione partendo da basse potenze per poi aumentarle. Siccome l'intensità Raman è

direttamente proporzionale alla potenza della sorgente laser se questa viene ridotta è spesso necessario un tempo di acquisizione più lungo in modo da acquisire spettri di buona qualità (Anger *et al.*, 2018b).

- Spettri con un basso rapporto SNR a causa della bassa potenza del laser utilizzata che rende il segnale troppo attenuato.
- Fluorescenza intrinseca del campione, che nel caso dell'analisi di MPs è spesso prodotta dalla presenza di additivi e pigmenti incorporati tra gli strati dei polimeri che, non essendo legati in modo covalente alla catena polimerica, possono fuoriuscire dalla matrice in condizioni specifiche come elevate temperature ed esposizione ai raggi UV (Zhao *et al.*, 2017).
- Sovrapposizione delle bande derivanti da additivi con quelle relative ai polimeri che causa distorsione degli spettri (Lenz *et al.*, 2015).
- Dalla purezza del campione

Oltre a questi fattori più di carattere generale, le analisi delle MPs in campioni di acqua marina condotte utilizzando un  $\mu$ -Raman possono essere complicate a causa della tendenza delle particelle più piccole a formare degli aggregati, dalla presenza di microorganismi e particelle di origine minerale derivanti dai sedimenti dispersi nell'acqua marina e quindi dalla presenza nello spettro di un background molto più intenso.

In aggiunta, le caratteristiche spettrali dei polimeri presenti in matrici ambientali manifestano delle alterazioni. I picchi sono spesso distorti e deboli a causa dei fenomeni di degradazione che subiscono nell'ambiente naturale ma possono originarsene anche di nuovi come, ad esempio, picchi relativi a gruppi -OH ed -NH che appaiono come risultato della formazione di biofilm sulla superficie della particella. Per tali ragioni l'identificazione viene fatta sui picchi più importanti che sono simili al Raman e all'FTIR (Schymanski *et al.*, 2021).

Il range spettrale da valutare per le analisi di micro e nanoplastiche condotte tramite microscopia Raman deve coprire tutta la zona dei principali segnali polimerici:

Dai 3000 ai 2800  $\text{cm}^{-1}$  troviamo le vibrazioni di stretching dei gruppi -CH, -CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>

Dai 1580 ai 1640  $\text{cm}^{-1}$  le vibrazioni di banding degli aromatici

Dai 1500 ai 400  $\text{cm}^{-1}$  zona di fingerprint

Nella figura sottostante (Fig. 21) vengono proposti spettri Raman, immagine di sinistra, ed FTIR in modalità trasmissione, a destra, dei principali polimeri sintetici.

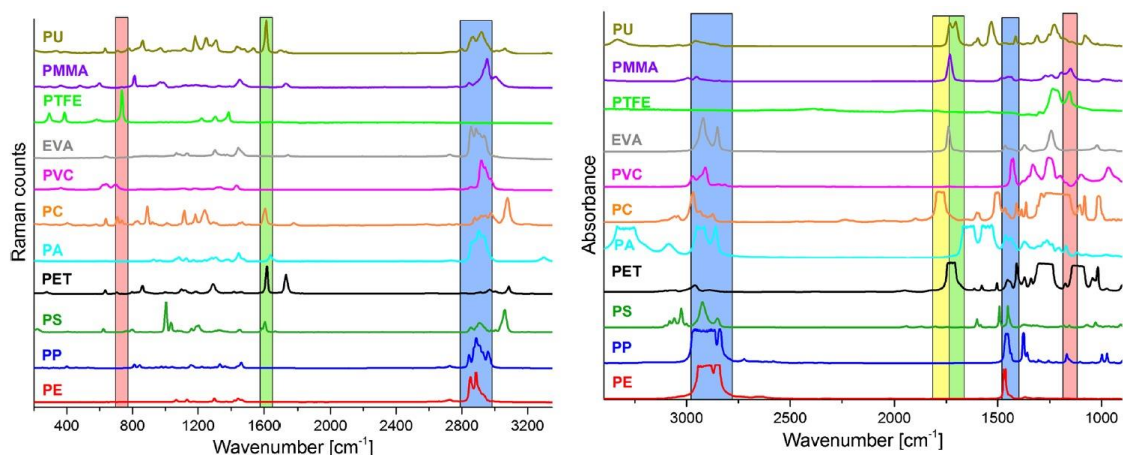


Fig. 21: Spettri Raman e FTIR dei principali polimeri sintetici (Käppler *et al.*, 2016)

Sebbene da un punto di vista teorico il limite dimensionale raggiungibile mediante la spettroscopia Raman è pari a 1  $\mu\text{m}$ , tale scopo è stato raggiunto solamente da un gruppo di ricerca tramite l'uso di un  $\mu$ -Raman lavorante con una lunghezza d'onda del laser pari a 532 nm ed obiettivo del microscopio 50x (NA = 0,75), che è riuscito a confermare la presenza di una particella di poliammide (PA) di circa 1  $\mu\text{m}$  in un campione di acqua minerale in bottiglia (Oßmann *et al.*, 2018).

La capacità di individuare nanoparticelle è ancora molto dipendente dalla tipologia e dalla complessità del campione, dal suo trattamento, dal tipo di filtro e dai parametri di misura impiegati.

### 3.6 Analisi quantitativa e qualitativa di microplastiche ed additivi tramite Micro-FTIR

I filtri Anodisc, derivanti dal processo di estrazione dei campioni di acqua e sedimento lagunari, sono stati analizzati mediante il Micro-FTIR in modalità trasmissione equipaggiato con un rilevatore MCT raffreddato ad azoto liquido e servendosi del software di gestione strumentale OMNICTM PictaTM (Thermo Fisher Scientific).

Il software permette sia di ottenere informazioni morfologiche come la lunghezza, la larghezza e l'area delle particelle utilizzando la modalità *Analyze Image*, sia di selezionare un certo numero di particelle, presenti nel campo ottico acquisito precedentemente tramite l'imaging, e quindi di registrare lo spettro IR per ciascuna particella che viene successivamente confrontato con gli spettri presenti nelle varie librerie, in modo da ottenere per ciascuna un match percentuale (Fig. 22).

In accordo con le caratteristiche strumentali vengono considerati buoni match quelli compresi tra il 65 ed il 75% ma grazie alla procedura di purificazione match superiori al 75% sono spesso ottenibili.

In questo lavoro di tesi sono stati considerati solo match  $\geq 65\%$ .

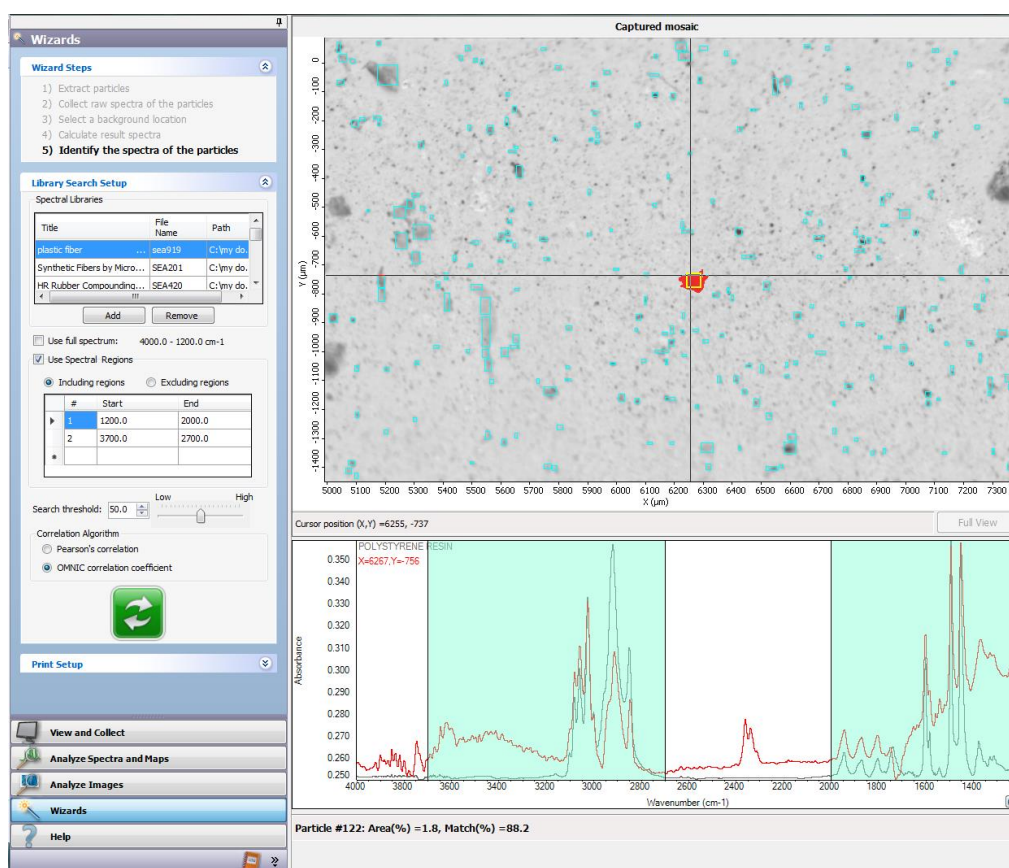


Fig. 22: Raccolta spettri particelle ed identificazione tramite confronto con le librerie di riferimento

Per l'identificazione e la quantificazione delle SMPs e degli APFs è stata utilizzata una conta microscopica, nella quale sono stati selezionati campi di area nota in modo randomizzato,

così da avere la massima copertura del filtro evitando sovrapposizioni. (Corami et al., 2020; Mazziotti et al., 2013).

Per il conteggio microscopico sono stati raccolti 20 campi conta (dimensione 2000  $\mu\text{m}$  x 1200  $\mu\text{m}$  ed area 2,40  $\text{mm}^2$ ; apertura 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  e risoluzione spaziale 100  $\mu\text{m}$ ) utilizzando la sezione Wizard del software Omnic Picta.

Per ciascun campo sono state selezionate 250 particelle delle quali sono stati raccolti 64 co-scan, con una risoluzione di 4  $\text{cm}^{-1}$ , nell'intervallo spettrale compreso tra i 4000 – 1200  $\text{cm}^{-1}$ .

Non è possibile acquisire lo spettro completo dell'intera zona del fingerprint (1400 – 600  $\text{cm}^{-1}$ ) a causa del forte assorbimento che i filtri Anodisc mostrano dai 1250 ai 600  $\text{cm}^{-1}$  oltre che a un doppietto di media intensità nel range 1745 – 1375  $\text{cm}^{-1}$  (Käppler *et al.*, 2015).

Le abbondanze delle particelle di microplastiche e del microlitter presenti nei campioni di acqua sono state calcolate in accordo con le equazioni modificate messe a punto da (Corami *et al.*, 2020).

Nel caso di campioni di acqua il numero totale di particelle/ Litro è stato calcolato tramite la seguente equazione:

$$N_{\text{TOT}} = \frac{F * 1000 * N_{\text{tot}}}{\text{ml campione}}$$

Dove:  $N_{\text{tot}}$  corrisponde al numero totale di particelle contate per ciascun campo; ml sono i millilitri di campione pesato ed F è il fattore ottico ottenuto mediante la seguente espressione:

$$F = \frac{\text{Area del filtro}}{\text{Area campo} * \text{numero di campi}}$$

Dove l'Area del filtro è 1734  $\text{mm}^2$ ; l'Area del campo ottico è pari a 2,4  $\text{mm}^2$  ed infine il numero di campi che è dato dalla somma dei campi registrati per ciascun filtro, in questo caso 20.

Per ogni particella è stato valutato anche l'aspect ratio (AR), ovvero il rapporto la lunghezza e la larghezza massima della particella, che ci fornisce informazioni sulla forma geometrica ideale di quest'ultime.

$$\text{Aspect Ratio} = \frac{\text{Lunghezza } (\mu\text{m})}{\text{Larghezza } (\mu\text{m})}$$

Quando l'aspect ratio è pari ad 1 la particella può essere approssimata ad una forma sferica, quando è uguale a 2 ad un'elisse ed infine quando è maggiore o uguale a 3 ad un cilindro. Il volume di ciascuna particella è stato calcolato in accordo col valore dell'aspect ratio e quindi della forma geometrica associata a ciascuna particella.

Si utilizza la formula del volume di un cilindro, nel caso di un valore di  $\text{AR} \geq 3$ :

$$V (\text{cm}^3) = \frac{\text{Lunghezza particella } (\text{cm}^3) * (\text{Larghezza particella } (\text{cm}^3))^2 * \pi}{4}$$

Se  $\text{AR} \geq 2$ , il volume viene calcolato utilizzando l'espressione del volume di un'elisse:

$$V (\text{cm}^3) = \frac{\text{Lunghezza particella (cm}^3) * (\text{Larghezza particella (cm}^3))^2 * \pi}{6}$$

In fine se AR =1, si sfrutta la formula del volume di una sfera:

$$V (\text{cm}^3) = \frac{(\text{Lunghezza particella (cm}^3))^3 * \pi}{6}$$

Il peso di ciascuna particella è stato calcolato in funzione del volume e della densità:

$$\text{Peso singola particella (g)} = V (\text{cm}^3) * \rho (\text{g/cm}^3)$$

Il peso totale delle SMPs per i campioni di acqua lagunare è stato ottenuto utilizzando la seguente espressione:

$$\mu\text{g}_{\text{tot}} / \text{L} = \frac{\text{Peso totale particelle } (\mu\text{g})}{\text{L di acqua}}$$

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Analisi delle microplastiche nelle acque lagunari tramite $\mu$ -FTIR

I filtri ottenuti dal pretrattamento dei campioni d'acqua relativi ai siti di Sant'Erasmus e Palude maggiore sono stati analizzati mediante uno spettrometro Micro-FTIR, che permette di effettuare simultaneamente un'analisi quantitativa (tramite conta microscopica) e di identificare le MPs, soprattutto quelle al di sotto dei 100  $\mu\text{m}$ . Tramite l'imaging dello strumento è inoltre possibile ottenere lunghezza e larghezza per le singole particelle polimeriche.

Ogni campione è stato analizzato almeno in duplicato. Per escludere contaminazioni apportate durante le procedure in laboratorio, sono stati analizzati i bianchi del filtro e dei reagenti utilizzati, nonché i bianchi procedurali.

Nei bianchi non sono state trovate microplastiche.

Le particelle di MPs si distribuiscono casualmente sulla superficie del filtro secondo la distribuzione di Poisson. Di conseguenza per ogni sito preso in esame è stata riportata la media tra almeno due repliche e calcolato il limite fiduciale dell'abbondanza che rappresenta l'errore della quantificazione. Vale la pena ribadire per che l'identificazione invece solo le particelle con un match percentuale nel range ottimale si consideravano identificate e quindi quantificabili.



## 4.2 Le microplastiche nelle acque di Sant'Erasmus

L'abbondanza e la distribuzione dei polimeri nelle acque di Sant'Erasmus relativi alla campagna Autunno-Inverno 2019 (SE2) e alla campagna Estiva 2020 (SE3) sono mostrate in (Fig. 23).

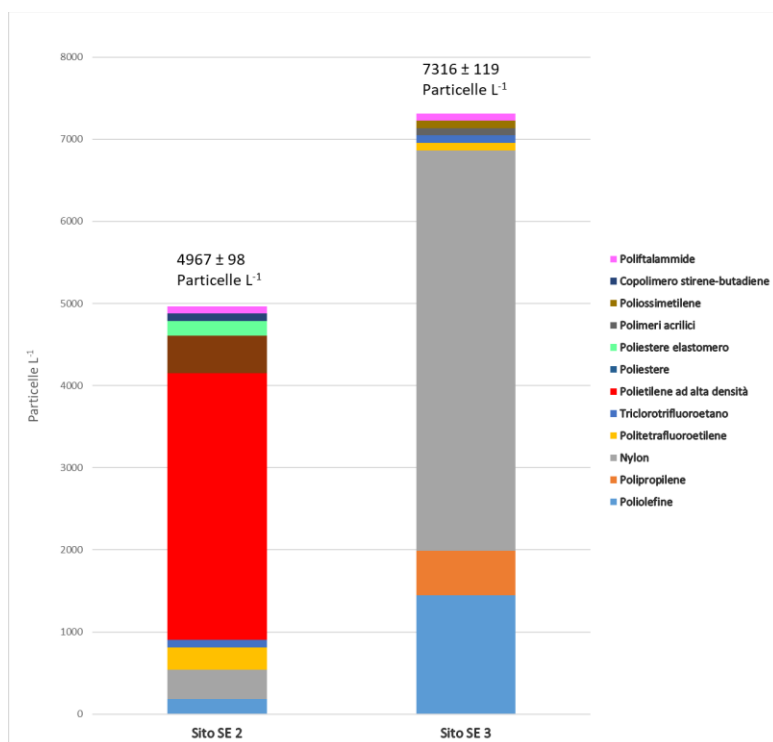


Fig. 23: Confronto tra particelle/L di microplastiche del sito di Sant'Erasmus campagna Autunno-Inverno 2019 (SE2) e tra particelle/L del sito di Sant'Erasmus campagna Estate 2020 (SE3)

La composizione delle *small microplastics* per ogni sito è stata studiata in termini di abbondanza percentuale, forma e dimensione (Appendice, Tabella A e Tabella B).

I mosaici e gli spettri di alcuni dei polimeri osservati sono riportati in (Appendice, Fig. A.1, Fig. A.2).

I match percentuali medi ottenuti per le particelle identificate risultano essere mediamente pari a 77, con polimeri che arrivano anche a match pari a 95 (PTFE) e 92 (PO).

Considerando che i match compresi tra il 65% e il 75% sono considerati come ottimali, possiamo affermare di aver ottenuto dei buoni risultati grazie alla procedura di purificazione precedentemente effettuata sul campione.

Dall'analisi dimensionale è emerso che la lunghezza media delle SMPs nelle acque di Sant'Erasmus è pari a 61,6  $\mu\text{m}$ , mentre la larghezza media è di 23,2  $\mu\text{m}$ ; sono quindi molto inferiori ai 100  $\mu\text{m}$ .

Tramite il calcolo dell'Aspect Ratio (AR) è stato possibile stabilire la loro forma che può essere assimilata ad una forma geometrica sferica (AR=1), ellittica (AR=2) oppure cilindrica (AR=3).

Passando dalla campagna autunnale a quella estiva, si osserva un incremento delle particelle di forma ellittica e cilindrica ed una diminuzione del numero di particelle sferiche. La presenza di SMPs di forma più allungata durante la campagna estiva potrebbe essere dovuta allo sviluppo delle particelle a partire da pezzi di plastica di dimensioni maggiori.

Nello specifico dal confronto dei dati relativi alle due campagne possiamo osservare che solo alcuni polimeri sono comuni ai due campionamenti (PA, PO, PTFE e PPA); il fatto che la composizione dei composti microplastici rilevati nella campagna autunnale sia diversa da quella estiva ci suggerisce l'ampiezza delle possibili fonti di MPs.

Le tipologie di polimero più abbondanti nelle acque di Sant'Erasmo sono: HDPE, PA, PES, PO e PP.

L'HDPE è un polimero sintetico che presenta notevoli vantaggi, tra cui una facile produzione e bassi costi. Caratteristiche come rigidità, resistenza alla trazione e chimica, fanno sì che venga impiegato nella creazione di una moltitudine di oggetti soprattutto ad uso domestico quali bottiglie, sacchetti, packaging alimentare ma anche come microbead nella cosmesi (Hu *et al.*, 2022). Inoltre, siccome viene impiegato nella fabbricazione di tubazioni sia per le acque reflue che per quelle potabili (Jubinville *et al.*, 2020) anche queste potrebbero essere una delle fonti di questo polimero nelle acque.

Le microparticelle di potrebbero derivare anche dalla frammentazione di imballaggi o dalla rottura di plastica rigida (Vianello *et al.*, 2013).

Il PES è invece la fibra più usata nei tessuti sintetici in virtù della sua resistenza, elasticità ed idrorepellenza. La sua presenza nelle acque può essere correlato al rilascio di fibre durante i processi di lavaggio domestico degli indumenti, che sono una tra le fonti principali di microplastiche primarie-(Corami *et al.*, 2020).

Un'altra possibile fonte di PES potrebbe derivare dal deflusso superficiale dai terreni agricoli (Hu *et al.*, 2022), ampiamente presenti vicino a questo sito di campionamento. Infatti, tra i polimeri maggiormente presenti nei fertilizzanti prodotti a partire dallo scarto semisolido, creato durante il processo di trattamento delle acque reflue, troviamo oltre all'HDPE e al PP proprio il PES (Crossman *et al.*, 2020).

Il PA essendo principalmente impiegato in diversi prodotti tecnici quali lenze, cavi, ingranaggi potrebbe derivare dalla rottura, per esempio, degli attrezzi da pesca (Corami *et al.*, 2021b).

Esso è considerato inoltre come un materiale ideale per produrre articoli usa e getta, imballaggi, articoli ad uso agricolo ed edile (Qiao *et al.*, 2011) ma vengono anche ampiamente utilizzate in campo navale per produrre ingranaggi per le navi e scafi (Sudhakar *et al.*, 2007).

Una volta immesso nell'ambiente il PA risulta essere particolarmente suscettibile alla fotodegradazione che può provocarne la frammentazione in particelle di piccole dimensioni, anche nanoplastiche (Hu *et al.*, 2022).

Tale caratteristica è comune anche ad un'altra tipologia di microplastica ovvero il PP; un polimero altamente cristallino che a causa di caratteristiche quali resistenza chimica e

all'abrasione, elevato carico di rottura, è stato il primo polimero richiesto dal mercato europeo per l'anno 2021 (Plastic Europe., 2021).

L'elevata richiesta ma lo scarso riciclo fanno sì che cospicue quantità di questo materiale plastico vengano ogni anno introdotte nell'ambiente, nel quale si distribuisce prevalentemente nell'acqua superficiale dove galleggia a causa della sua bassa densità pari a  $0,90 \text{ g/cm}^3$ .

Nell'industria automobilistica viene sfruttato per realizzare paraurti e componenti interni e quando viene filato utilizzato nell'industria tessile per fabbricare corde, tappezzeria e tappeti.

Il PP è inoltre impiegato nella produzione di tubi per le tubature delle acque, reti anti grandine ma anche articoli usa e getta (Jubinville *et al.*, 2020).

Le principali fonti di SMPs nelle acque di Sant'Erasmus possono essere riassunte nella presenza di un centro abitato, correlato quindi alla presenza di materiali plastici di uso comune (PO, HDPE), scarichi urbani (PES, PA), dilavamento dei campi agricoli presenti sull'isola (PP, HDPE, PES) e dalle attività di pesca svolte nella laguna (PA).

### 4.3 Le microplastiche nelle acque di Palude Maggiore

L'abbondanza e la distribuzione dei polimeri nelle acque di Palude Maggiore relativi alla campagna Autunno-Inverno 2019 (SE2) e alla campagna Estiva 2020 (SE3) sono mostrate in (Fig. 24).

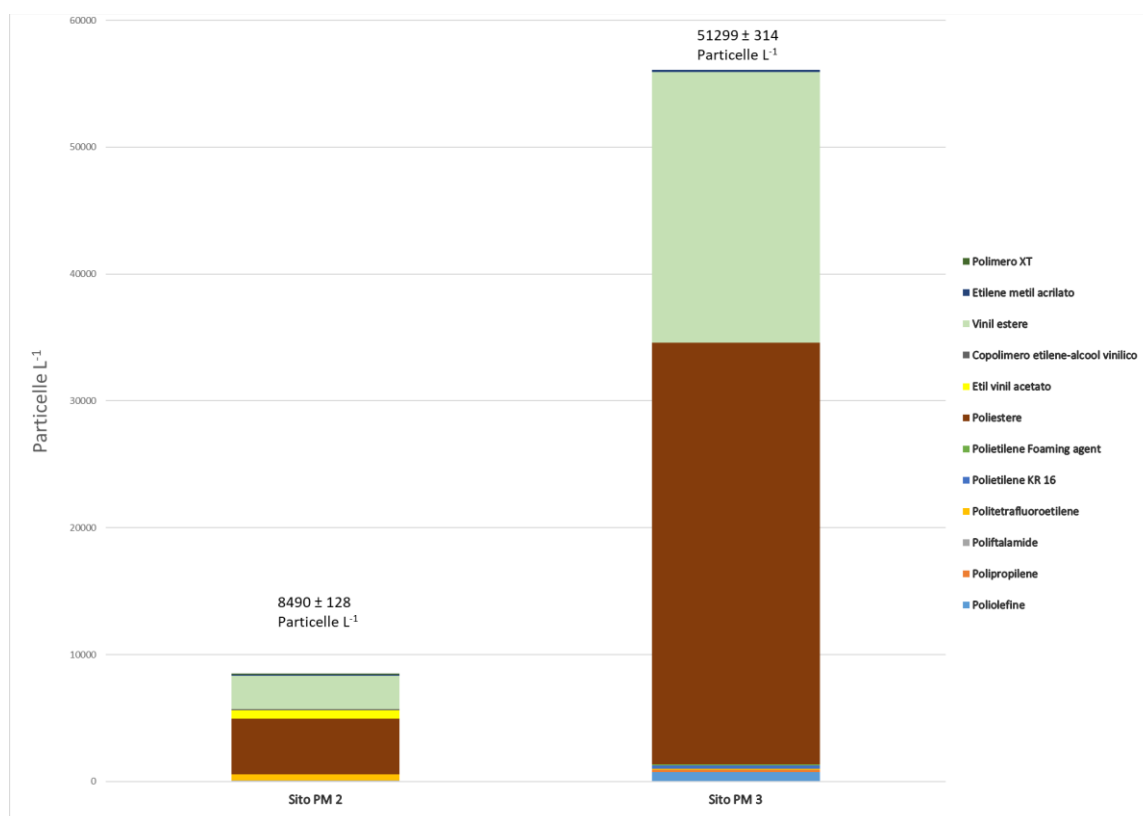


Fig. 24: Confronto tra particelle/L di microplastiche del sito di Palude Maggiore campagna Autunno-Inverno 2019 (PM2) e tra particelle/L del sito di Palude Maggiore campagna Estate 2020 (PM3)

La composizione delle *small microplastics* per ogni sito è stata studiata in termini di abbondanza percentuale, forma e dimensione (Appendice, Tabella C e Tabella D).

Le microplastiche identificate presentano tutte dimensioni inferiori ai 100  $\mu\text{m}$ ; in modo particolare la lunghezza media è pari a 54,3  $\mu\text{m}$ , mentre la larghezza media è 19,8  $\mu\text{m}$  (vedi Tab in appendice).

L'elongazione per la maggior parte delle particelle è pari a 2, il che indica una forma ellittica-allungata, seguita poi da quella sferica.

In entrambe le campagne di campionamento due polimeri in particolare, PES e VE, spiccano per abbondanza. In modo particolare nella campagna estiva queste tipologie di particelle rappresentano da sole il 97% dell'abbondanza totale di tutte le particelle identificate.

Nella campagna autunnale invece troviamo anche altri polimeri presenti in quantità rilevanti, ovvero il PTFE (5%) e l'EVA (8%).

Il VE è una resina termoindurente prodotta per reazione di una resina epossidica con acido metacrilico (Hodgkin, 2001) utilizzata come matrice per materiali compositi essendo molto resistente alla corrosione e all'assorbimento di acqua.

I principali settori di utilizzo sono quello navale dove viene utilizzato per produrre scafi e navi da stoccaggio (Mullins *et al.*, 2012) ma anche quello dell'industria chimica e petrolchimica dove viene impiegato per rivestire le vasche di stoccaggio di prodotti chimici, cisterne di carburanti, serbatoi o nel rivestimento di tubazioni.

L'EVA è un copolimero è prodotto tramite polimerizzazione dell'etilene e del vinil acetato. Le proprietà finali del materiale dipendono prevalentemente dal contenuto di vinil acetato che possono variare dal 40 al 60% in peso.

Tale polimero viene principalmente impiegato nella produzione di cavi, rivestimenti, guarnizioni, in applicazioni di ingegneria biomedica come dispositivo per la somministrazione di farmaci, nell'industria fotovoltaica come materiale per incapsulamento delle celle solari e come sostituto del sughero nella costruzione di maniglie per canne da pesca (Sisanth *et al.*, 2017).

L'EVA risulta avere una bassa resistenza agli agenti atmosferici, in modo particolare alla radiazione UV che causa la foto-ossidazione del materiale (Henderson, 1993).

Il PTFE è un fluoropolimero comunemente noto come Teflon® noto per la sua elevata stabilità grazie alla presenza dei forti legami C-F.

Le proprietà uniche di questo materiale plastico comprendono elevata resistenza chimica e termica, idrofobicità, basso coefficiente d'attrito e buone proprietà isolanti.

Comunemente viene utilizzato nei rivestimenti delle pentole antiaderenti. Trova inoltre impiego nella fabbricazione di semiconduttori e dispositivi medici; come rivestimento per contenitori di prodotti chimici e come ingrediente inerte nei pesticidi (Radulovic *et al.*, 2014).

Siccome i polimeri osservati nelle acque di Palude Maggiore hanno svariate applicazioni, sia industriali che di uso comune, l'individuazione di una fonte puntuale risulta essere complessa quindi si ipotizza una fonte diffusa.

Le microplastiche potrebbero essere trasferite nelle acque lagunari tramite i fiumi affluenti che veicolano le particelle di origine terrestre, dove si concentrano le principali attività antropogeniche che producono rifiuti plastici, oppure potrebbero derivare dalle attività svolte in laguna (acquacultura, pesca, trasporto marittimo, turismo).

Un ulteriore apporto potrebbero essere i terreni agricoli nei quali le MPs sono presenti sia nei fertilizzanti che negli impianti gocciolanti per l'irrigazione ma anche gli scarichi delle acque reflue (PES).

#### 4.4 Confronto tra i siti

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi rivelano la presenza di inquinamento da microplastiche in entrambi i siti esaminati, indicando un'ampia distribuzione di MPs nel territorio lagunare.

Le abbondanze maggiori sono state riscontrate nel sito di Palude Maggiore per entrambe le campagne di campionamento.

Le concentrazioni di microplastiche sono intrinsecamente correlate all'idrodinamica specifica della colonna d'acqua nella quale viene effettuato il prelievo e, in modo particolare, le MPs tendono ad accumularsi nei siti affetti da un idrodinamismo inferiore (de Lucia *et al.*, 2018), ovvero le zone lagunari più interne, come Palude Maggiore.

Al contrario il sito di Sant'Erasmus, pur appartenendo allo stesso bacino lagunare, risulta essere caratterizzato da un dinamismo maggiore in quanto locato verso il mare aperto e in prossimità di insenature; per cui fenomeni di accumulo di MPs in questo sito potrebbero essere inferiori rispetto a Palude Maggiore.

Si è potuto inoltre osservare oltre che a una variabilità spaziale anche una variabilità temporale dell'inquinamento da microplastiche.

Nello specifico è stato notato un incremento della quantità di *small microplastics* per entrambi i siti durante il campionamento estivo.

Diversi studi hanno evidenziato che la presenza di microplastiche nell'acqua superficiale marina può subire variazioni di tipo stagionale; in particolare si osserva un incremento delle particelle nella stagione piovosa rispetto a quella secca (Ouyang *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2016a).

Ciò si verifica in quanto le MPs vengono esportate dalle zone terrestri dagli eventi piovosi e sono poi scaricate nelle zone di foce dalle acque alluvionali (Ali *et al.*, 2021).

Quindi, considerando che il bacino di drenaggio può essere un percorso rilevante delle SMPs dalla terraferma alla laguna, l'aumento della loro abbondanza in entrambi i siti potrebbe essere stato determinato in parte dai carichi stagionali ricevuti dalla laguna dal bacino idrografico.

La quantità delle particelle sospese nella colonna d'acqua è però soprattutto influenzata dall'idrodinamica della laguna.

Essa, infatti, non dipende solamente dagli ingressi fluviali ma anche dalle maree, dal moto ondoso, dallo scambio idrico con il mare attraverso tre insenature e dai venti che prevalgono nella zona settentrionale dell'Adriatico, la Bora (Nord-Est) e lo Scirocco (Sud-Est) (Vianello *et al.*, 2013).

In aggiunta forti venti associati al moto ondoso, provocando una miscelazione turbolenta dell'acqua, determinano la risospensione dei sedimenti, che possono così diventare a loro volta una fonte di MPs nel corpo idrico.

Quindi anche fenomeni di risospensione possono aver influenzato l'aumento delle microplastiche durante la seconda campagna.

Un altro fattore da considerare è l'insorgere a inizio 2020 dell'infezione da Sars-Cov-2 e le conseguenti limitazioni del lockdown per controllarne la diffusione sul territorio italiano, applicate ufficialmente il 10 marzo 2020 (Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 2020).

Ciò si è rivelata essere un'occasione unica e senza precedenti per analizzare come il blocco del turismo di massa, della mobilità e in generale delle attività antropiche abbiano influenzato l'ambiente.

Alcuni studi hanno rilevato come la riduzione delle attività industriali e commerciali abbiano provocato un miglioramento della qualità delle acque e della vita biotica (Yusoff *et al.*, 2021).

Nella stessa laguna di Venezia sono state effettuate delle ricerche che evidenziano un aumento della trasparenza dell'acqua nel periodo del lockdown principalmente dovuta alla riduzione del traffico marittimo e delle attività turistiche (Braga *et al.*, 2020).

In alcuni casi questo particolare momento storico è servito per diminuire, almeno per il periodo a ridosso del lockdown, la presenza di alcuni inquinanti come elementi in tracce (Selvam *et al.*, 2020).

Tale andamento non è stato però osservato nel nostro studio.

Il fatto che la presenza delle microplastiche non sia stata condizionata dalle misure attuate durante il lockdown è probabilmente dovuto al continuo apporto di questo inquinante nell'ambiente nonostante il blocco di molte attività e dalla sua maggiore persistenza nell'ambiente.

La pandemia d'altro canto ha provocato un brusco aumento dei rifiuti plastici in tutto il mondo a causa dell'utilizzo dei sistemi di protezione individuali, tra cui mascherine e guanti che, non essendo riciclabili, se mal gestiti potrebbero riversarsi nell'ambiente.

Infatti, in accordo con l'OMS la popolazione mondiale (7,8 miliardi) necessita ogni mese di circa 129 miliardi di mascherine (The World Health Organization., 2020).

Le mascherine chirurgiche sono formate da tre strati di tessuto non tessuto costituite principalmente da polipropilene e poliestere.

Lo strato esterno è formato da un tessuto non tessuto che apporta rigidità meccanica alla mascherina e che può anche essere trattato in modo da conferirgli proprietà idrofobiche; lo strato intermedio, ovvero quello filtrante, è costituito da tessuto non tessuto con tecnologia melt blow formato da microfibre di diametro da 1 a 3 micron; lo strato interno ha la funzione di proteggere il volto dallo strato filtrante (Atoufi *et al.*, 2021).

Essendo alcuni strati composti da filamenti plastici disposti casualmente con solo alcuni nodi per migliorarne la stabilità, è possibile che questi possano fuoriuscire per effetto di una forza esterna. Infatti, dopo due mesi di esposizione naturale, le mascherine diventano molto più fragili, si frammentano e provocano il rilascio di microplastiche. Una sola mascherina può rilasciare miliardi di MPs quando viene degradata (Shen *et al.*, 2021).

L'aumento di PP e PES nella seconda campagna di campionamento potrebbe quindi anche essere stato causato, almeno in parte, dal rilascio nell'ambiente dei dispositivi di protezione individuale.

#### **4.5 Metodi non distruttivi per l'analisi di nanoplastiche: applicazione della spettroscopia $\mu$ -Raman**

Se da un lato le microplastiche sono state oramai isolate in una vasta varietà di matrici (acqua, suolo, sedimento, tessuti, organismi) con diverse metodologie analitiche, lo stesso non si può dire per la frazione di particelle plastiche di grandezza ancora inferiore ovvero le nanoplastiche (1 nm- 1  $\mu$ m).

Tali particelle potrebbero addirittura avere un impatto ambientale e biologico superiore a quello osservato per le MPs sia a causa dell'elevato rapporto superficie-volume, che potrebbe incrementare l'adsorbimento di contaminanti, sia per il loro potenziale di traslocazione negli organismi. È stata infatti dimostrata l'elevata propensione di particelle di nano-PET ad attraversare la barriera intestinale umana con effetti a lungo termine ancora sconosciuti (Magrì *et al.*, 2018).

Per tali ragioni è necessario ottenere informazioni sulla composizione chimica di tali particelle, sulla loro morfologia ed infine sulla loro concentrazione e distribuzione.

Ovviamente le conoscenze pregresse e le metodiche applicate alle microplastiche possono essere di grande aiuto e forniscono certamente un punto di partenza importante per gli studi sulle nanoplastiche.

D'altro canto, le NPs presentano diverse problematiche dal punto di vista analitico, principalmente legate alle ridotte dimensioni e alle basse concentrazioni con cui si presentano nei campioni reali, dove la loro abbondanza può anche essere inferiore rispetto a quella di particelle non plastiche nella matrice.

Tali fattori provocano difficoltà sia nelle operazioni di estrazione che nell'identificazione; quest'ultima principalmente ostacolata dal limite di rilevamento o dalla sensibilità non adeguata delle tecniche analitiche impiegate (Zhang *et al.*, 2022).

##### **4.5.1 Le nanoplastiche nelle acque lagunari**

Dopo aver analizzato i campioni relativi ai siti di Sant'Erasmus e Palude Maggiore tramite l'utilizzo della tecnica spettroscopica  $\mu$ -FTIR, che ha permesso una contemporanea identificazione e quantificazione delle particelle di microplastica, l'obiettivo successivo era quello di cercare di identificare particelle di nanoplastiche con dimensioni di qualche micron negli stessi siti.

Attualmente, infatti, l'entità della contaminazione ambientale per particelle inferiori ai 100  $\mu$ m resta pressoché sconosciuta a causa del limitato sviluppo degli attuali metodi di rilevamento.

Per cui le domande a cui bisogna rispondere con urgenza sono: quali tipi di polimeri sono presenti sottoforma di nanoplastiche? quali sono le loro dimensioni e forme?

È infatti necessario dapprima confermare la tipologia dei polimeri presenti e solo in un secondo momento effettuare una quantificazione delle particelle, necessaria per valutare l'impatto delle NPs sull'ambiente.

Il rilevamento di tali particelle non poteva però essere effettuato tramite l'ausilio del  $\mu$ -FTIR che ha risoluzione spaziale fino a 5  $\mu$ m (Nguyen *et al.*, 2019).



In accordo con i fenomeni di diffrazione che possono insorgere, tale tecnica viene infatti solitamente impiegata per rilevare particelle fino ai 10-20  $\mu\text{m}$ .

Per tale ragione si è scelto di effettuare le analisi mediante la micro-Raman che presenta una migliore risoluzione spaziale (1  $\mu\text{m}$ ) e risulta quindi più adatta per studiare particelle in questo range dimensionale dandoci, come nel caso del  $\mu\text{-FTIR}$ , sia informazioni chimiche che strutturali, non ottenibili da altre tecniche spettroscopiche.

#### 4.5.2 Trattamento del campione

Uno dei principali svantaggi associati alla tecnica micro-Raman applicata ai campioni ambientali è certamente l'interferenza della fluorescenza che può essere indotta da sostanze organiche, inorganiche (minerali, sabbia, frammenti di conchiglie, gusci di crostacei) ed additivi (pigmenti) che rimangono adesi al filtro soggetto ad analisi.

Quindi, per una corretta identificazione e caratterizzazione delle small-microplastics, fino alle nanoplastiche, in campioni di acqua, è necessario rimuovere efficacemente queste interferenze.

La rimozione della matrice ha inoltre il vantaggio di aumentare il rapporto tra particelle plastiche e non-plastiche. Quest'ultimo aspetto ha ripercussioni per quanto concerne una migliore rappresentatività dell'analisi del campione, una riduzione del numero totale di particelle e, di conseguenza, una diminuzione degli effetti di agglomerazione e sovrapposizione tra le particelle naturali e plastiche che potrebbero portare a una sottostima di quest'ultime (Ivleva *et al.*, 2021).

La purificazione del campione risulta quindi essenziale per ottenere buoni risultati al Raman.

Un altro fattore da considerare quando si lavora nell'intervallo dimensionale di pochi  $\mu\text{m}$  e dei nm è che il livello di contaminazione del campione può essere maggiore, e l'analisi può essere molto disturbata a causa dell'elevata sensibilità dello strumento. Per tale ragione e per il fatto che le particelle plastiche sono oramai onnipresenti, condizioni di lavoro plastic-free sono necessarie in tutte le fasi dal campionamento, dal trattamento del campione fino all'analisi strumentale. Fondamentali sono anche le valutazioni sui bianchi di laboratorio, che permettono di monitorare le contaminazioni interne ed eventualmente di eliminarle.

Per l'analisi al  $\mu\text{-Raman}$  dei campioni di acqua relativi ai siti di Sant'Erasmo e Palude Maggiore sono stati sfruttati gli stessi filtri dei campioni precedentemente analizzati tramite la tecnica non distruttiva  $\mu\text{-FTIR}$ .

La metodologia ideata per le microplastiche, che prevede una procedura di oleo-estrazione delle MPs dal campione di acqua, risulta coerente con gli obiettivi da raggiungere per ottenere un filtro in cui le nanoparticelle possono essere agevolmente identificate.

Infatti, la metodologia sviluppata permette sia un arricchimento di NPs, tramite digestione della matrice organica mediante  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sia la rimozione della matrice inorganica ed il recupero delle particelle plastiche tramite l'oleo-estrazione.

### 4.5.3 Analisi qualitativa delle nanoplastiche

I filtri delle acque lagunari sono stati analizzati mediante lo spettrometro Raman Renishaw inVia presso l'Università degli studi di Padova.

L'analisi al  $\mu$ -Raman permette di effettuare sia analisi puntuali su particelle opportunamente selezionate dall'operatore, sia su diverse aree del filtro (Raman imaging). L'analisi strumentale risulta quindi in un set di dati di elevate dimensioni, ovvero un numero elevato di spettri ed informazioni morfologiche che devono essere elaborate per ottenere informazioni sulle particelle come numero, dimensioni, forma e identificazione chimica.

Al contrario del  $\mu$ -FTIR dove per l'analisi semi-automatizzata veniva utilizzato un software commerciale e validato, Omnic™ Picta™ software, nel caso del  $\mu$ -Raman il software è stato interamente sviluppato dai ricercatori presso l'università di Padova, con funzionalità e design molto simile a quello del  $\mu$ -FTIR, anche se non integrato in un'unica interfaccia.

Gli stadi dell'analisi prevedono l'acquisizione dell'immagine del filtro con un microscopio ottico, l'inserimento dei parametri strumentali adatti per registrare in modo ottimale gli spettri nei punti di interesse nell'immagine precedentemente acquisita ed, infine, il riconoscimento delle particelle per confronto con libreria. In quest'ultimo passaggio intervengono algoritmi di comparazione che vengono utilizzati per calcolare parametri da usare come misura della somiglianza tra lo spettro di libreria e quello del campione reale, così da fornire un match percentuale di attribuzione (ad esempio la correlazione di Pearson oppure segmented-Hit-Quality-Index).

Le immagini Raman e gli spettri relativi alle particelle identificate tramite  $\mu$ -Raman nei diversi siti vengono riportati in Appendice (Fig. A.3, Fig. A.4, Fig. A.5, Fig. A.6).

### 4.5.4 Sant'Erasmus campagna autunno-inverno 2019

Nel campione relativo al sito SE2 sono state identificate sette nanoparticelle di polipropilene.

L'analisi semi-automatica al  $\mu$ -Raman è stata eseguita utilizzando due approcci distinti: la selezione manuale della particella, sulla quale verrà poi effettuata una singola acquisizione dello spettro Raman, ed il Raman imaging, che prevede in un primo momento l'acquisizione di un'area di dimensioni note e successivamente l'acquisizione di spettri punto per punto lungo una griglia a maggior risoluzione.

Nello specifico il laser viene focalizzato in un singolo punto mentre il campione si sposta gradualmente sotto al laser fino a mappare l'intera area.

Per tutte le particelle identificate sono state calcolate le coordinate ed i parametri morfologici.

Il set-up sperimentale utilizzato in entrambi i metodi di selezione è il seguente:

- Linea laser: 633 nm
- Obiettivo: 100x
- Potenza percentuale: 50%
- Tempo di acquisizione: 20 secondi
- Numero di acquisizione: 2

Di seguito vengono riportati i polimeri identificati e le relative dimensioni (vedi Tab. 1):

Polimero	Lunghezza ( $\mu\text{m}$ )	Larghezza ( $\mu\text{m}$ )	Metodo di selezione
Polipropilene	5	3	Raman imaging
Polipropilene	<1	<1	Raman imaging
Polipropilene	1	1	Selezione manuale
Polipropilene	1	1	Selezione manuale
Polipropilene	4	3	Selezione manuale
Polipropilene	6	2	Selezione manuale
Polipropilene	1	1	Selezione manuale

Tab. 1: Tabella riassuntiva delle nanoparticelle identificate nei filtri relativi al sito SE2

Le particelle identificate risultano avere lunghezza media pari a 3  $\mu\text{m}$  e larghezza media pari a 2  $\mu\text{m}$ .

I risultati sono stati ottimi in quanto si è riusciti a misurare ben quattro particelle di dimensione pari a 1  $\mu\text{m}$

Alcune tra le particelle identificate risultavano avere una colorazione blu.

Dal confronto con i dati precedentemente ottenuti mediante analisi al  $\mu$ -FTIR notiamo che particelle di polipropilene non erano state identificate tramite questa tecnica spettroscopica, esse quindi risultano essere presenti in questo campione solamente sottoforma di, quantomeno, small-microplastics.

#### 4.5.5 Sant'Erasmus campagna estiva 2020

L'analisi del campione SE3 condotta mediante  $\mu$ -Raman ha condotto ai seguenti risultati:

- Particella di Polipropilene di lunghezza pari a 16  $\mu\text{m}$  e larghezza pari a 12  $\mu\text{m}$  identificata tramite Raman Imaging.  
È stata utilizzata una linea laser di 633 nm con potenza 0.6-1 mW, obiettivo 100x, tempo di acquisizione 3 s e numero di acquisizioni pari a 1.  
Inizialmente è stata acquisita un'immagine di dimensione 300 x 400  $\mu\text{m}$  e successivamente gli spettri sono stati registrati in una sottoarea di circa 200 x 200  $\mu\text{m}$  con griglia di 2  $\mu\text{m}$  di lato.
- Particella di Poliuretano di lunghezza pari a 30  $\mu\text{m}$  e larghezza di 20  $\mu\text{m}$  identificata mediante selezione manuale.  
È stata impiegata una linea laser di 633 nm con potenza 10%, obiettivo 50x, tempo di acquisizione 10 s e numero di acquisizioni pari a 1.

Le particelle identificate in questo sito risultano essere di dimensioni maggiori rispetto a quelle rilevate nel sito SE2, con un range dimensionale al limite delle capacità di rilevazione del  $\mu$ -FTIR.

Inoltre, dal confronto con i dati precedentemente ottenuti mediante tale tecnica spettroscopica si nota che le particelle di polipropilene in questo campione risultavano avere un'abbondanza dell'8% rispetto a tutte le particelle plastiche identificate e presentavano larghezza media pari a 52,66  $\mu\text{m}$  e larghezza media pari a 29,10  $\mu\text{m}$ . Quindi la tecnica  $\mu$ -Raman ha reso possibile l'individuazione di particelle di dimensioni inferiori. Al contrario, le particelle di poliuretano non erano state precedentemente identificate mediante  $\mu$ -FTIR.

#### **4.5.6 Palude Maggiore campagna autunno-inverno 2019**

La ricerca delle particelle è stata effettuata solamente mediante selezione manuale utilizzando il seguente set-up sperimentale:

- Linea laser: 633 nm
- Obiettivo: 100x
- Potenza percentuale: 10%
- Tempo di acquisizione: 10 secondi
- Numero di acquisizione: 1

Sono state così identificate le seguenti particelle plastiche:

- Particella di Poliuretano di lunghezza pari a 8  $\mu\text{m}$  e larghezza pari a 6  $\mu\text{m}$ .
- Particella di Polipropilene con bordi non netti. Le dimensioni stimate risultano essere pari a 4  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 4  $\mu\text{m}$  di larghezza.

Entrambe le tipologie di polimero plastico non erano state precedentemente identificate mediante microspettroscopia FTIR applicata allo stesso campione.

#### **4.5.7 Palude Maggiore campagna estiva 2020**

Nel sito di PM3 è stata rilevata una sola particella di polipropilene tramite l'algoritmo Particle Finder (sviluppato dai ricercatori dell'Università di Padova) che consente una localizzazione automatizzata delle particelle.

È stata utilizzata una linea laser 633 nm con obiettivo 50x, potenza 50%, tempo di acquisizione 5s e numero di acquisizioni pari a 1.

La particella identificata aveva dimensioni pari a 94  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 39  $\mu\text{m}$  di larghezza.

Nel sito di PM3 erano state precedentemente identificate particelle di PP tramite spettroscopia  $\mu$ -FTIR, presenti con un'abbondanza pari all'1%.

Le particelle presentavano lunghezza media pari a 21,7  $\mu\text{m}$  e larghezza media pari a 14,8  $\mu\text{m}$ .

In questo caso siamo quindi riusciti a confermare la presenza del PP con un'altra tecnica spettroscopica ma non siamo riusciti ad identificare particelle che presentavano dimensioni inferiori rispetto al limite di rilevabilità del  $\mu$ -FTIR.

## CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata messa a punto una procedura per l'identificazione delle nanoplastiche tramite micro-Raman in campioni di acqua superficiale della Laguna di Venezia sfruttando le conoscenze pregresse e le metodiche relative alle microplastiche.

Allo stato attuale l'identificazione di queste particelle in matrici ambientali risulta molto problematica a causa dei limiti di rilevamento e sensibilità non adeguata degli strumenti.

Nei pochi studi condotti nella maggior parte dei casi sono state identificate NPs volutamente addizionate a campioni ambientali ma non sono riusciti ad estrarre e quantificare le nanoplastiche in campioni reali ambientali (Cai *et al.*, 2021b).

Il primo obiettivo fissato è stato quello di dimostrare che lo stesso filtro analizzato mediante Micro-FTIR lo fosse anche al Micro-Raman in modo da poter osservare particelle sotto al micrometro.

L'analisi al Raman è di tipo qualitativo essendo stata applicata per la prima volta a dei campioni reali.

Per tale ragione lo studio si è focalizzato su come riuscire ad identificare le classi di polimeri ed osservare le dimensioni con le quali erano presenti nei campioni.

A tale scopo si è scelto di utilizzare la stessa procedura di oleo-estrazione e purificazione ideata da (Corami *et al.*, 2021b) per le *small microplastics*.

Ciò è stato reso possibile perché le procedure impiegate permettevano sia di rimuovere efficacemente la matrice così da aumentare il rapporto tra particelle plastiche e non-plastiche nel filtro, che di ridurre al minimo i fenomeni che porterebbero a fluorescenza durante l'analisi al micro-Raman, ovvero sostanze organiche ed inorganiche adese al filtro. La resa del metodo di oleo-estrazione testata per le acque marine è del 95% (Corami *et al.*, 2021b).

Per minimizzare la possibilità di contaminazione dei campioni tutte le procedure preanalitiche sono state svolte in una clean room (ISO 7).

Inoltre, l'analisi dei bianchi procedurali non ha evidenziato la presenza di microplastiche e di nanoplastiche.

Una volta estratti i campioni sono stati analizzati dapprima mediante tecnica spettroscopica micro-FTIR così da effettuare una contemporanea identificazione e quantificazione delle microplastiche e, successivamente, gli stessi filtri sono stati analizzati anche mediante la tecnica micro-Raman così da poter identificare anche la frazione dimensionale più piccola delle particelle plastiche.

Per entrambe le campagne di campionamento il sito di Palude Maggiore presenta una maggiore abbondanza di microplastiche rispetto al sito di Sant'Erasmo e, per entrambi i siti, si osserva un aumento della presenza di SMPs nel campionamento estivo 2020.

Nei due siti sono state identificate diverse classi di polimeri utilizzati in un'ampia gamma di applicazioni che indicano la presenza di diverse fonti di rilascio.

Considerando i polimeri preponderati nei due siti le principali fonti potrebbero essere il rilascio di fibre negli scarichi di lavaggio (PES, PA), deflusso da terreni agricoli (HDPE, PES), attività turistiche e marittime (HDPE, PP, PO) ed attività industriali (VE).

I polimeri identificati in entrambi i siti presentano dimensioni medie inferiori ai 100  $\mu\text{m}$  quindi possiamo parlare di *small microplastics*.

Ciò è in accordo con il fatto che le particelle di più piccole dimensioni tendono a galleggiare nella superficie dell'acqua piuttosto che a sedimentare.

Tramite le analisi al  $\mu$ -Raman è stato possibile identificare diverse particelle di polipropilene e poliuretano nell'intervallo dei pochi  $\mu\text{m}$  grazie alla più elevata risoluzione spaziale dello strumento.

In modo particolare risulta degno di nota il ritrovamento di quattro particelle di dimensioni prossime a  $1\ \mu\text{m}$ , un risultato molto difficile da ottenere nel caso di matrici ambientali.

L'essere riusciti a identificare delle nanoplastiche ci permette di porre le fondamenta per ulteriori studi finalizzati alla loro quantificazione, necessaria per valutare l'impatto delle NPs sull'ambiente e sugli organismi.

Le analisi delle NPs sono ancora nelle fasi iniziali ma la creazione di protocolli standardizzati ed armonizzati risulta necessaria sia per poter confrontare gli studi scientifici sia per poter sviluppare una normativa adeguata alla salvaguardia ambientale.

La questione delle microplastiche e delle nanoplastiche è un problema complesso ed oltre che ad essere indagato da un punto di vista scientifico dovrebbe essere affrontato anche da un punto di vista sociale, economico e politico al fine di attuare dei piani per ridurre l'input di plastica nell'ambiente, produrre un più efficiente sistema di raccolta e smaltimento dei rifiuti e sensibilizzare la popolazione su questo problema che interessa ognuno di noi.

## APPENDICE

*Tabella A: Tipologie di polimeri identificati nel sito Sant'Erasmus campagna Autunno-Inverno 2019 (SE2) con relativi: match medio (%), lunghezza e larghezza media ( $\mu\text{m}$ ), Elongazione media e  $\mu\text{g/L}$  medi.*

Polimero	Match medio (%)	Abbondanza (%)	Lunghezza media ( $\mu\text{m}$ )	Larghezza media ( $\mu\text{m}$ )	Elongazione media	$\mu\text{g/L}$ media
PO	92	4	41,3	20,6	1	12297
PA	76	7	55,6	23,7	2	7694
PTFE BLEND	93	2	43,7	22,8	1	18876
PTFE	69	5	47,1	23,8	2	10909
HDPE	76	65	33,1	21,0	2	27676
PES	73	9	93,4	36,3	3	77904
TPE	66	4	37,7	15,9	1	13049
SBR	69	2	21,9	15,0	1	1238
PPA	68	2	25,0	13,0	1	1679

*Tabella B: Tipologie di polimeri identificati nel sito Sant'Erasmus campagna Estate 2020 (SE3) con relativi: match medio (%), lunghezza e larghezza media ( $\mu\text{m}$ ), Elongazione media e  $\mu\text{g/L}$  medi.*

Polimero	Match medio (%)	Abbondanza (%)	Lunghezza media ( $\mu\text{m}$ )	Larghezza media ( $\mu\text{m}$ )	Elongazione media	$\mu\text{g/L}$ media
PO	89	20	123,1	38,5	3	284049
PP	79	8	66,0	30,9	2	40742
PA	70	67	151,0	64,1	2	2916849
PTFE	72	1	25,4	14,5	1	8867
PTFE BLEND	95	1	225,0	24,3	5	302169
PAN	88	1	23,1	10,9	1	1226
POM	68	1	17,9	8,2	1	642
PPA	70	1	17,8	11,0	1	906

*Tabella C: Tipologie di polimeri identificati nel sito Palude Maggiore campagna Autunno-Inverno 2019 (PM2) con relativi: match medio (%), lunghezza e larghezza media ( $\mu\text{m}$ ), Elongazione media e  $\mu\text{g/L}$  medi.*

Polimero	Match medio (%)	Abbondanza (%)	Lunghezza media ( $\mu\text{m}$ )	Larghezza media ( $\mu\text{m}$ )	Elongazione media	$\mu\text{g/L}$ media
PTFE	75	5	28,9	16,1	1	78143
PES	69	52	43,0	23,9	2	83957
EVOH	70	1	350,0	20,0	9	92905
EVA	70	8	34,4	24,7	1	6318
VE	70	31	55,2	28,2	2	110556
EMA	71	1	18,3	8,7	1	723
POLIMERO XT	75	1	36,9	19,7	1	11836
PPA	69	1	16,4	11,3	1	1184

*Tabella D: Tipologie di polimeri identificati nel sito Palude Maggiore campagna Estate 2020 (PM3) con relativi: match medio (%), lunghezza e larghezza media (µm), Elongazione media e µg/L medi.*

Polimero	Match medio (%)	Abbondanza (%)	Lunghezza media (µm)	Larghezza media (µm)	Elongazione media	µg/L media
PO	90	1	86,4	47,7	2	86818
PP	83	1	21,7	14,8	1	441
PTFE	66	0,1	23,2	12,2	2	2849
HDPE	95	1	38,1	24,0	2	23069
LMDPE	67	0,1	17,2	12,8	1	737
PES	69	59	49,7	26,9	2	1200272
VE	70	38	30,9	17,3	2	1355550
EMA	68	0,1	18,5	8,5	2	1086

*Tabella E: Concentrazione Particelle/L presenti in ciascun sito suddivise per elongazione*

	Particelle/L sferiche (elongazione 1)	Particelle/L ellittiche (Elongazione 2)	Particelle/L cilindriche (Elongazione 3)
Sito SE 2	993	3161	813
Sito SE3	452	4696	2168
Sito PM 2	1445	5780	1264
Sito PM 3	7587	42268	6232



Figura A.1: Esempio di mosaici ottenuti mediante  $\mu$ FTIR dei campioni d'acqua lagunare

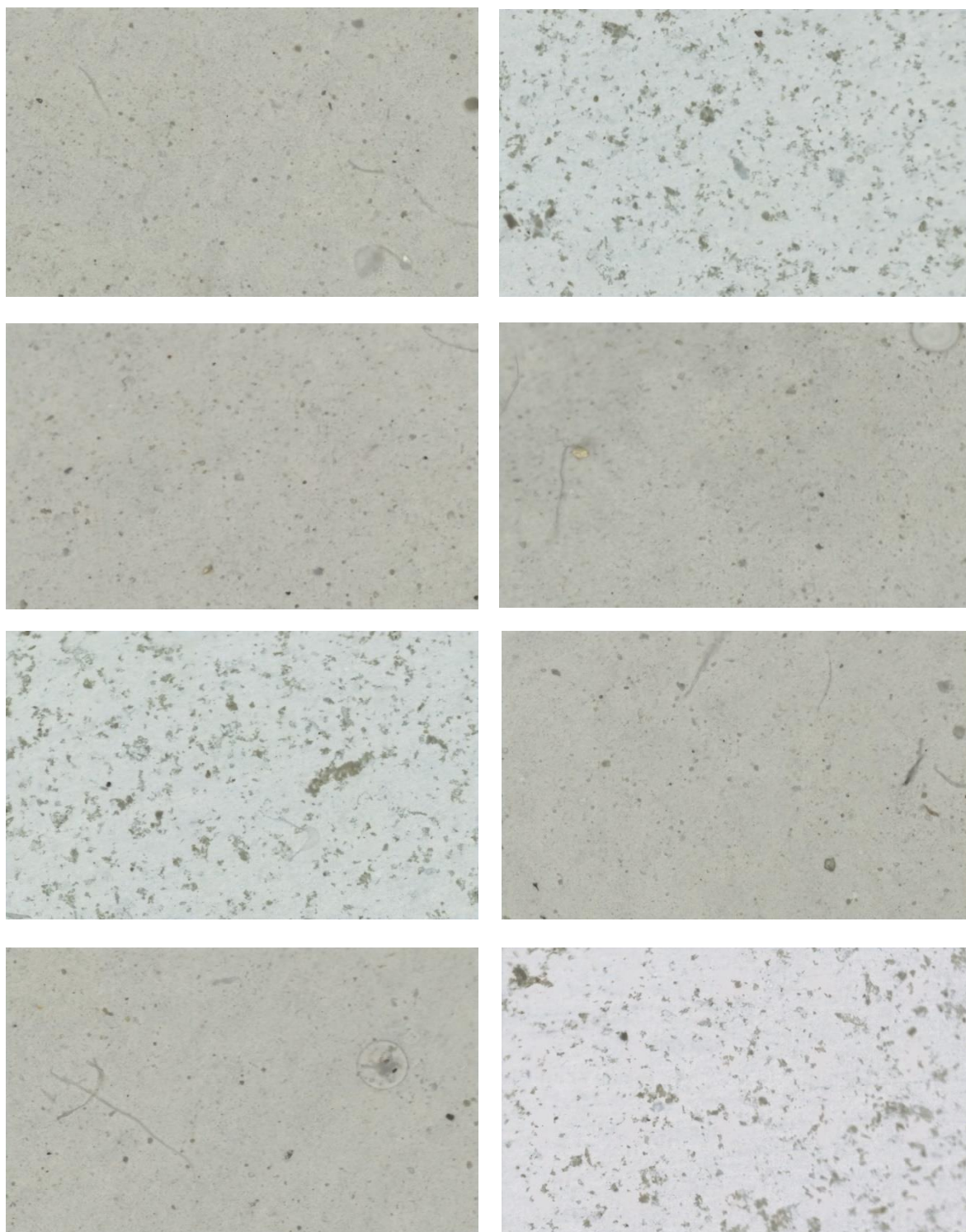
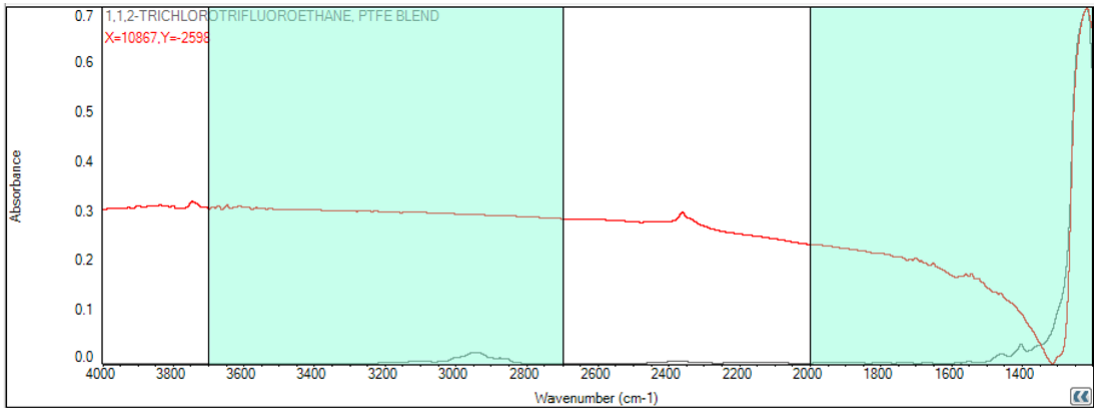
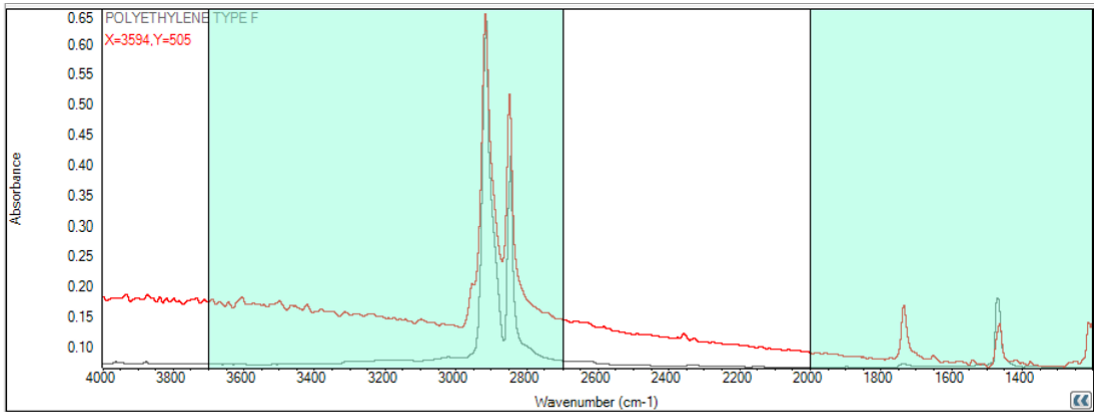


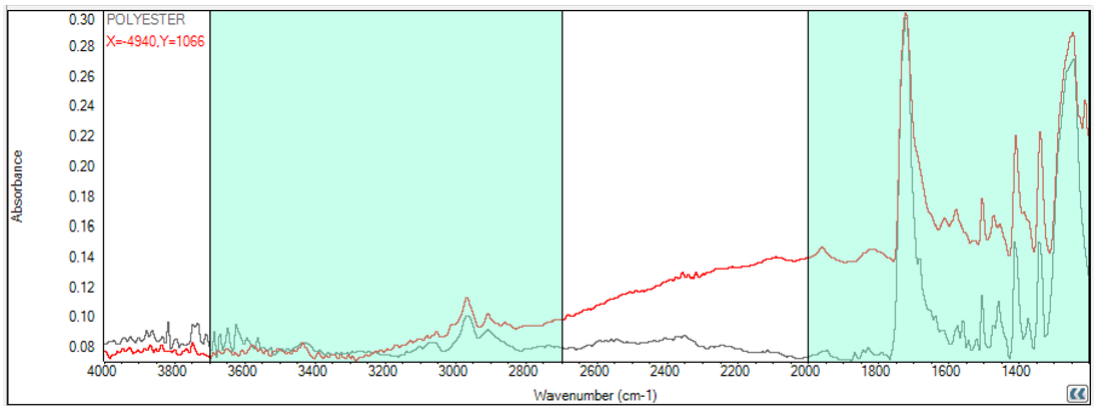
Fig A.2: Spettri  $\mu$ -FTIR dei polimeri relativi ai campioni d'acqua



Particle #173: Area(%) = 2.77, Match(%) = 96.7



Particle #87: Area(%) = 0.39, Match(%) = 94.8



Particle #11: Area(%) = 1.68, Match(%) = 91.2

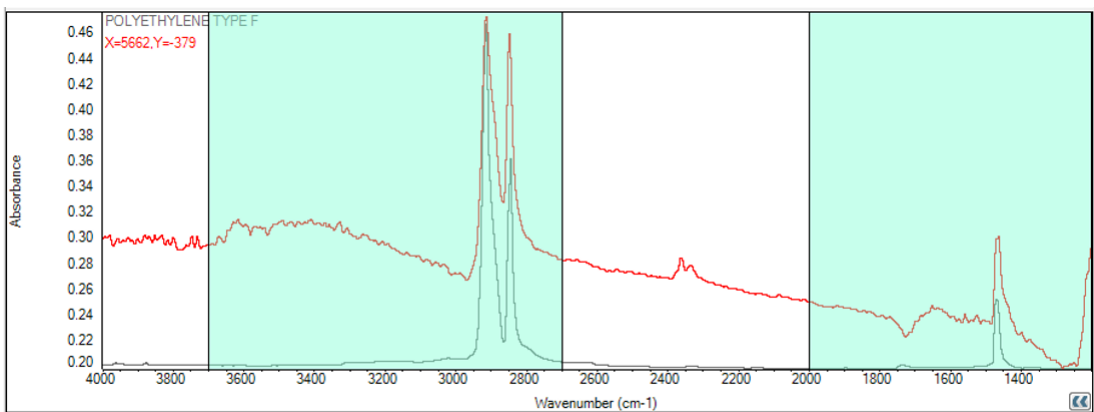
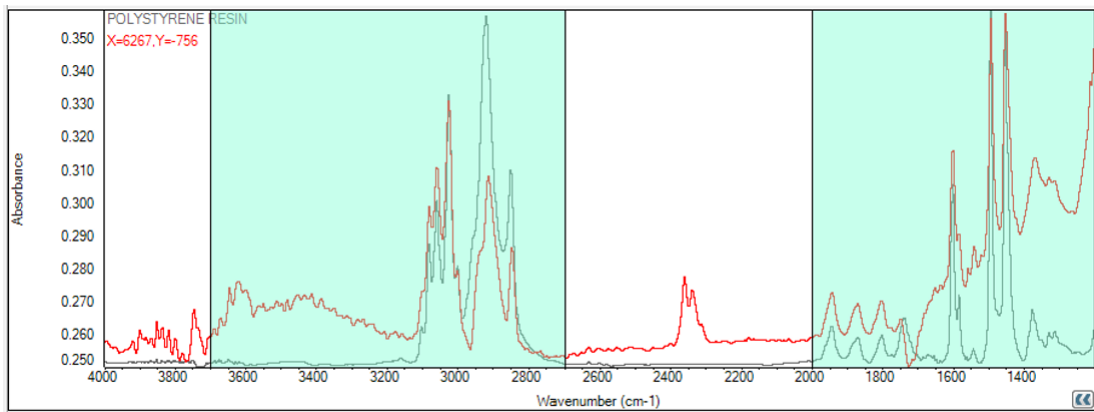
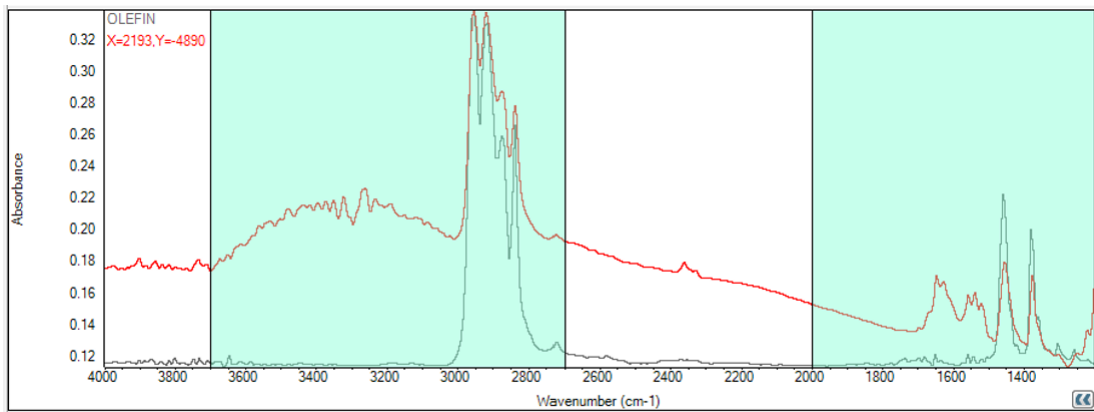
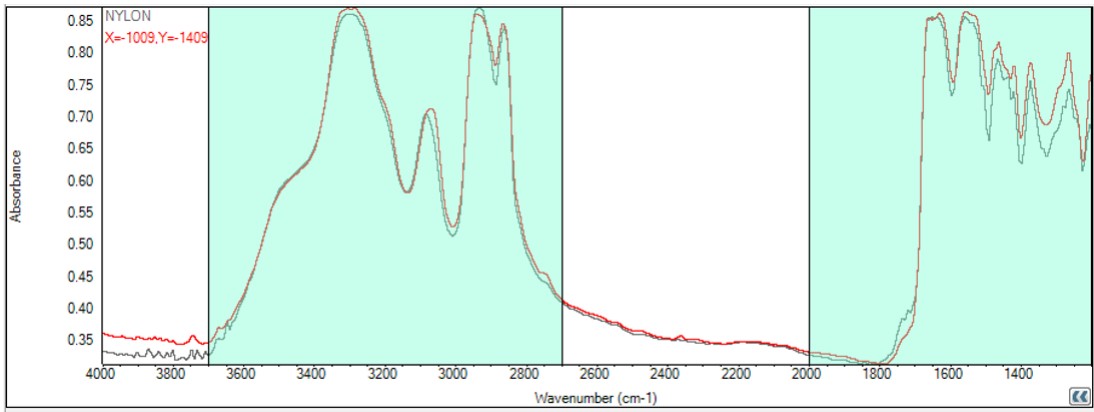
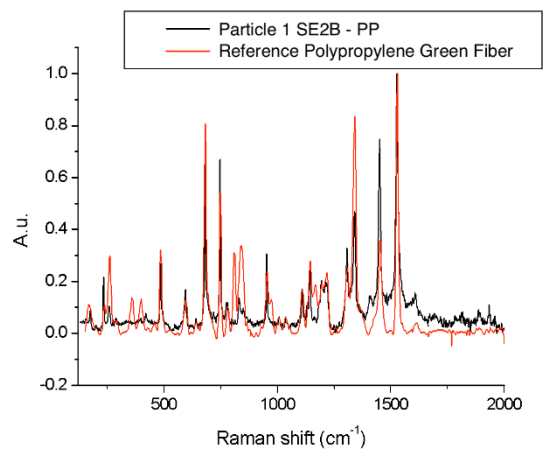
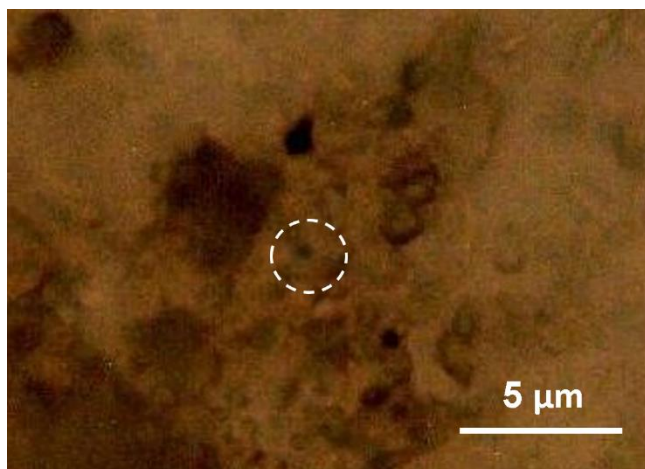
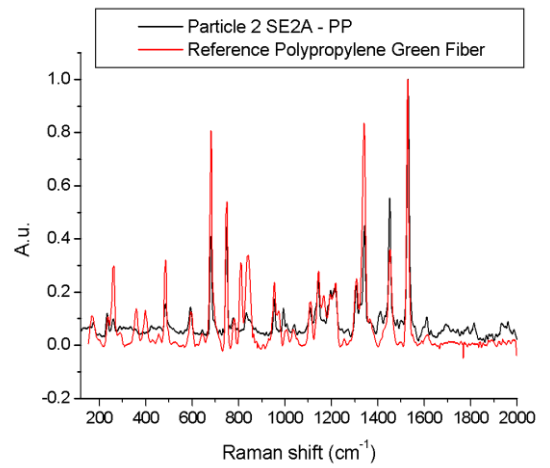
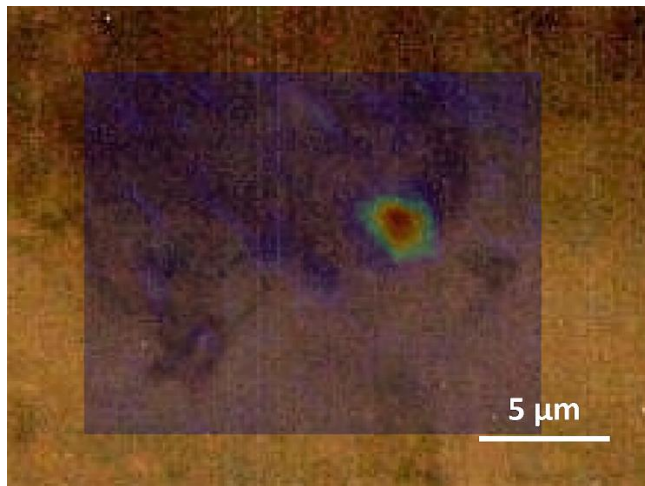
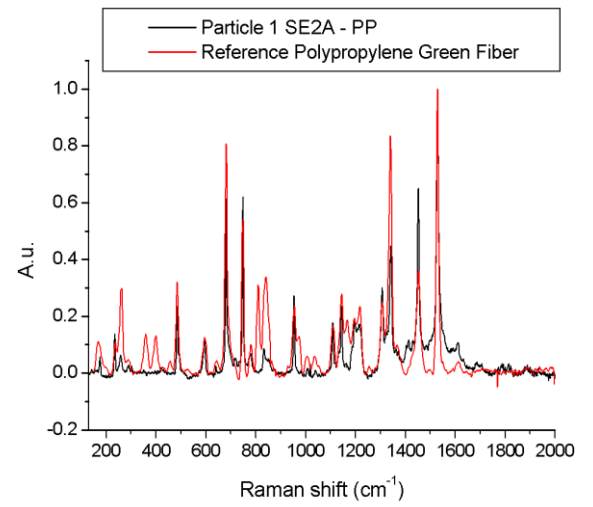
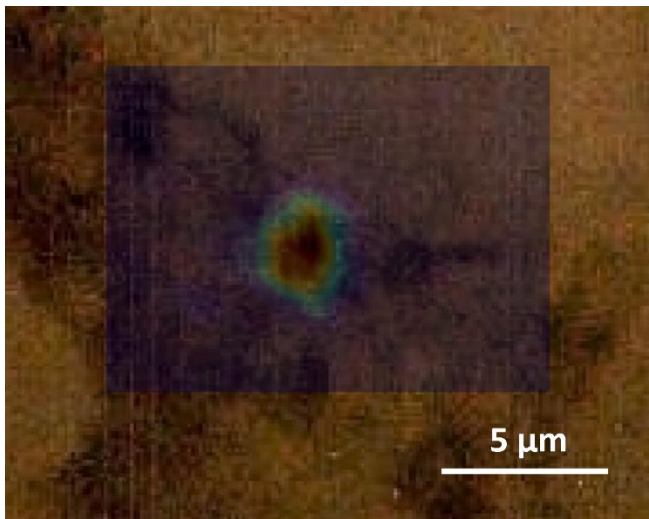
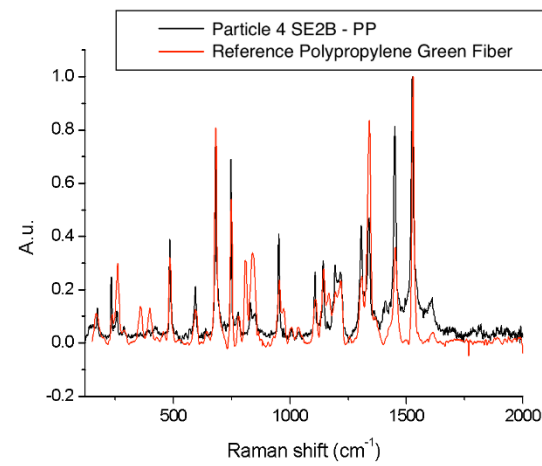
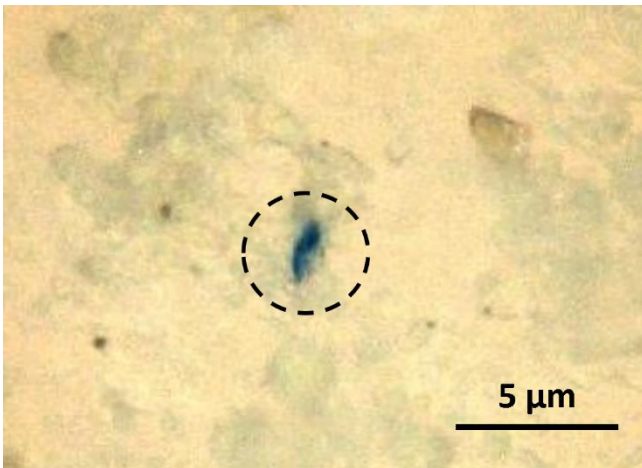
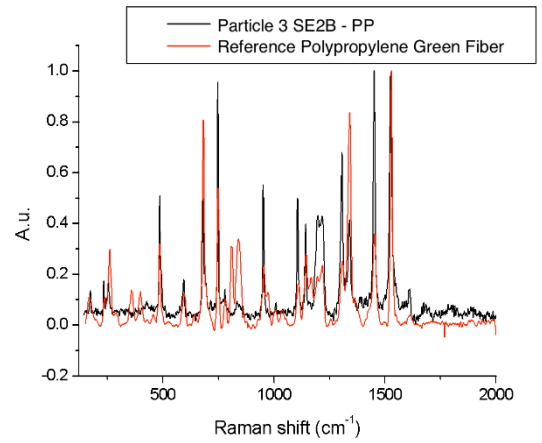
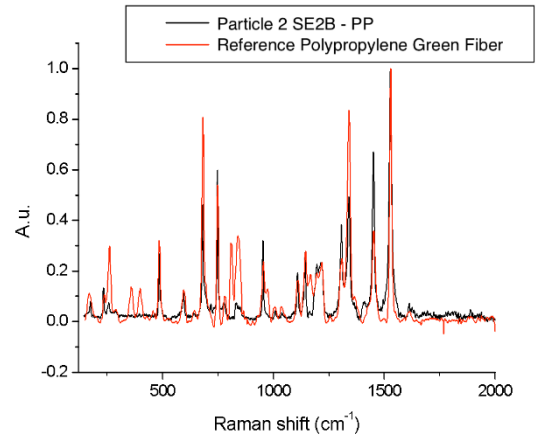
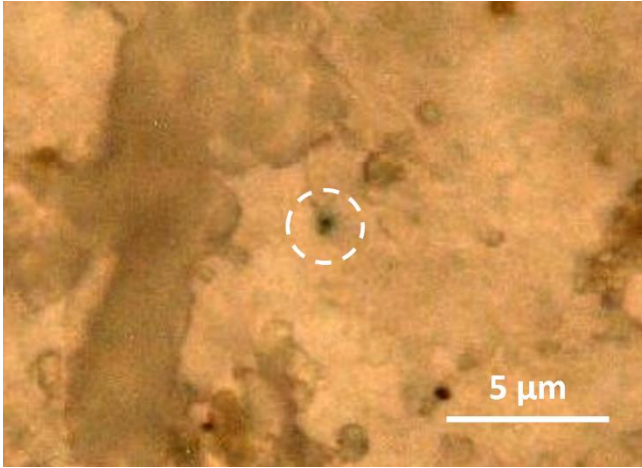


Fig A.3: Immagine Raman e relativo spettro dei polimeri nel campione Sant'Erasmus campagna Autunno-Inverno 2019





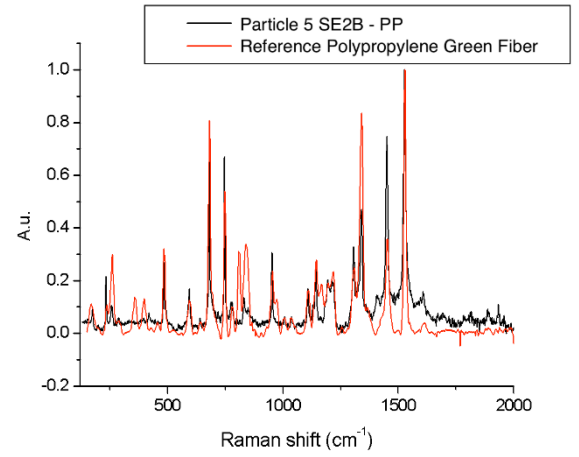
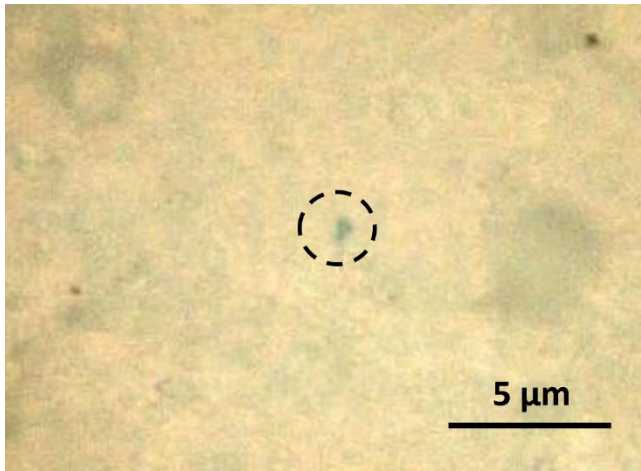


Fig A.4: Immagine Raman e relativo spettro dei polimeri nel campione Sant'Erasmus campagna Estate 2020

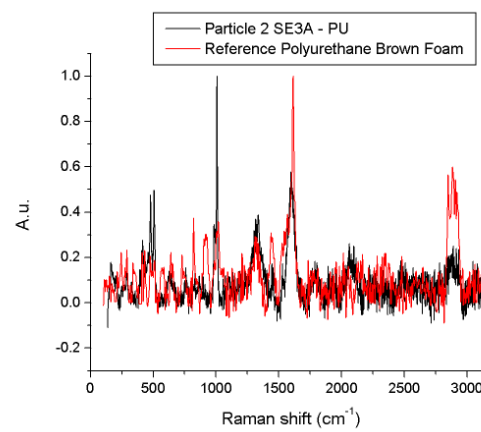
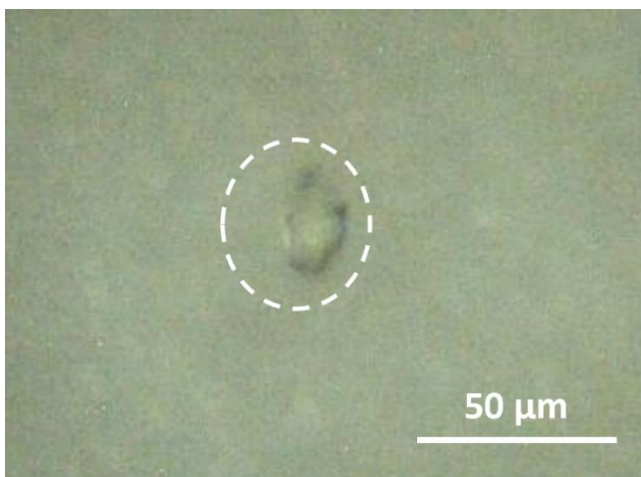
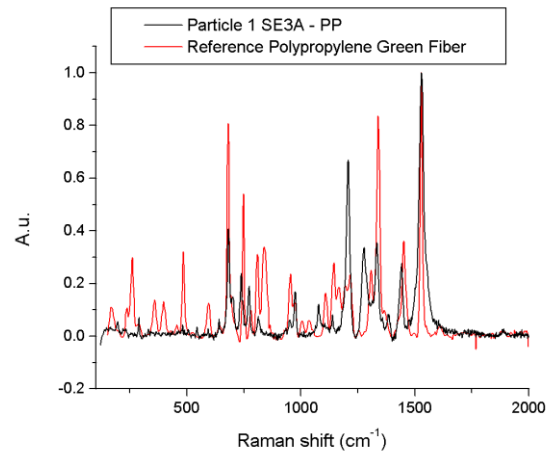
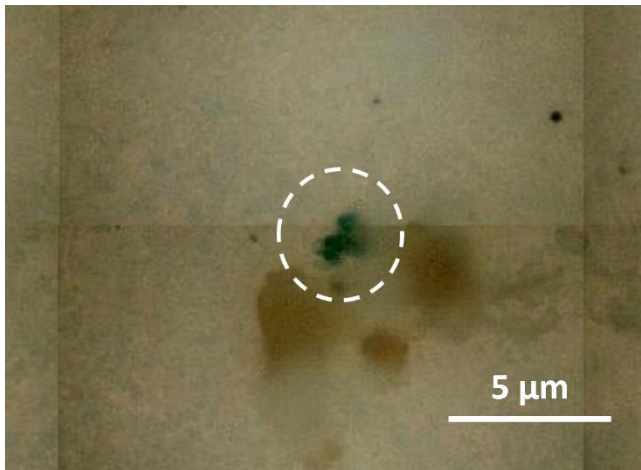


Fig A.5: Immagine Raman e relativo spettro dei polimeri nel campione Palude Maggiore campagna Autunno-Inverno 2019

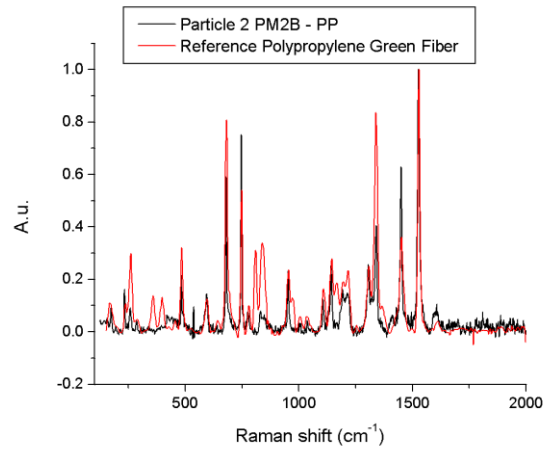
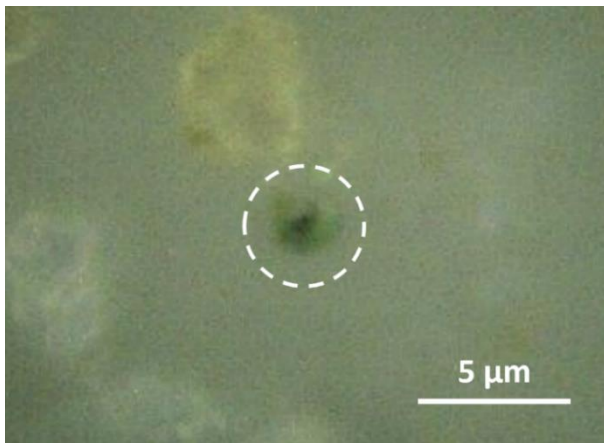
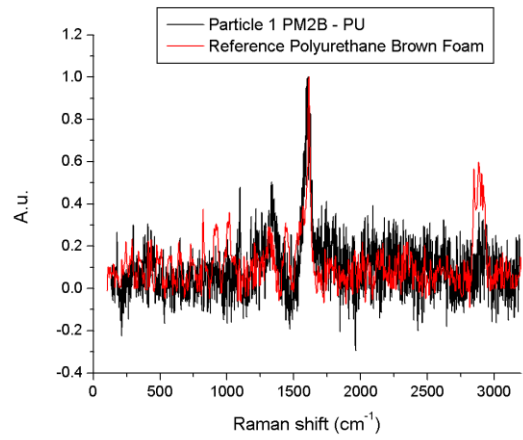
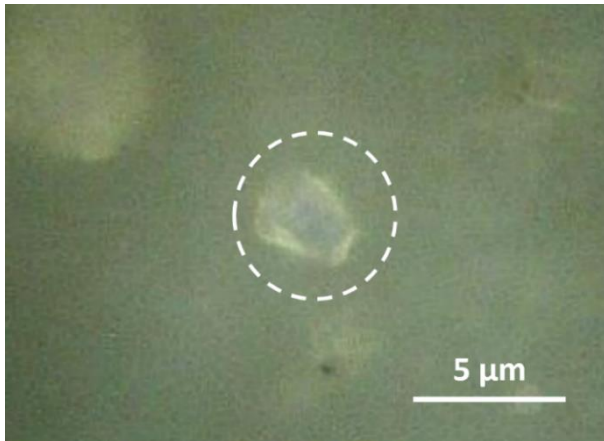
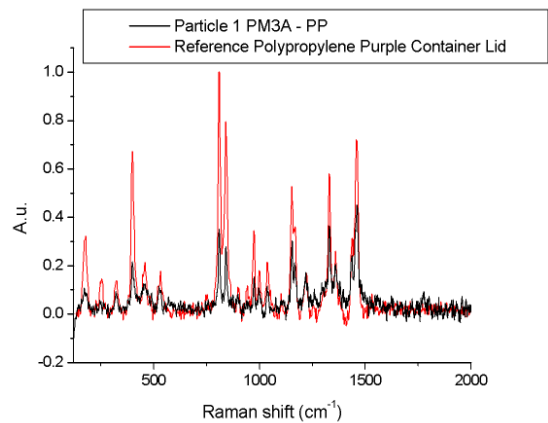
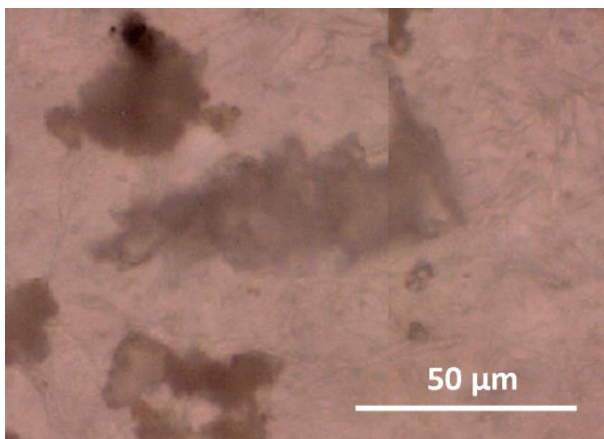


Fig A.6: Immagine Raman e relativo spettro dei polimeri nel campione Palude Maggiore campagna Estate 2020



## BIBLIOGRAFIA

- Ab Rashid, M. F. and Darus, N. A. (2022) 'Research Trends on The Presence of Microplastic Particles in The Environment and The Impact of Microplastics Around the World From 2010 - 2022: A Literature Review and Bibliometric Analysis', *International Journal of Academic Research in Business and Social Sciences*, 12(6). doi: 10.6007/ijarbss/v12-i6/13334.
- Ali, Muhammad Ubaid *et al.* (2021) 'Environmental emission, fate and transformation of microplastics in biotic and abiotic compartments: Global status, recent advances and future perspectives', *Science of the Total Environment*, 791, p. 148422. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148422.
- Alprol, A. E., Gaballah, M. S. and Hassaan, M. A. (2021a) 'Micro and Nanoplastics analysis: Focus on their classification, sources, and impacts in marine environment', *Regional Studies in Marine Science*, 42, p. 101625. doi: 10.1016/J.RSMA.2021.101625.
- Alprol, A. E., Gaballah, M. S. and Hassaan, M. A. (2021b) 'Micro and Nanoplastics analysis: Focus on their classification, sources, and impacts in marine environment', *Regional Studies in Marine Science*, 42, p. 101625. doi: 10.1016/j.rsma.2021.101625.
- Andrade, H. *et al.* (2021) 'Oceanic long-range transport of organic additives present in plastic products: an overview', *Environ Sci Eur*, 33, p. 85. doi: 10.1186/s12302-021-00522-x.
- Anger, P. M. *et al.* (2018a) 'Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 109, pp. 214–226. doi: 10.1016/J.TRAC.2018.10.010.
- Anger, P. M. *et al.* (2018b) 'Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 109, pp. 214–226. doi: 10.1016/j.trac.2018.10.010.
- Araujo, C. F. *et al.* (2018) 'Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects', *Water Research*, 142, pp. 426–440. doi: 10.1016/j.watres.2018.05.060.
- Atoufi, H. D., Lampert, D. J. and Sillanpää, M. (no date) 'COVID-19, a double-edged sword for the environment: a review on the impacts of COVID-19 on the environment'. doi: 10.1007/s11356-021-16551-1/Published.
- Blum, M. M. and John, H. (2012) 'Historical perspective and modern applications of Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)', *Drug Testing and Analysis*, 4(3–4), pp. 298–302. doi: 10.1002/dta.374.
- Braga, F. *et al.* (2020) 'COVID-19 lockdown measures reveal human impact on water transparency in the Venice Lagoon', *Science of the Total Environment*, 736. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139612.
- Bridson, J. H. *et al.* (2021) 'Leaching and extraction of additives from plastic pollution to inform environmental risk: A multidisciplinary review of analytical approaches', *Journal of Hazardous Materials*, 414, p. 125571. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.125571.
- Cai, H. *et al.* (2021a) 'Analysis of environmental nanoplastics: Progress and challenges', *Chemical Engineering Journal*, 410, p. 128208. doi: 10.1016/J.CEJ.2020.128208.
- Cai, H. *et al.* (2021b) 'Analysis of environmental nanoplastics: Progress and challenges', *Chemical Engineering Journal*, 410, p. 128208. doi: 10.1016/j.cej.2020.128208.
- Caliceti, M. *et al.* (2002) 'Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice



lagoon', *Chemosphere*, 47(4), pp. 443–454. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00292-2.

Cecchi, T. (2021) 'Analysis of volatiles organic compounds in Venice lagoon water reveals COVID 19 lockdown impact on microplastics and mass tourism related pollutants', *Science of the Total Environment*, 783, p. 146951. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146951.

Chinfak, N. *et al.* (2021) 'Abundance, composition, and fate of microplastics in water, sediment, and shellfish in the Tapi-Phumduang River system and Bandon Bay, Thailand', *Science of The Total Environment*, 781, p. 146700. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.146700.

Corami, F. *et al.* (2020) 'A novel method for purification, quantitative analysis and characterization of microplastic fibers using Micro-FTIR', *Chemosphere*, 238, p. 124564. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124564.

Corami, F. *et al.* (2021a) 'Small microplastics (<100 µm), plasticizers and additives in seawater and sediments: Oleo-extraction, purification, quantification, and polymer characterization using Micro-FTIR', *Science of the Total Environment*, 797, p. 148937. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148937.

Corami, F. *et al.* (2021b) 'Small microplastics (<100 µm), plasticizers and additives in seawater and sediments: Oleo-extraction, purification, quantification, and polymer characterization using Micro-FTIR', *Science of the Total Environment*, 797, p. 148937. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148937.

Cosa, E. (2018) 'Microplastiche: origini, effetti e soluzioni', pp. 1–4.

Cózar, A. *et al.* (2015) 'Plastic accumulation in the mediterranean sea', *PLoS ONE*, 10(4). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0121762.

Crossman, J. *et al.* (2020) 'Transfer and transport of microplastics from biosolids to agricultural soils and the wider environment', *Science of the Total Environment*, 724, p. 138334. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138334.

Do, A. T. N., Ha, Y. and Kwon, J.-H. (2022) 'Leaching of microplastic-associated additives in aquatic environments: A critical review', *Environmental Pollution*, 305, p. 119258. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2022.119258.

Duan, J. *et al.* (2021) 'Weathering of microplastics and interaction with other coexisting constituents in terrestrial and aquatic environments', *Water Research*, 196, p. 117011. doi: 10.1016/J.WATRES.2021.117011.

Edwards, H. G. M. (2005) *Modern Raman spectroscopy—a practical approach*. Ewen Smith and Geoffrey Dent. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2005. Pp. 210. ISBN 0 471 49668 5 (cloth, hb); 0 471 49794 0 (pbk), *Journal of Raman Spectroscopy*. doi: 10.1002/jrs.1320.

European Commission (2019) 'DIRETTIVA (UE) 2019/904 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 5 giugno 2019 sulla riduzione dell'incidenza di determinati prodotti di plastica sull'ambiente', *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, 155(2), pp. 1–19.

Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana (2020) 'Decreto del presidente del consiglio dei ministri 9 marzo 2020 n.14. Ulteriori disposizioni attuative del decreto legge 23/02/2020 n.6 " Misure urgenti di contenimento e gestione dell'emergenza epidemiologica da COVID19', *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Edizione S(62), pp. 1–6. Available at: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2020/03/09/20A01558/sg>.

Gigault, J. *et al.* (2018) 'Current opinion: What is a nanoplastic?', *Environmental Pollution*, 235, pp. 1030–1034. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2018.01.024.

Goh, P. S., Ismail, A. F. and Ng, B. C. (2017) 'Raman Spectroscopy', *Membrane Characterization*, pp. 31–46. doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00002-4.

- Gonçalves, J. M. and Bebianno, M. J. (2021) 'Nanoplastics impact on marine biota: A review', *Environmental Pollution*, 273, p. 116426. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2021.116426.
- Granite (2020) 'What is Raman Spectroscopy? | Raman Spectroscopy Principle', *Edinburgh Instruments*, pp. 1–5. Available at: <https://www.edinst.com/blog/what-is-raman-spectroscopy/> <http://files/1445/what-is-raman-spectroscopy.html>.
- Henderson, A. M. (1993) 'Ethylene-Vinyl Acetate (EVA) Copolymers: A General Review', *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 9(1), pp. 30–38. doi: 10.1109/57.249923.
- Hodgkin, J. (2001) 'Thermosets: Epoxies and Polyesters', in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Elsevier, pp. 9215–9221. doi: 10.1016/b0-08-043152-6/01660-0.
- Hu, K. *et al.* (2022) 'Emerging microplastics in the environment: Properties, distributions, and impacts', *Chemosphere*, 297, p. 134118. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.134118.
- Ivleva, N. P. (2021) 'Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives', *Chemical Reviews*, 121(19), pp. 11886–11936. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00178.
- Jubenville, D. *et al.* (2020) 'A comprehensive review of global production and recycling methods of polyolefin (PO) based products and their post-recycling applications', *Sustainable Materials and Technologies*, 25, p. e00188. doi: 10.1016/j.susmat.2020.e00188.
- K.L., P. *et al.* (2022) 'Fate, transport and degradation pathway of microplastics in aquatic environment—A critical review', *Regional Studies in Marine Science*, 56, p. 102647. doi: 10.1016/j.rsma.2022.102647.
- Käppler, A. *et al.* (2015) 'Identification of microplastics by FTIR and Raman microscopy: a novel silicon filter substrate opens the important spectral range below 1300 cm<sup>-1</sup> for FTIR transmission measurements', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(22), pp. 6791–6801. doi: 10.1007/s00216-015-8850-8.
- Käppler, A. *et al.* (2016) 'Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(29), pp. 8377–8391. doi: 10.1007/s00216-016-9956-3.
- Karlsson, T. M. *et al.* (2020) 'Comparison between manta trawl and in situ pump filtration methods, and guidance for visual identification of microplastics in surface waters', *Environmental Science and Pollution Research*, 27(5), pp. 5559–5571. doi: 10.1007/s11356-019-07274-5.
- Kihara, S. *et al.* (2021) 'Reviewing nanoplastic toxicology: It's an interface problem', *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, p. 102337. doi: 10.1016/J.CIS.2020.102337.
- Koelmans, A. A. *et al.* (2019) 'Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality', *Water Research*, 155, pp. 410–422. doi: 10.1016/J.WATRES.2019.02.054.
- Krishna, R., Unsworth, T. J. and Edge, R. (2016) 'Raman Spectroscopy and Microscopy', *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.03091-5.
- Kundu, A. *et al.* (2021) 'Identification and removal of micro- and nano-plastics: Efficient and cost-effective methods', *Chemical Engineering Journal*, 421(P1), p. 129816. doi: 10.1016/j.cej.2021.129816.
- Lebreton, L. *et al.* (2018) 'Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-018-22939-

w.

- Lenz, R. *et al.* (2015) 'A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement', *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), pp. 82–91. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.09.026.
- Li, W. *et al.* (2022) 'Migration behaviors of microplastics in sediment-bearing turbulence: Aggregation, settlement, and resuspension', *Marine Pollution Bulletin*, 180, p. 113775. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113775.
- Li, W. C., Tse, H. F. and Fok, L. (2016a) 'Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects', *Science of The Total Environment*, 566–567, pp. 333–349. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.084.
- Li, W. C., Tse, H. F. and Fok, L. (2016b) 'Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects', *Science of the Total Environment*, 566–567, pp. 333–349. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.084.
- Li, Z. *et al.* (2007) 'Application of attenuated total reflectance micro-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy to the study of coal macerals: Examples from the Bowen Basin, Australia', *International Journal of Coal Geology*, 70(1-3 SPEC. ISS.), pp. 87–94. doi: 10.1016/j.coal.2006.01.006.
- Lichvár, P., Liška, M. and Galusek, D. (2002) 'What is the true Kramers-Kronig transform?', *Ceramics - Silikaty*, 46(1), pp. 25–27.
- Liu, L. *et al.* (2022) 'On the degradation of (micro)plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts', *Science of The Total Environment*, 806, p. 151312. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.151312.
- de Lucia, G. A. *et al.* (2018) 'Sea water contamination in the Vicinity of the Italian minor islands caused by microplastic pollution', *Water (Switzerland)*, 10(8). doi: 10.3390/w10081108.
- Luo, H. *et al.* (2022) 'Environmental behaviors of microplastics in aquatic systems: A systematic review on degradation, adsorption, toxicity and biofilm under aging conditions', *Journal of Hazardous Materials*, 423, p. 126915. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.126915.
- Madricardo, F. *et al.* (2019) 'Assessing the human footprint on the sea-floor of coastal systems: the case of the Venice Lagoon, Italy', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-43027-7.
- Magri, D. *et al.* (2018) 'Laser ablation as a versatile tool to mimic polyethylene terephthalate nanoplastic pollutants: Characterization and toxicology assessment', *ACS Nano*, 12(8), pp. 7690–7700. doi: 10.1021/acsnano.8b01331.
- Meijer, L. J. J. *et al.* (2021) 'More than 1000 rivers account for 80% of global riverine plastic emissions into the ocean', *Science Advances*, 7(18), pp. 1–14. doi: 10.1126/sciadv.aaz5803.
- Miao, L. *et al.* (2019) 'Distinct community structure and microbial functions of biofilms colonizing microplastics', *Science of the Total Environment*, 650, pp. 2395–2402. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.378.
- Mitrano, D. M., Wick, P. and Nowack, B. (no date) 'Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution'. doi: 10.1038/s41565-021-00888-2.
- Mofijur, M. *et al.* (2021) 'Source, distribution and emerging threat of micro- and nanoplastics to marine organism and human health: Socio-economic impact and management strategies', *Environmental Research*, 195(February), p. 110857. doi:

- 10.1016/j.envres.2021.110857.
- Mullins, M. J., Liu, D. and Sue, H.-J. (2012) 'Mechanical properties of thermosets', *Thermosets*, pp. 28–61. doi: 10.1533/9780857097637.1.28.
- Nguyen, B. *et al.* (2019) 'Separation and Analysis of Microplastics and Nanoplastics in Complex Environmental Samples', *Accounts of Chemical Research*, 52(4), pp. 858–866. doi: 10.1021/acs.accounts.8b00602.
- Oßmann, B. E. *et al.* (2018) 'Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water', *Water Research*, 141, pp. 307–316. doi: 10.1016/j.watres.2018.05.027.
- Ouyang, W. *et al.* (2020) 'Seasonal relevance of agricultural diffuse pollutant with microplastic in the bay', *Journal of Hazardous Materials*, 396, p. 122602. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2020.122602.
- Patil, S. M. *et al.* (2022) 'An assessment of micro- and nanoplastics in the biosphere: A review of detection, monitoring, and remediation technology', *Chemical Engineering Journal*, 430, p. 132913. doi: 10.1016/J.CEJ.2021.132913.
- 'Plastics Europe Association of Plastics Manufacturers Plastics—The Facts 2021 An analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data' (2021). Available at: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>.
- Qiao, J. *et al.* (2011) 'Recent advances in polyolefin technology', *Polymer Chemistry*, 2(8), pp. 1611–1623. doi: 10.1039/c0py00352b.
- Radulovic, L. L. and Wojcinski, Z. W. (2014) *PTFE (Polytetrafluoroethylene; Teflon®)*. Third Edit, *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. Third Edit. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00970-2.
- Rova, S., Pranovi, F. and Müller, F. (2015) 'Provision of ecosystem services in the lagoon of Venice (Italy): An initial spatial assessment', *Ecology and Hydrobiology*, 15(1), pp. 13–25. doi: 10.1016/j.ecohyd.2014.12.001.
- Sánchez-Solís, A. and Estrada, M. R. (1996) 'On the influence of sands on low density polyethylene photodegradation', *Polymer Degradation and Stability*, 52(3), pp. 305–309. doi: 10.1016/0141-3910(96)00030-4.
- Santana-Viera, S. *et al.* (2021) 'Organic pollutants adsorbed on microplastics: Analytical methodologies and occurrence in oceans', *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 29, p. e00114. doi: 10.1016/J.TEAC.2021.E00114.
- Schymanski, D. *et al.* (2021) 'Analysis of microplastics in drinking water and other clean water samples with micro-Raman and micro-infrared spectroscopy: minimum requirements and best practice guidelines', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(24), pp. 5969–5994. doi: 10.1007/s00216-021-03498-y.
- Selvam, S. *et al.* (2020) 'Imprints of pandemic lockdown on subsurface water quality in the coastal industrial city of Tuticorin, South India: A revival perspective', *Science of The Total Environment*, 738, p. 139848. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.139848.
- Sendra, M. *et al.* (2021) 'An integrative toxicogenomic analysis of plastic additives', *Journal of Hazardous Materials*, 409, p. 124975. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2020.124975.
- Shen, M. *et al.* (2021) 'Neglected microplastics pollution in global COVID-19: Disposable surgical masks', *Science of The Total Environment*, 790, p. 148130. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.148130.
- Sisanth, K. S. *et al.* (2017) *General introduction to rubber compounding, Progress in Rubber Nanocomposites*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-08-100409-8.00001-2.
- Sudhakar, M. *et al.* (2007) 'Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters',

- Polymer Degradation and Stability*, 92(9), pp. 1743–1752. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.03.029.
- Thompson, J. M. (2018) 'Some Fundamentals of Infrared Spectroscopy', *Infrared Spectroscopy*, pp. 1–33. doi: 10.1201/9781351206037-1.
- Tirkey, A. and Upadhyay, L. S. B. (2021) 'Microplastics: An overview on separation, identification and characterization of microplastics', *Marine Pollution Bulletin*, 170, p. 112604. doi: 10.1016/J.MARPOLBUL.2021.112604.
- UKIEMATO, †TOMOHIKO ISOBE, †HIDESHIGETAKADA, Y. and UYUKI KANEHIRO, ‡CHIYOKO OHTAKE, §AND TSUGUCHIKAKAMINUMA, H. A. R. (2001) 'Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment'. doi: 10.1021/es0010498.
- Della Ventura, G. *et al.* (2010) 'Application of micro-FTIR imaging in the Earth sciences', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(6), pp. 2039–2049. doi: 10.1007/s00216-010-3811-8.
- Vianello, A. *et al.* (2013) 'Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, pp. 54–61. doi: 10.1016/j.ecss.2013.03.022.
- Wang, X. *et al.* (2021) 'A review of microplastics aggregation in aquatic environment: Influence factors, analytical methods, and environmental implications', *Journal of Hazardous Materials*, 402(March 2020), p. 123496. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123496.
- Wiesinger, H., Wang, Z. and Hellweg, S. (2021) 'Deep Dive into Plastic Monomers, Additives, and Processing Aids', *Cite This: Environ. Sci. Technol*, 55, p. 9351. doi: 10.1021/acs.est.1c00976.
- Xi, B. *et al.* (2022) 'Environmental behaviors and degradation methods of microplastics in different environmental media', *Chemosphere*, 299, p. 134354. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.134354.
- Yee, M. S. L. *et al.* (2021) 'Impact of microplastics and nanoplastics on human health', *Nanomaterials*, 11(2), pp. 1–23. doi: 10.3390/nano11020496.
- Yusoff, F. M. *et al.* (2021) 'Impacts of COVID-19 on the Aquatic Environment and Implications on Aquatic Food Production', 13, p. 11281. doi: 10.3390/su132011281.
- Zhang, K. *et al.* (2021) 'Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review', *Environmental Pollution*, 274, p. 116554. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2021.116554.
- Zhang, W., Wang, Q. and Chen, H. (2022) 'Challenges in characterization of nanoplastics in the environment', *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 16(1), pp. 10–12. doi: 10.1007/s11783-021-1445-z.
- Zhao, S. *et al.* (2017) 'An approach for extraction, characterization and quantitation of microplastic in natural marine snow using Raman microscopy', *Analytical Methods*, 9(9), pp. 1470–1478. doi: 10.1039/c6ay02302a.
- Zhao, X. *et al.* (2022) 'Plastic waste upcycling toward a circular economy', *Chemical Engineering Journal*, 428, p. 131928. doi: 10.1016/J.CEJ.2021.131928.