



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00528**

(22) Data de depozit: **26/09/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2024 BOPI nr. **1/2024**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA VALAHIA DIN
TÂRGOVIȘTE, ALEEA SINAIA, NR.13,
TÂRGOVIȘTE, DB, RO**

(72) Inventatori:
• **RĂDULESCU CRISTIANA,
STR. JUSTIȚIEI NR. 23, TÂRGOVIȘTE, DB,
RO;**
• **DULAMĂ IOANA-DANIELA, STR.GÎLMEIA
NR.13, COMARNIC, PH, RO;**
• **BĂNICĂ ANDREEA- LAURA,
STR.CUZA-VODĂ, NR.51, ALEXANDRIA,
TR, RO;**

• **BUCURICĂ IOAN ALIN, ȘOS.NAȚIONALĂ
NR.119, SAT BĂNEȘTI, COMUNA
BĂNEȘTI, PH, RO;**
• **ȘTIRBESCU RALUCA- MARIA,
STR.GURA VĂII, NR.10, SAT VALEA
VOIEVOZILOR, COMUNA RĂZVAD, DB,
RO;**
• **GORGHIU LAURA MONICA, BD.UNIRII,
NR.19, BL.64, SC.B, ET.2, AP.54,
TÂRGOVIȘTE, DB, RO**

*Această publicație include și modificările descrierii,
revendicărilor și desenelor depuse conform art.35
alin.(20) din HG nr.547/2008*

(54) **METODĂ RAPIDĂ DE IZOLARE A MICROPLASTICELOR DIN
LAPTE, IAURT, SMÂNTÂNĂ ȘI UNT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de izolare a microplasticilor (MPs) din lapte și derivate procesate din lapte (iaurt, smântână și unt), cu aplicabilitate în domeniul siguranței alimentare. Metoda, conform invenției, constă în următoarele etape:

A- pretratarea materiei prime (lapte și produse procesate din lapte cu conținut ridicat de grăsime) cu reactivi de puritate avansată în următoarele rapoarte masice: lapte:apă oxigenată de 10:1, iaurt:NaOH:apă distilată de 1:0,2:100, smântână: dodecilsulfat de sodiu:NaOH:apă distilată de 1:0,1:0,12:100, unt:dodecilsulfat de sodiu: NaOH: apă distilată de 1:0,5:0,125:62,5, pentru digestia matricei organice com-

plexe și omogenizarea prin agitare la 150 rpm, timp de 20 min,

B - digestia propriu-zisă prin ultrasonare la 30°C, timp de 20 min,

C - filtrare sub vid pe filtre cu porozitate de 12...15 μm și menținerea amestecului pe baia de apă la 60°C până la filtrarea completă; în final MPs izolate sunt cuantificate și caracterizate prin tehnici analitice complexe.

Revendicări: 5

Figuri: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 223 0528</u>
Data depozit <u>26-09-2023</u>

57

METODĂ RAPIDĂ DE IZOLARE A MICROPLASTICELOR DIN LAPTE, IAURT, SMÂNTÂNĂ ȘI UNT

Invenția se referă la METODĂ RAPIDĂ DE IZOLARE A MICROPLASTICELOR DIN LAPTE, IAURT, SMÂNTÂNĂ ȘI UNT cu aplicabilitate în domeniul industriei și securității alimentare. Metoda de izolare este caracterizată prin aceea că pentru realizare necesită o succesiune de 3 etape: A. pretratarea probelor cu reactivi ultrapuri necesari digestiei matricei organice complexe și omogenizarea prin agitare la 150 rpm, timp de 10 minute; B. digestia propriu-zisă prin ultrasonare la 30°C, timp de 20 minute; C. filtrarea sub vid pe filtre cu porozitate 12-15 μm .

Conform invenției, metoda poate fi aplicată pentru fiecare produs, din categoria menționată, indiferent de conținutul de grăsime al acestuia. Termenul "metodă de izolare" folosit în prezenta invenție include o serie de procedee individuale, care necesită o cantitate mică de reactivi chimici uzuali și echipamente de cercetare uzuale laboratoarelor de analiză/cercetare.

Avantajul principal al invenției este faptul că își găsește o utilitate practică în industria alimentară (laboratoare de analiză primară, analiză complexă, control de calitate a materiei prime, respectiv a produselor finite, compartiment de informare a consumatorului/Autoritatea Națională pentru Protecția Consumatorilor), cu rol de avertizare asupra riscului de contaminare cu microplastice asupra sănătății umane, dar și rol de avertizare și conștientizare a furnizorilor și procesatorilor în vederea îmbunătățirii procesului tehnologic și al produselor finite.

Toate aceste considerente stau la baza conceptului acestei invenții care permite o **izolare rapidă, eficientă și cu costuri reduse a microplasticelor din lapte, iaurt, smântână și unt.**

În ultimii ani, la nivel internațional, dar și la nivelul României, o serie de contaminanți chimici, de origine antropogenă, adesea etichetați drept *Contaminants of Emerging Concern (CECs)*, cum ar fi compușii perfluorinați, alchilfenolii, produsele farmaceutice, pesticidele, metalele carcinogene, polimeri ș.a. prezenți în apă, sol, aer și implicit în lanțul trofic prin alimente, au intrat în atenția autorităților, dar și a cercetătorilor, în ceea ce privește riscul pentru mediu și implicit pentru sănătatea umană.

În ultimii ani s-a tot încercat reglementarea de către Uniunea Europeană în ceea ce privește monitorizarea și evaluarea impactului microplasticelor asupra mediului. Cele mai multe studii și reglementări au fost îndreptate asupra apelor și a mediului acvatic (inclusiv mediului marin) – Directiva Cadru Strategia pentru Mediul Marin adoptată la 17 iunie 2008, a fost revizuită în 2017 cu introducerea reglementărilor privind poluarea cu microplastic. În ceea ce privește prezența microplasticelor în produsele alimentare, cele mai multe studii au fost realizate pe apă potabilă, pește, crustacee și fructe de mare (Abidli și colab., 2019; Akhbarizadeh și colab., 2019; Akoueson și colab., 2020; Barboza și colab., 2020; Birnstiel și colab., 2019; Bour și colab., 2018; Bonello și colab., 2018; Dalmau-Soler și colab., 2021; Daniel și colab., 2020; Ding și colab., 2019; Kankanige D. și colab., 2020; DIRECTIVA 2008/56/CE A PARLAMENTULUI EUROPEAN ȘI A CONSILIULUI din 17 iunie 2008 de instituire a unui cadru de acțiune comunitară în domeniul politicii privind mediul marin (Directiva-cadru „Strategia pentru mediul marin”)).

Având în vedere faptul că la nivelul României nu există o legislație specifică monitorizării conținutului de microplastice din produse alimentare și implicit nu există studii de specialitate realizate în acest domeniu, considerăm că **prezența invenție este una originală, de actualitate, cu înalt grad de noutate** în direcțiile prioritare ale Strategiei Naționale de Cercetare, Dezvoltare și Inovare (SNCDI 2021-2027). Astfel, invenția reprezintă un punct important de pornire pentru izolarea, cuantificarea și caracterizarea microplasticelor din lapte, iaurt, smântână și unt, cu scopul stabilirii unor limite / praguri / valori admisibile necesare evaluării riscului asupra sănătății umane.

O astfel de preocupare la nivel mondial este de înțeles deoarece o serie de fragmente minuscule de plastic, de forme și dimensiuni variate, având compoziții diferite și nebiodegradabile, ajung rapid în ecosistemele marine, de apă dulce și terestre și implicit în apa potabilă și lanțul alimentar (Zhou și colab., 2023; Andrady, 2017; Laskar și Kumar, 2019; Pham și colab., 2023). Microplasticele (MPs) sunt fragmente solide de dimensiuni extrem de mici (< 5 mm), de obicei fibre, care conțin în principal diferiți polimeri (de exemplu, cei obișnuiți sunt polietilena (PE), polistirenul (PS), polipropilena (PP), polietilen tereftalatul (PET) și nailon) și aditivi utilizați în procesul inițial de polimerizare (Andrady, 2017; Banica și colab., 2023). Fibrele, precum și fragmentele de dimensiuni mici incluse în categoria microplasticelor secundare sunt unul dintre cei mai răspândiți contaminanți emergenți (EC) (Geissen și colab.,

2015). Pe de altă parte, MPs, cu o suprafață mare și proprietăți hidrofobe, pot adsorbi antibiotice, metale grele, precum și alți compuși nocivi, prezentând pericole semnificative atât pentru oameni, cât și pentru mediu (Bai și colab., 2023).

Cele mai comune structuri polimerice raportate în MPs (Li și colab., 2019), identificate prin diferite tehnici vibraționale - cum ar fi μ -FTIR (Banica și colab., 2023; Jenner și colab., 2022; Montano și colab., 2023; Campanale și colab., 2023) și μ -Raman (Beckingham și colab., 2023; Wirmkor și colab., 2019) - au fost nailon-12 (poliamidă-12), nailon-6, polibutilen tereftalat, polietilenă izotereftalat, polietilen tereftalat, polimetil metilacrilat, polipentaeritritil tereftalat, polipropilen tereftalat, polietilenă, polipropilenă, polistiren, polietilen (tefluoroetilen, poliacrilat), polietilenă (tefluoroetil), copolimeri de stearat de alil/acetat de vinil, copolimer de atilenă/metilacrilat, copolimer de etilenă/acrilat, copolimer de butilenă/etilenă/stiren, copolimer de acilați de stiren, trimetilsiloxisilicat. Acesta este motivul pentru care este important să se măsoare și să se evalueze riscurile de toxicitate, persistență și bioacumulare a MP la oameni, și în special la copii.

Microplasticele au fost identificate în aproape toate organismele acvatice, cu implicații directe în lanțul alimentar. Conform cercetărilor recente, s-a descoperit că MPs au o influență asupra diferitelor țesuturi și celule din diferite organe ale corpului uman, inclusiv plămâni (Amato-Lourenco și colab., 2021). De asemenea, microplasticele pot adsorbi și transporta pe suprafața lor micropoluanți dăunători, cum ar fi nonilfenolii, împreună cu poluanții secundari cum ar fi bifenilii policlorurați (PCB) și diclorodifenildicloretilena (DDE) (Lusher și colab., 2017; Mistri și colab., 2021; Singh și colab., 2022; Rummel și colab., 2017).

Având în vedere că microplasticele sunt adesea invizibile pentru ochiul uman, ele sunt relativ ușor de ingerat de către oameni, în principal prin inhalare sau ingerare. Alimentele conțin cea mai mare cantitate de microplastice care ajung în organismul uman. Mai multe studii au raportat că fructele și legumele (Li și colab., 2019; Conti și colab., 2020), precum și plantele medicinale (Lu și colab., 2020) conțin o cantitate semnificativă de fragmente microplastice și nanoplastice absorbite de rădăcinile fructelor, legumelor și plantelor din sol. Evident, contaminarea alimentelor proaspete cu MPs se regăsește și în produsele procesate sau derivate, cum ar fi ceaiul ambalat sau ceaiul rece, sucuri naturale sau alte băuturi răcoritoare, așa cum au subliniat Shruti și colab. (2020). În concluzie, la consumul de legume proaspete, fructe și plante

medicinale se presupune că contaminarea se transmite în lanțul alimentar, prin produsele procesate și în cele din urmă către oameni (Kadac-Czapska și colab., 2022).

Un alt aliment zilnic important folosit de oameni este sarea și studii au raportat că conține și fragmente de microplastic (Karami și colab., 2017; Lee și colab., 2021; Kosuth și colab., 2018), dar cea mai interesantă întrebare se referă la prezența microplasticelor în laptele crud sau de marcă și dacă este posibil ca acest aliment să fi imun la contaminarea cu microplastice. Câteva studii timide au încercat să răspundă acestei dileme, dar mai degrabă incomplet și mai mult prin prisma presupunerilor (Kutralam-Muniasamy și colab., 2020; Diaz-Basantes și colab., 2020). De ce sunt atât de puține studii? Pentru că, spre deosebire de alte alimente precum apa, peștele, fructele, legumele, plantele, băuturile (sucuri, băuturi energizante sau bere) și chiar și carnea, laptele este un aliment extrem de complex. Complexitatea laptelui este dată de compoziția sa chimică (substanță grasă: grăsimi - gliceride, fosfatide și steroizi; substanță fără grăsimi: proteine - cazeine și proteine sterice, lactoză, minerale - Ca, Se, Zn, Mg, I - și alte substanțe fără grăsime precum enzimele, vitaminele, pigmenții, gazele), fiind considerat cel mai complet aliment. Pe de altă parte, datorită pH-ului său neutru, conținutului ridicat de apă și nutrienți, laptele crud este un produs extrem de perisabil care servește ca substrat optim de creștere pentru agenții patogeni (Lencho și Seblewongel, 2018 ; Yenew și colab., 2020). Efectele pozitive asupra sănătății pot rezulta din prezența acidului oleic, acidului linoleic conjugat, acizilor grași omega-3, acizilor grași cu lanț scurt și mediu, vitaminelor, mineralelor și substanțelor bioactive. S-a demonstrat că laptele cu conținut ridicat de grăsime prelungește timpul de tranzit gastrointestinal prin creșterea timpului mediu de digestie în comparație cu laptele semi-degresat. Triacilglicerolii sunt alcătuiți din acizi grași saturați (4-24 atomi de C) și reprezintă aproximativ 95% din componenta lipidică. Fiecare moleculă de triacilglicerol are un aranjament de acizi grași care îi conferă o formă lichidă la temperatura corpului. Alte lipide din lapte includ acizii grași liberi (FFA), care reprezintă mai puțin de 0,5% din toate lipidele din lapte, colesterolul (mai puțin de 0,5% din fracția lipidică), fosfolipidele (aproximativ 1%) și diacilglicerol (aproximativ 2% din fracțiunea lipidică) (Keenan and Patton, 1995; Jensen and Newburg, 1995; Haug și colab., 2007). Mai mult de jumătate din acizii grași din lapte sunt saturați (de exemplu, acid butiric, acid caprilic, acid capric, acid lauric), reprezentând aproximativ 19 g/L de lapte. Singurul acid gras nesaturat cu cel mai mare conținut în lapte este acidul oleic (18:1c9) care se ridică la aproximativ 8 g/L de lapte integral. În consecință, laptele

contribuie substanțial la aportul alimentar de acid oleic (Haug și colab., 2007). Acidul oleic reprezintă aproximativ 25% din grăsimea din lapte, iar raportul dintre acidul oleic și acizii grași polinesaturați este relativ mare (Alfthan și colab., 1997). Aproximativ 2 g/L de acizi grași polinesaturați sunt prezenți în lapte, dintre care majoritatea sunt acizi linoleic (18:2 omega-6) și α -linolenic (18:3 omega-3). Acești acizi grași pot fi transformați în acizi grași cu 20 de atomi de carbon, cum ar fi acidul arahidonic (20:4 omega-6) și acidul eicosapentaenoic (20:5 omega-3) (Haug și colab., 2007). Aproximativ 1% din totalul lipidelor din lapte sunt fosfolipide și glicosfingolipide. Comparativ, în aceste lipide sunt prezenți mai mulți acizi grași polinesaturați decât în triacilgliceroli (Jensen și Newburg, 1995). În plus, aproximativ 80% din compoziția proteică a laptelui este cazeină. Scopul biologic al cazeinei este de a transporta calciul și fosfatul de calciu în organism. Aminoacizii esențiali și aminoacizii cu lanț ramificat se găsesc în cantități mai mari în lapte și au funcții specifice în metabolismul uman (Nilsson și colab., 2007). Pornind de la această scurtă descriere a compoziției chimice a laptelui, se poate observa de ce investigațiile privind prezența MP sunt limitate.

Luând în considerare matricea organică complexă a laptelui, ca materie primă pentru produse procesate, prezenta invenție propune o metodă de referință privind izolarea/separarea MPs din lapte, iaurt, smântână și unt. Aceasta a fost testată cu succes pe produse comercializate sub mărci variate, din categoria produselor bio și non-bio, cu conținut diferit de grăsime. De asemenea, metoda propusă a fost testată pe lapte crud și derivate din lapte colectate de la micii fermieri. Pentru o imagine completă privind relația cauză-efect, cercetările inventatorilor s-au finalizat cu o serie de tehnici analitice fizico-chimice complexe: microscopie optică, microscopie electronică cu baleiaj (SEM), spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier cuplată cu microscopie optică (μ -FTIR), care vin să susțină în premieră importanța corelației compoziției chimice, structurii, mărimii, culorii și sursei de proveniență, contribuind la întocmirea unei baze de date referitoare la MPs din alimente.

Sunt cunoscute din **stadiul anterior** al tehnicii, procedee cum ar fi:

Documentul WO2021144321A1 *Detection of plastic microparticles in a milk based sample by flow cytometry* (de Franceschi F. și colab., 2021) care se referă la detecția microparticulelor de plastic din lapte folosind citometria în flux. În acest proces, digestia proteinelor, grăsimilor și carbohidraților se realizează folosind enzime sau amestecuri de enzime

prin incubarea la o temperatură cuprinsă în intervalul 20-70°C, timp de 2-60 minute. După digestie, probele au fost filtrate pe membrane de nitroceluloză cu pori de 0.1-6 µm. Membrana conținând particulele de plastic este incubată la un pH cuprins în intervalul 10-12, iar după îndepărtarea acestei membrane se diluează soluția și se analizează prin citometrie în flux.

Documentul WO2021144322A1 *Detection of plastic microparticles in a powder-based sample by flow cytometry* (Cominetti și colab., 2021) este realizat de același colectiv ca și precedentul, iar procedeul este similar – cu mențiunea că pudrele sunt hidratate în prealabil.

Documentul CN115436504A *Method for measuring contents of PP, PS and PE microplastics in food by pyrolysis gas chromatography* (Huang și colab., 2022) se referă la determinarea conținutului de polipropilenă, polistiren și polietilenă din probe alimentare (apă și sare de masă) prin gaz-cromatografie cu piroliză (Py-GC), însă procedeul de izolare nu se poate aplica în cazul laptelui sau al derivatelor din lapte.

Documentul CN116008048A *Method for evaluating tap water risk caused by aging of plastic water pipe* (He și colab., 2023) se referă la determinarea microplasticelor și aditivilor plastici din apa potabilă transportată prin conducte de plastic degradate/îmbătrânite, însă procedeul de izolare nu se poate aplica în cazul laptelui sau al derivatelor din lapte.

Documentul 10.1016/j.scitotenv.2020.136823 *Branded milks – Are they immune from microplastics contamination?* (Kutralam-Muniasamy și colab., 2020) se referă la izolarea și caracterizarea microplasticelor din lapte (lapte integral, lapte delactozat, formule pentru bebeluși, lapte proaspăt), însă protocolul de izolare prin simpla încălzire (fără a fi precizată temperatura) urmată de filtrare nu a putut fi aplicat în cazul laptelui sau al derivatelor din lapte întrucât filtrele de celuloză s-au colmatat, ceea ce înseamnă că autorii nu au luat în considerare matricea organică complexă a laptelui, metoda neputând fi reprodusă de niciun alt colectiv de autori prin prisma informațiilor lacunare.

Documentul 10.31883/pjfn/163061 *Microplastics in a Traditional Turkish Dairy Product: Ayran* (Buyukunal și colab., 2023) se referă la izolarea și caracterizarea microplasticelor din lapte, smântână, culturi starter, și Ayran (produs fermentat din lapte cu adaos de apă și sare). În acest caz, metoda de izolare este mare consumatoare de reactivi: 20 mL probă se amestecă cu 20 mL apă ultrapură (fără microplastice) și 2 mL detergent multienzimatic; se amestecă timp de 2 minute la 40°C, apoi se adaugă 10 mL acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) și se amestecă 3 minute la 40°C. În final se adaugă 2 mL hidrat de tetrametilamoniu, se

incubează amestecul la 80°C timp de 1 minut și se filtrează imediat. Metoda nu furnizează informații referitoare la conținutul de grăsime al laptelui, smântânii sau ayranului, originea acestora, precum și specia animală a laptelui/smântânii. Din descrierea studiului se concluzionează faptul că s-a urmărit procesul tehnologic de obținere a ayranului și evidențierea punctelor critice de control pe fluxul tehnologic astfel încât să se reducă gradul de contaminare cu microplastice.

Soluțiile tehnice din procedeele/metodele descrise mai sus prezintă următoarele dezavantaje:

- Documentele WO2021144321A1 și WO2021144322A1 descriu metode similare de izolare a microplasticelor prin utilizarea unor intervale largi de temperatură (20-70°C) și timp (2-60 minute), fără a preciza tipul de enzime sau reactivii utilizați, motiv pentru care reproducerea metodei este dificilă de realizat.
- Documentele CN115436504A și CN116008048A au ca scop izolarea microplasticelor din apă potabilă și sare de masă, procedeele descrise fiind imposibil de aplicat pentru probe de lapte, iaurt, smântână sau unt.
- Pentru probele de lapte, iaurt, smântână sau unt disponibile în România, protocolul descris în documentul 10.1016/j.scitotenv.2020.136823 nu a putut fi aplicat întrucât filtrele din celuloză cu pori de 12-15 μm s-au colmatat și nu s-au putut filtra probele doar prin simpla încălzire a acestora.
- Procesul descris pentru izolarea microplasticelor din Ayran (prezentat în documentul 10.31883/pjfn/163061) utilizează detergent multienzimatic în amestec cu acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) și hidrat de tetrametilamoniu, însă nu sunt prezentate date concludente referitoare la concentrația și puritatea compușilor din detergentul enzimatic (Deconex® Prozyme Active, Boer Chemie, Zuchwil, Switzerland). De asemenea, soluția propusă nu se poate aplica pentru gama de produse luată în discuție în prezenta invenție (lapte, iaurt, smântână și unt) – cu conținut ridicat de grăsime.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în stabilirea unei metode de izolare a microplasticelor din lapte, iaurt, smântână și unt indiferent de conținutul de grăsime. Pentru fiecare produs în parte sunt precizate exact cantitățile de probă și reactivi, precum și parametri optimi de lucru.

Metoda propusă conform invenției elimină dezavantajele menționate prin aceea că:

- sunt cunoscute cantitățile de probe și reactivi;
- sunt cunoscuți parametri optimi de lucru în ceea ce privește timpul și viteza agitatorului în etapa de pretratare, timpul și temperatura în etapa de digestie, precum și temperatura de incubare a amestecului până la filtrarea completă;
- timpul total necesar parcurgerii celor 3 etape este relativ scurt (~30 minute);
- implică un consum redus de reactivi uzuali (apă oxigenată, hidroxid de sodiu, dodecilsulfat de sodiu, apă ultrapură) ceea ce implică costuri reduse;
- echipamentele necesare efectuării celor trei etape sunt nelipsite din orice laborator de analiză/cercetare;
- acoperă patru categorii de produse consumate zilnic de cele mai expuse categoriile de vârstă (copii 0-3 ani, preșcolari-școlari, adolescenți, și vârstnici);
- fiecare protocol individual se poate aplica pe orice produs din gamă indiferent de conținutul de grăsime sau originea acestuia, fie el procesat sau neprocesat.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- timp redus de lucru (~30 minute);
- cantități reduse de reactivi;
- aplicarea eficientă (izolarea completă a microplasticelor) a fiecărui procedeu, în funcție de natura produsului, indiferent de conținutul de grăsime;
- nu sunt necesare echipamente care să necesite costuri ridicate prin prisma consumabilelor, utilităților sau o pregătire deosebită a operatorului;
- parametri comuni de lucru pentru toate produsele menționate (lapte, iaurt, smântână și unt), se variază doar cantitățile de probă și reactivi, ceea ce permite izolarea simultană a microplasticelor din diferite categorii de probe (conform Figura 1);
- grad scăzut de toxicitate al produșilor rezultați (reziduuri).

Metoda propusă de prezenta invenție poate fi implementată în fabricile de producție pe parcursul procesului de control cu scopul identificării operațiilor cu risc crescut de contaminare accidentală cu MPs.

Înainte de aplicarea metodei propuse, pentru evitarea unei potențiale contaminări cu microplastice, este necesară filtrarea reactivilor lichizi (inclusiv apa ultrapură) și ștergerea suprafeței de lucru cu alcool etilic 70% (Zhang și colab., 2021). De asemenea, toate instrumentele din sticlă sunt curățate și sterilizate (temperatura minimă 100°C, timp 48 h).

Într-un exemplu concret de realizare a invenției se parcurg etapele (Figura 1):

- A. pretratarea probelor cu reactivi ultrapuri necesari digestiei matricei organice complexe și omogenizarea prin agitare la 150 rpm, timp de 10 minute;
- B. digestia propriu-zisă se realizează prin ultrasonare la 30°C, timp de 20 minute;
- C. filtrarea pe filtre cu porozitate 12-15 μm .

După finalizarea celor 3 etape, filtrele sunt stocate în cutii Petri (sterilizate în prealabil) la temperatura camerei până la analiza propriu-zisă a microplasticelor. Investigațiile fizico-chimice privind cuantificarea și caracterizarea MPs sunt realizate utilizând tehnici analitice de înaltă sensibilitate și precizie, și anume: microscopie optică, microscopie electronică cu baleiaj (SEM) și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier cuplată cu microscopie optică (μ -FTIR) – conform Figurii 1.

REFERINȚE

- Abidli S., Lahbib Y., Trigui El Menif N., *Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (Northern Tunisia)*, Marine Pollution Bulletin, 142 (2019), 243–252.
- Akhbarizadeh R., Moore F., Keshavarzi B., Akhbarizadeh R., Moore F., *Investigating microplastics bioaccumulation and biomagnification in seafood from the Persian Gulf : a threat to human health?*, Food Additives & Contaminants: Part A, 36 (2019), 1696–1708.
- Akoueson F., Sheldon L.M., Danopoulos E., Morris S., Hotten J., Chapman E., Li J., Rotchell J.M., *A preliminary analysis of microplastics in edible versus non-edible tissues from seafood samples*, Environmental Pollution, 263 (2020) 114452.
- Alfthan, G.; Aro, A.; Gey, K.F. Plasma homocysteine and cardiovascular disease mortality. Lancet. 1997, 349(9049), 397. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)80014-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)80014-1).
- Amato-Lourenco, L.F.; Carvalho-Oliveira, R.; Junior, G.R.; Dos Santos Galvao, L.; Ando, R.A.; Mauad, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. J. Hazard. Mater. 2021, 416, 126124. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126124>.
- Andrady, A.L. The plastic in microplastics: A review. Mar. Pollut. Bull. 2017, 119(1), 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>.
- Bai, R.; Fan, R.; Xie, C.; Liu, Q.; Liu, Q.; Yan, C.; Cui, J.; He, W. Microplastics are overestimated due to poor quality control of reagents. J. Hazard. Mater. 2023, 459, 132068. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132068>.
- Banica, A.L.; Bucur (Popa), R.M.; Dulama, I.D.; Bucurica, I.A.; Stirbescu, R.M.; Radulescu, C., Assessment of microplastics in personal care products by microscopic methods and vibrational spectroscopy. Sci. Study Res. Chem. Chemic. Eng. Biotechnol. Food Ind. 2023, 24(2), 155-171.
- Barboza L.G.A., Lopes C., Oliveira P., Bessa F., Otero V., Henriques B., Raimundo J., Caetano M., Vale C., Guilhermino L., *Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure*, Science Total Environment, 717 (2020), 134625.

- Beckingham, B.; Apintiloaiei, A.; Moore, C.; Brandes, J. Hot or not: systematic review and laboratory evaluation of the hot needle test for microplastic identification. *Microplastics Nanoplastics*. 2023, 3, 8. <https://doi.org/10.1186/s43591-023-00056-4>.
- Birnstiel S., Soares-gomes A., Gama B.A.P., *Depuration reduces microplastic content in wild and farmed mussels*, *Marine Pollution Bulletin*, 140 (2019) 241–247.
- Bonello G., Varrella P., Pane L., *First Evaluation of Microplastic Content in Benthic Filter-feeders of the Gulf of La Spezia (Ligurian Sea)*, *Journal Aquatic Food Product Technology*, 27 (2018), 284–291.
- Bour A., Avio C.G., Gorbi S., Regoli F., Hylland K., *Presence of microplastics in benthic and epibenthic organisms: Influence of habitat, feeding mode and trophic level*, *Environmental Pollution*, 243 (2018), 1217–1225.
- Buyukunal, S.K.; Zipak, S.R.; Muratoglu, K. Microplastics in a Traditional Turkish Dairy Product: Ayran. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 2023, 73(2), 139–150. <https://doi.org/10.31883/pjfn/163061>
- Campanale, C.; Savino, I.; Massarelli, C.; Uricchio, V.F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Assess the Degree of Alteration of Artificially Aged and Environmentally Weathered Microplastics. *Polymers*. 2023, 15(4), 911. <https://doi.org/10.3390/polym15040911>.
- Cominetti, A.O.; de Franceschi, F.; Pinto, P.R.; Palini, A.G. Detection of plastic microparticles in a powder-based sample by flow cytometry, 2023, WO2021144322A1. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DWO2021144322A1>
- Conti, G.O.; Ferrante, M.; Banni, M.; Favara, C.; Nicolosi, I.; Cristaldi, A.; Fiore M.; Zuccarello, P. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environ. Res.* 2020, 187, 109677. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109677>.
- Dalmau-Soler J., Ballesteros-cano R., Boleda M.R., Paraira M., Ferrer N., Lacorte S., *Microplastics from headwaters to tap water : occurrence and removal in a drinking water treatment plant in Barcelona Metropolitan area (Catalonia NE Spain)*, *Environmental Science Pollution Research*, 28 (2021), 59462–59472.

- Daniel D.B., Ashraf P.M., Thomas S.N., *Microplastics in the edible and inedible tissues of pelagic fishes sold for human consumption in Kerala, India*, Environmental Pollution, 266 (2020), 115365.
- de Franceschi, F.; Cominetti, A.O.; Pinto, P.R.; Palini, A.G. Detection of plastic microparticles in a milk based sample by flow cytometry, 2021, WO2021144321A1. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DWO2021144321A1>
- Diaz-Basantes, M.F.; Conesa, J.A.; Fullana, A. Microplastics in honey, beer, milk and refreshments in Ecuador as emerging contaminants. Sustainability. 2020, 12(14), 5514. <https://www.mdpi.com/2071-1050/12/14/5514>.
- Ding J., Li J., Sun C., Jiang F., Ju P., Qu L., Zheng Y., He C., *Detection of microplastics in local marine organisms using a multi-technology system*, Analytical Methods, 11 (2019) 78–87.
- Directiva 2008/56/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 17 iunie 2008 de instituire a unui cadru de acțiune comunitară în domeniul politicii privind mediul marin (Directiva-cadru „Strategia pentru mediul marin”) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0056>
- Geissen, V.; Mol, H.; Klumpp, E.; Umlauf, G.; Nadal, M.; Ploeg, M.; Zee, S.E.A.T.M.; Ritsema, C.J. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. Int. Soil Water Conserv. Res. 2015, 3(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>.
- Haug, A.; Hostmark, A.T.; Harstad, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. Lipids Health Dis. 2007, 6(25), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1476-511x-6-25>.
- He, H.; Li, F.; Huang, B.; Pan, X. Method for evaluating tap water risk caused by aging of plastic water pipe, 2021, CN116008048A. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DCN116008048A>
- Huang, Z.; Pan, B.; Li, Y.; Zhang, J.; Liu, H. Method for measuring contents of PP, PS and PE micro-plastics in food by pyrolysis gas chromatography, 2022, CN115436504A. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DCN115436504A>
- Jenner, L.C.; Rotchell, J.M.; Bennett, R.T.; Cowen, M.; Tentzeris, V.; Sadofsky, L.R. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. Sci. Total Environ. 2022, 831, 154907. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>.

- Jensen, R.G.; Newburg, D.S. Bovine milk lipids. In Handbook of milk composition, 1st ed.; Jensen, R.G., Ed.; Academic Press, Cambridge, United States, 1995; pp. 543–575.
- Kadac-Czapska, K.; Knez, E.; Grembecka, M. Food and human safety: the impact of microplastics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022, <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2132212>.
- Kankanige D., Babel S., *Smaller-sized micro-plastics (MPs) contamination in single-use PET-bottled water in Thailand*, *Science of The Total Environment*, 717 (2020), 137232.
- Karami, A.; Golieskardi, A.; Keong Choo, C.; Larat, V.; Galloway, T.S.; Salamatinia, B. The presence of microplastics in commercial salts from different countries. *Sci. Rep.* 2017, 7(1), 46173. <https://doi.org/10.1038/srep46173>.
- Keenan, T.W.; Patton, S. The structure of milk: Implications for sampling and storage. In Handbook of milk composition, 1st ed.; Jensen, R.G., Ed.; Academic Press, Cambridge, United States, 1995; pp. 5–50.
- Kosuth, M.; Mason, S.A.; Wattenberg, E.V. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLoS One.* 2018, 13(4), e019497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970>.
- Kutralam-Muniasamy, G.; Perez-Guevara, F.; Elizalde-Martinez, I.; Shruti, V.C. Branded milks – Are they immune from microplastics contamination?. *Sci. Total Environ.* 2020, 714, 136823. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136823>.
- Laskar, N.; Kumar, U. Plastics and microplastics: a threat to environment. *Environ. Technol. Innov.* 2019, 14, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352>.
- Lee, H.J.; Song, N.S.; Kim, J.S.; Kim, S.K. Variation and Uncertainty of Microplastics in Commercial Table Salts: Critical Review and Validation. *J. Hazard. Mater.* 2021, 402, 123743. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123743>.
- Lencho, G.K.; Seblewongel, A.M. Assessment of dairy farmers hygienic milking practices and awareness on cattle milk-borne zoonoses in Bishoftu, Ethiopia. *J. Vet. Med. Anim. Health.* 2018, 10(2), 45–54. <http://dx.doi.org/10.5897/JVMAH2017.0602>.
- Li, L.; Zhou, Q.; Yin, N.; Tu, C.; Luo, Y. Uptake and accumulation of microplastics in an edible plant. *Chin. Sci. Bull.* 2019, 64, 928–934. <http://dx.doi.org/10.1360/N972018-00845>.
- Lu, S.; Qiu, R.; Hu, J.; Li, X.; Chen, Y.; Zhang, X.; Cao, C.; Shi, H.; Xie, B.; Wu, W.M.; He, D. Prevalence of microplastics in animal-based traditional medicinal materials: Widespread

- pollution in terrestrial environments. *Sci. Total Environ.* 2020, 709, 136214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136214>.
- Lusher, A.L.; Welden, N.A.; Sobral, P.; Cole, M. Sampling, isolating, and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Anal. Methods.* 2017, 9, 1346–1360. <https://doi.org/10.1039/C6AY02415G>.
- Mistri, M.; Scoponi, M.; Sfriso, A.A.; Munari, C.; Curiotto, M.; Sfriso, A.; Orlando-Bonaca, M.; Lipej, L. Microplastic contamination in protected areas of the Gulf of Venice. *Water Air Soil Pollut.* 2021, 232, 379. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05323-9>.
- Montano, L.; Giorgini, E.; Notarstefano, V.; Notari, T.; Ricciardi, M.; Piscopo, M.; Motta, O. Raman microspectroscopy evidence of microplastics in human semen. *Sci. Total Environ.* 2023, 901, 165922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165922>.
- Nilsson, M.; Holst, J.J.; Bjorck, I.M. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85(4), 996–1004. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.4.996>.
- Pham, D.T.; Kim, J.; Lee, S.H.; Kim, J.; Kim, D.; Hong, S.; Jung, J.; Kwon, J.H. Analysis of microplastics in various foods and assessment of aggregate human exposure via food consumption in Korea. *Environ. Pollut.* 2023, 322, 121153. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121153>.
- Rummel, C.D.; Jahnke, A.; Gorokhova, E.; Kuhnel, D.; Schmitt-Jansen, M. The impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2017, 4(7), 258–267. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00164>.
- Shruti, V.C.; Perez-Guevara, F.; Elizalde-Martínez, I.; Kuttralam-Muniasamy, G. First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks - Future research and environmental considerations. *Sci. Total Environ.* 2020, 726, 138580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138580>.
- Singh, S.; Trushna, T.; Kalyanasundaram, M.; Tamhankar, A.J.; Diwan, V. Microplastics in drinking water: a macro issue. *Water Supply.* 2022, 22(5), 5650–5674. <https://doi.org/10.2166/ws.2022.189>.

- Wirnkor, V.A.; Ebere, E.C.; Ngozi, V.E. Microplastics, an emerging concern: A review of analytical techniques for detecting and quantifying microplastics. *Anal. Methods Environ. Chem. J.* 2019, 2(2), 13–30. <https://doi.org/10.24200/amecj.v2.i2.57>.
- Yenew, C.; Tadele, F.; Minuye, B.; Sisay, E.; Asmamaw, T.; Mulatu, S.; Demissie, B. Raw cow milk nutritional content and microbiological quality predictors of South Gondar zone dairy farmers in Ethiopia. *Heliyon.* 2020, 8(10), e11020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11020>.
- Zhang, F.; Xu, J.; Wang, X.; Jabeen, K.; Li, D. Microplastic contamination of fish gills and the assessment of both quality assurance and quality control during laboratory analyses. *Mar. Poll. Bull.* 2021, 173(B), 113051. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113051>.
- Zhou, G.; Wu, Q.; Wei, X.F.; Chen, C.; Ma, J.; Crittenden, J.C.; Liu, B. Tracing microplastics in rural drinking water in Chong-Qing, China: Their presence and pathways from source to tap. *J. Hazard. Mater.* 2023, 459, 132206. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132206>.

REVENDICĂRI

1. Metoda rapidă de izolare a microplasticelor din lapte, iaurt, smântână și unt este **caracterizată prin aceea că** este realizată într-o succesiune de 3 etape: **A.** pretratarea probelor cu reactivi ultrapuri necesari digestiei matricei organice complexe și omogenizarea prin agitare la 150 rpm, timp de 10 minute; **B.** digestia propriu-zisă prin ultrasonare la 30°C, timp de 20 minute; **C.** filtrarea sub vid pe filtre cu porozitate 12-15 μm.
2. Procedul de izolare a microplasticelor din lapte, *conform revendicării 1*, este **caracterizat prin aceea că** se realizează conform următoarelor etape: **A.** 500 mL probă și 50 mL apă oxigenată (30-31%, prefiltrată) – indiferent de conținutul de grăsime – se mențin pe agitator magnetic timp de 10 minute la 150 rpm; **B.** Amestecul obținut în etapa A se ultrasonază timp de 20 minute la 30°C; **C.** Filtrarea se realizează pe filtre cu porozitate 12-15 μm. Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.
3. Procedul de izolare a microplasticelor din iaurt/iaurt de băut fără adaosuri de fructe, legume sau cereale, *conform revendicării 1*, este **caracterizat prin aceea că** se realizează conform următoarelor etape: **A.** 5 g probă, 1 g NaOH și 500 mL apă distilată prefiltrată – indiferent de conținutul de grăsime – se mențin pe agitator magnetic timp de 10 minute la 150 rpm; **B.** Amestecul obținut mai sus se ultrasonază timp de 20 minute la 30°C; **C.** Filtrarea se realizează pe filtre cu porozitate 12-15 μm. Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.
4. Procedul de izolare a microplasticelor din smântână, *conform revendicării 1*, este **caracterizat prin aceea că** se realizează conform următoarelor etape: **A.** 5 g probă, 0.5 g dodecilsulfat de sodiu, 0.6 g NaOH și 500 mL apă distilată prefiltrată – indiferent de conținutul de grăsime – se mențin pe agitator magnetic timp de 10 minute la 150 rpm; **B.** Amestecul obținut mai sus se ultrasonază timp de 20 minute la 30°C; **C.** Filtrarea se realizează pe filtre cu porozitate 12-15 μm. Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.
5. Procedul de izolare a microplasticelor din unt, *conform revendicării 1*, este **caracterizat prin aceea că** se realizează conform următoarelor etape: **A.** 8 g probă, 4 g dodecilsulfat de sodiu, 1 g NaOH și 500 mL apă distilată prefiltrată – indiferent de conținutul de grăsime – se mențin pe agitator magnetic timp de 10 minute la 150 rpm; **B.** Amestecul obținut mai sus se

ultrasonează timp de 20 minute la 30°C; C. Filtrarea se realizează pe filtre cu porozitate 12-15 μm . Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.

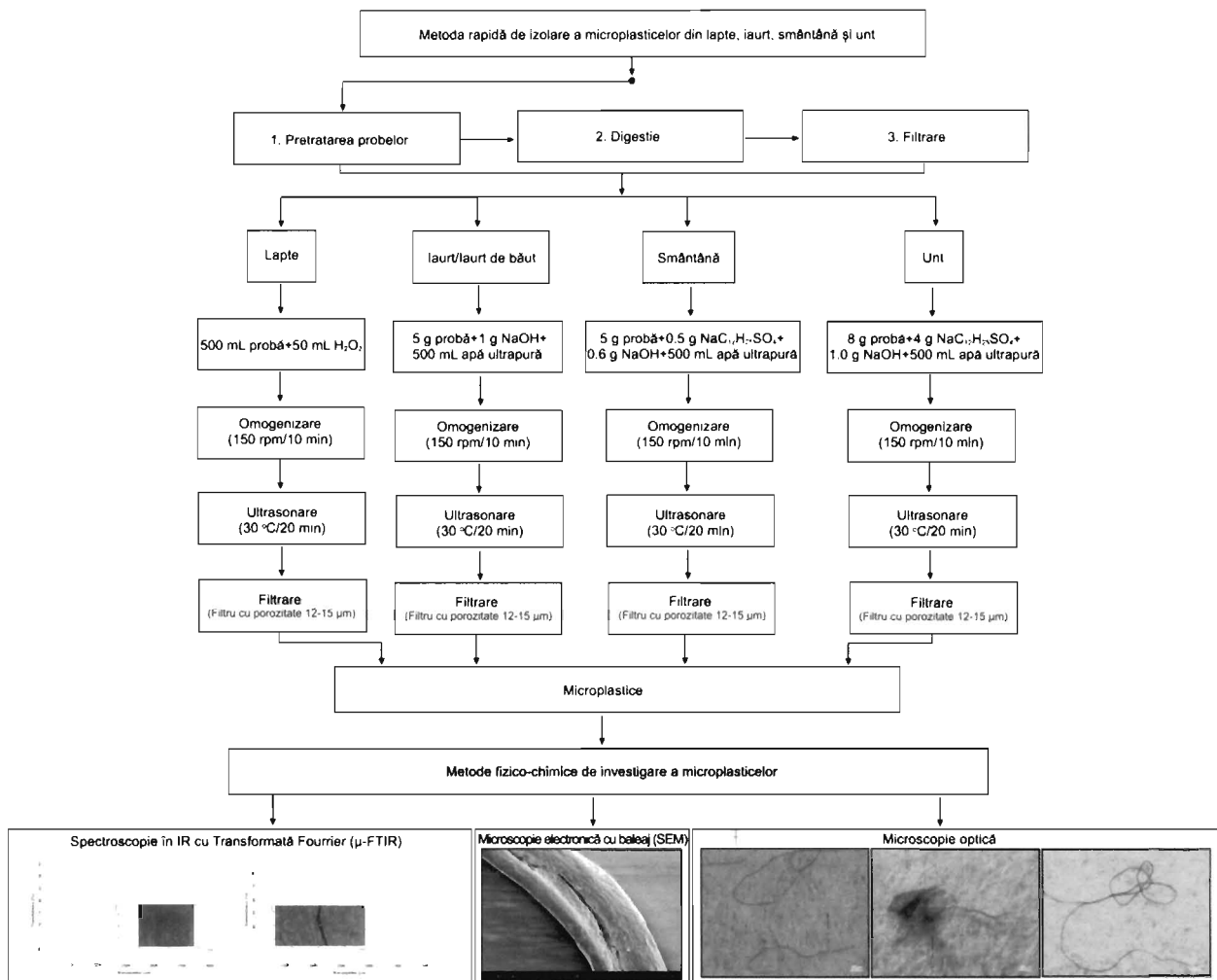


Figura 1. Metodă rapidă de izolare a microplasticilor din lapte, iaurt, smântână și unt și metode fizico-chimice de investigare a acestora.

**METODĂ RAPIDĂ DE IZOLARE A MICROPLASTICELOR DIN LAPTE, IAURT,
SMÂNTÂNĂ ȘI UNT**

Invenția se referă la METODĂ RAPIDĂ DE IZOLARE A MICROPLASTICELOR DIN LAPTE, IAURT, SMÂNTÂNĂ ȘI UNT cu aplicabilitate în domeniul industriei și securității alimentare. Metoda de izolare este caracterizată prin aceea că pentru realizare necesită o succesiune de 3 etape: A. pretratarea probelor cu reactivi ultrapuri necesari digestiei matricei organice complexe și omogenizarea prin agitare la 150 rpm, timp de 10 minute; B. digestia propriu-zisă prin ultrasonare la 30°C, timp de 20 minute; C. filtrarea sub vid pe filtre cu porozitate 12-15 μm.

Conform invenției, metoda poate fi aplicată pentru fiecare produs, din categoria menționată, indiferent de conținutul de grăsime al acestuia. Termenul "metodă de izolare" folosit în prezenta invenție include o serie de procedee individuale, care necesită o cantitate mică de reactivi chimici uzuali și echipamente de cercetare uzuale laboratoarelor de analiză/cercetare.

Avantajul principal al invenției este faptul că își găsește o utilitate practică în industria alimentară (laboratoare de analiză primară, analiză complexă, control de calitate a materiei prime, respectiv a produselor finite, compartiment de informare a consumatorului/Autoritatea Națională pentru Protecția Consumatorilor), cu rol de avertizare asupra riscului de contaminare cu microplastice asupra sănătății umane, dar și rol de avertizare și conștientizare a furnizorilor și procesatorilor în vederea îmbunătățirii procesului tehnologic și al produselor finite.

Toate aceste considerente stau la baza conceptului acestei invenții care permite o **izolare rapidă, eficientă și cu costuri reduse a microplasticelor din lapte, iaurt, smântână și unt.**

În ultimii ani, la nivel internațional, dar și la nivelul României, o serie de contaminanți chimici, de origine antropogenă, adesea etichetați drept *Contaminants of Emerging Concern (CECs)*, cum ar fi compușii perfluorinați, alchilfenolii, produsele farmaceutice, pesticidele, metalele carcinogene, polimeri ș.a. prezenți în apă, sol, aer și implicit în lanțul trofic prin alimente, au intrat în atenția autorităților, dar și a cercetătorilor, în ceea ce privește riscul pentru mediu și implicit pentru sănătatea umană.

În ultimii ani s-a tot încercat reglementarea de către Uniunea Europeană în ceea ce privește monitorizarea și evaluarea impactului microplasticelor asupra mediului. Cele mai multe studii și reglementări au fost îndreptate asupra apelor și a mediului acvatic (inclusiv mediului marin) – Directiva Cadru Strategia pentru Mediul Marin adoptată la 17 iunie 2008, a fost revizuită în 2017 cu introducerea reglementărilor privind poluarea cu microplastic. În ceea ce privește prezența microplasticelor în produsele alimentare, cele mai multe studii au fost realizate pe apă potabilă, pește, crustacee și fructe de mare (Abidli și colab., 2019; Akhbarizadeh și colab., 2019; Akoueson și colab., 2020; Barboza și colab., 2020; Birnstiel și colab., 2019; Bour și colab., 2018; Bonello și colab., 2018; Dalmau-Soler și colab., 2021; Daniel și colab., 2020; Ding și colab., 2019; Kankanige D. și colab., 2020; DIRECTIVA 2008/56/CE A PARLAMENTULUI EUROPEAN ȘI A CONSILIULUI din 17 iunie 2008 de instituire a unui cadru de acțiune comunitară în domeniul politicii privind mediul marin (Directiva-cadru „Strategia pentru mediul marin”)).

Având în vedere faptul că la nivelul României nu există o legislație specifică monitorizării conținutului de microplastice din produse alimentare și implicit nu există studii de specialitate realizate în acest domeniu, considerăm că **prezența invenției este una originală, de actualitate, cu înalt grad de noutate** în direcțiile prioritare ale Strategiei Naționale de Cercetare, Dezvoltare și Inovare (SNCDI 2021-2027). Astfel, invenția reprezintă un punct important de pornire pentru izolarea, cuantificarea și caracterizarea microplasticelor din lapte, iaurt, smântână și unt, cu scopul stabilirii unor limite / praguri / valori admisibile necesare evaluării riscului asupra sănătății umane.

O astfel de preocupare la nivel mondial este de înțeles deoarece o serie de fragmente minuscule de plastic, de forme și dimensiuni variate, având compoziții diferite și nebiodegradabile, ajung rapid în ecosistemele marine, de apă dulce și terestre și implicit în apa potabilă și lanțul alimentar (Zhou și colab., 2023; Andrady, 2017; Laskar și Kumar, 2019; Pham și colab., 2023). Microplasticele (MPs) sunt fragmente solide de dimensiuni extrem de mici (< 5 mm), de obicei fibre, care conțin în principal diferiți polimeri (de exemplu, cei obișnuiți sunt polietilena (PE), polistirenul (PS), polipropilena (PP), polietilen tereftalatul (PET) și nailon) și aditivi utilizați în procesul inițial de polimerizare (Andrady, 2017; Banica și colab., 2023). Fibrele, precum și fragmentele de dimensiuni mici incluse în categoria microplasticelor secundare sunt unul dintre cei mai răspândiți contaminanți emergenți (EC) (Geissen și colab.,

2015). Pe de altă parte, MPs, cu o suprafață mare și proprietăți hidrofobe, pot adsorbi antibiotice, metale grele, precum și alți compuși nocivi, prezentând pericole semnificative atât pentru oameni, cât și pentru mediu (Bai și colab., 2023).

Cele mai comune structuri polimerice raportate în MPs (Li și colab., 2019), identificate prin diferite tehnici vibraționale - cum ar fi μ -FTIR (Banica și colab., 2023; Jenner și colab., 2022; Montano și colab., 2023; Campanale și colab., 2023) și μ -Raman (Beckingham și colab., 2023; Wirmkor și colab., 2019) - au fost nailon-12 (poliamidă-12), nailon-6, polibutilen tereftalat, polietilenă izotereftalat, polietilen tereftalat, polimetil metilacrilat, polipentaeritritil tereftalat, polipropilen tereftalat, polietilenă, polipropilenă, polistiren, polietilen (tefluoroetilen, poli-acrilat), polietilenă (tefluoroetil), copolimeri de stearat de alil/acetat de vinil, copolimer de atilenă/metilacrilat, copolimer de etilenă/acrilat, copolimer de butilenă/etilenă/stiren, copolimer de acrilat de stiren, trimetilsiloxisilicat. Acesta este motivul pentru care este important să se măsoare și să se evalueze riscurile de toxicitate, persistență și bioacumulare a MP la oameni, și în special la copii.

Microplasticele au fost identificate în aproape toate organismele acvatice, cu implicații directe în lanțul alimentar. Conform cercetărilor recente, s-a descoperit că MPs au o influență asupra diferitelor țesuturi și celule din diferite organe ale corpului uman, inclusiv plămâni (Amato-Lourenco și colab., 2021). De asemenea, microplasticele pot adsorbi și transporta pe suprafața lor micropoluanți dăunători, cum ar fi nonilfenolii, împreună cu poluanții secundari cum ar fi bifenilii policlorurați (PCB) și diclorodifenildicloretilena (DDE) (Lusher și colab., 2017; Mistri și colab., 2021; Singh și colab., 2022; Rummel și colab., 2017).

Având în vedere că microplasticele sunt adesea invizibile pentru ochiul uman, ele sunt relativ ușor de ingerat de către oameni, în principal prin inhalare sau ingerare. Alimentele conțin cea mai mare cantitate de microplastice care ajung în organismul uman. Mai multe studii au raportat că fructele și legumele (Li și colab., 2019; Conti și colab., 2020), precum și plantele medicinale (Lu și colab., 2020) conțin o cantitate semnificativă de fragmente microplastice și nanoplastice absorbite de rădăcinile fructelor, legumelor și plantelor din sol. Evident, contaminarea alimentelor proaspete cu MPs se regăsește și în produsele procesate sau derivate, cum ar fi ceaiul ambalat sau ceaiul rece, sucuri naturale sau alte băuturi răcoritoare, așa cum au subliniat Shruti și colab. (2020). În concluzie, la consumul de legume proaspete, fructe și plante

medicinale se presupune că contaminarea se transmite în lanțul alimentar, prin produsele procesate și în cele din urmă către oameni (Kadac-Czapska și colab., 2022).

Un alt aliment zilnic important folosit de oameni este sarea și studii au raportat că conține și fragmente de microplastic (Karami și colab., 2017; Lee și colab., 2021; Kosuth și colab., 2018), dar cea mai interesantă întrebare se referă la prezența microplasticelor în laptele crud sau de marcă și dacă este posibil ca acest aliment să fi imun la contaminarea cu microplastice. Câteva studii timide au încercat să răspundă acestei dileme, dar mai degrabă incomplet și mai mult prin prisma presupunerilor (Kutralam-Muniasamy și colab., 2020; Diaz-Basantes și colab., 2020). De ce sunt atât de puține studii? Pentru că, spre deosebire de alte alimente precum apa, peștele, fructele, legumele, plantele, băuturile (sucuri, băuturi energizante sau bere) și chiar și carnea, laptele este un aliment extrem de complex. Complexitatea laptelui este dată de compoziția sa chimică (substanță grasă: grăsimi - gliceride, fosfatide și steroizi; substanță fără grăsimi: proteine - cazeine și proteine sterice, lactoză, minerale - Ca, Se, Zn, Mg, I - și alte substanțe fără grăsime precum enzimele, vitaminele, pigmentii, gazele), fiind considerat cel mai complet aliment. Pe de altă parte, datorită pH-ului său neutru, conținutului ridicat de apă și nutrienți, laptele crud este un produs extrem de perisabil care servește ca substrat optim de creștere pentru agenții patogeni (Lencho și Seblewongel, 2018 ; Yenew și colab., 2020). Efectele pozitive asupra sănătății pot rezulta din prezența acidului oleic, acidului linoleic conjugat, acizilor grași omega-3, acizilor grași cu lanț scurt și mediu, vitaminelor, mineralelor și substanțelor bioactive. S-a demonstrat că laptele cu conținut ridicat de grăsime prelungește timpul de tranzit gastrointestinal prin creșterea timpului mediu de digestie în comparație cu laptele semi-degresat. Triacilglicerolii sunt alcătuiți din acizi grași saturați (4-24 atomi de C) și reprezintă aproximativ 95% din componenta lipidică. Fiecare moleculă de triacilglicerol are un aranjament de acizi grași care îi conferă o formă lichidă la temperatura corpului. Alte lipide din lapte includ acizii grași liberi (FFA), care reprezintă mai puțin de 0,5% din toate lipidele din lapte, colesterolul (mai puțin de 0,5% din fracția lipidică), fosfolipidele (aproximativ 1%) și diacilglicerol (aproximativ 2% din fracțiunea lipidică) (Keenan and Patton, 1995; Jensen and Newburg, 1995; Haug și colab., 2007). Mai mult de jumătate din acizii grași din lapte sunt saturați (de exemplu, acid butiric, acid caprilic, acid capric, acid lauric), reprezentând aproximativ 19 g/L de lapte. Singurul acid gras nesaturat cu cel mai mare conținut în lapte este acidul oleic (18:1c9) care se ridică la aproximativ 8 g/L de lapte integral. În consecință, laptele

contribuie substanțial la aportul alimentar de acid oleic (Haug și colab., 2007). Acidul oleic reprezintă aproximativ 25% din grăsimea din lapte, iar raportul dintre acidul oleic și acizii grași polinesaturați este relativ mare (Alfthan și colab., 1997). Aproximativ 2 g/L de acizi grași polinesaturați sunt prezenți în lapte, dintre care majoritatea sunt acizi linoleic (18:2 omega-6) și α -linolenic (18:3 omega-3). Acești acizi grași pot fi transformați în acizi grași cu 20 de atomi de carbon, cum ar fi acidul arahidonic (20:4 omega-6) și acidul eicosapentaenoic (20:5 omega-3) (Haug și colab., 2007). Aproximativ 1% din totalul lipidelor din lapte sunt fosfolipide și glicosfingolipide. Comparativ, în aceste lipide sunt prezenți mai mulți acizi grași polinesaturați decât în triacilgliceroli (Jensen și Newburg, 1995). În plus, aproximativ 80% din compoziția proteică a laptelui este cazeină. Scopul biologic al cazeinei este de a transporta calciul și fosfatul de calciu în organism. Aminoacizii esențiali și aminoacizii cu lanț ramificat se găsesc în cantități mai mari în lapte și au funcții specifice în metabolismul uman (Nilsson și colab., 2007). Pornind de la această scurtă descriere a compoziției chimice a laptelui, se poate observa de ce investigațiile privind prezența MP sunt limitate.

Luând în considerare matricea organică complexă a laptelui, ca materie primă pentru produse procesate, prezenta invenție propune o metodă de referință privind izolarea/separarea MPs din lapte, iaurt, smântână și unt. Aceasta a fost testată cu succes pe produse comercializate sub mărci variate, din categoria produselor bio și non-bio, cu conținut diferit de grăsime. De asemenea, metoda propusă a fost testată pe lapte crud și derivate din lapte colectate de la micii fermieri. Pentru o imagine completă privind relația cauză-efect, cercetările inventatorilor s-au finalizat cu o serie de tehnici analitice fizico-chimice complexe: microscopie optică, microscopie electronică cu baleiaj (SEM), spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier cuplată cu microscopie optică (μ -FTIR), care vin să susțină în premieră importanța corelației compoziției chimice, structurii, mărimii, culorii și sursei de proveniență, contribuind la întocmirea unei baze de date referitoare la MPs din alimente.

Sunt cunoscute din **stadiul anterior** al tehnicii, procedee cum ar fi:

Documentul WO2021144321A1 *Detection of plastic microparticles in a milk based sample by flow cytometry* (de Franceschi F. și colab., 2021) care se referă la detecția microparticulelor de plastic din lapte folosind citometria în flux. În acest proces, digestia proteinelor, grăsimilor și carbohidraților se realizează folosind enzime sau amestecuri de enzime

prin incubarea la o temperatură cuprinsă în intervalul 20-70°C, timp de 2-60 minute. După digestie, probele au fost filtrate pe membrane de nitroceluloză cu pori de 0.1-6 pm. Membrana conținând particulele de plastic este incubată la un pH cuprins în intervalul 10-12, iar după îndepărtarea acestei membrane se diluează soluția și se analizează prin citometrie în flux.

Documentul WO2021144322A1 *Detection of plastic microparticles in a powder-based sample by flow cytometry* (Cominetti și colab., 2021) este realizat de același colectiv ca și precedentul, iar procedeul este similar – cu mențiunea că pudrele sunt hidratate în prealabil.

Documentul CN115436504A *Method for measuring contents of PP, PS and PE microplastics in food by pyrolysis gas chromatography* (Huang și colab., 2022) se referă la determinarea conținutului de polipropilenă, polistiren și polietilenă din probe alimentare (apă și sare de masă) prin gaz-cromatografie cu piroliză (Py-GC), însă procedeul de izolare nu se poate aplica în cazul laptelui sau al derivatelor din lapte.

Documentul CN116008048A *Method for evaluating tap water risk caused by aging of plastic water pipe* (He și colab., 2023) se referă la determinarea microplasticelor și aditivilor plastici din apa potabilă transportată prin conducte de plastic degradate/îmbătrânite, însă procedeul de izolare nu se poate aplica în cazul laptelui sau al derivatelor din lapte.

Documentul 10.1016/j.scitotenv.2020.136823 *Branded milks – Are they immune from microplastics contamination?* (Kutralam-Muniasamy și colab., 2020) se referă la izolarea și caracterizarea microplasticelor din lapte (lapte integral, lapte delactozat, formule pentru bebeluși, lapte proaspăt), însă protocolul de izolare prin simpla încălzire (fără a fi precizată temperatura) urmată de filtrare nu a putut fi aplicat în cazul laptelui sau al derivatelor din lapte întrucât filtrele de celuloză s-au colmatat, ceea ce înseamnă că autorii nu au luat în considerare matricea organică complexă a laptelui, metoda neputând fi reprodusă de niciun alt colectiv de autori prin prisma informațiilor lacunare.

Documentul 10.31883/pjfn/163061 *Microplastics in a Traditional Turkish Dairy Product: Ayran* (Buyukunal și colab., 2023) se referă la izolarea și caracterizarea microplasticelor din lapte, smântână, culturi starter, și Ayran (produs fermentat din lapte cu adaos de apă și sare). În acest caz, metoda de izolare este mare consumatoare de reactivi: 20 mL probă se amestecă cu 20 mL apă ultrapură (fără microplastice) și 2 mL detergent multienzimatic; se amestecă timp de 2 minute la 40°C, apoi se adaugă 10 mL acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) și se amestecă 3 minute la 40°C. În final se adaugă 2 mL hidrat de tetrametilamoniu, se

incubează amestecul la 80°C timp de 1 minut și se filtrează imediat. Metoda nu furnizează informații referitoare la conținutul de grăsime al laptelui, smântânii sau ayranului, originea acestora, precum și specia animală a laptelui/smântânii. Din descrierea studiului se concluzionează faptul că s-a urmărit procesul tehnologic de obținere a ayranului și evidențierea punctelor critice de control pe fluxul tehnologic astfel încât să se reducă gradul de contaminare cu microplastice.

Soluțiile tehnice din procedeele/metodele descrise mai sus prezintă următoarele dezavantaje:

- Documentele WO2021144321A1 și WO2021144322A1 descriu metode similare de izolare a microplasticilor prin utilizarea unor intervale largi de temperatură (20-70°C) și timp (2-60 minute), fără a preciza tipul de enzime sau reactivii utilizați, motiv pentru care reproducerea metodei este dificilă de realizat.
- Documentele CN115436504A și CN116008048A au ca scop izolarea microplasticilor din apă potabilă și sare de masă, procedeele descrise fiind imposibil de aplicat pentru probe de lapte, iaurt, smântână sau unt.
- Pentru probele de lapte, iaurt, smântână sau unt disponibile în România, protocolul descris în documentul 10.1016/j.scitotenv.2020.136823 nu a putut fi aplicat întrucât filtrele din celuloză cu pori de 12-15 μm s-au colmatat și nu s-au putut filtra probele doar prin simpla încălzire a acestora.
- Procesul descris pentru izolarea microplasticilor din Ayran (prezentat în documentul 10.31883/pjfn/163061) utilizează detergent multienzimatic în amestec cu acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) și hidrat de tetrametilamoniu, însă nu sunt prezentate date concludente referitoare la concentrația și puritatea compușilor din detergentul enzimatic (Deconex® Prozyme Active, Boer Chemie, Zuchwil, Switzerland). De asemenea, soluția propusă nu se poate aplica pentru gama de produse luată în discuție în prezenta invenție (lapte, iaurt, smântână și unt) – cu conținut ridicat de grăsime.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în stabilirea unei metode de izolare a microplasticelor din lapte, iaurt, smântână și unt indiferent de conținutul de grăsime. Pentru fiecare produs în parte sunt precizate exact cantitățile de probă și reactivi, precum și parametri optimi de lucru.

Metoda propusă conform invenției elimină dezavantajele menționate prin aceea că:

- sunt cunoscute cantitățile de probe și reactivi;
- sunt cunoscuți parametri optimi de lucru în ceea ce privește timpul și viteza agitatorului în etapa de pretratare, timpul și temperatura în etapa de digestie, precum și temperatura de incubare a amestecului până la filtrarea completă;
- timpul total necesar parcurgerii celor 3 etape este relativ scurt (~30 minute);
- implică un consum redus de reactivi uzuali (apă oxigenată, hidroxid de sodiu, dodecilsulfat de sodiu, apă ultrapură) ceea ce implică costuri reduse;
- echipamentele necesare efectuării celor trei etape sunt nelipsite din orice laborator de analiză/cercetare;
- acoperă patru categorii de produse consumate zilnic de cele mai expuse categoriile de vârstă (copii 0-3 ani, preșcolari-școlari, adolescenți, și vârstnici);
- fiecare protocol individual se poate aplica pe orice produs din gamă indiferent de conținutul de grăsime sau originea acestuia, fie el procesat sau neprocesat.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- timp redus de lucru (~30 minute);
- cantități reduse de reactivi;
- aplicarea eficientă (izolarea completă a microplasticelor) a fiecărui procedeu, în funcție de natura produsului, indiferent de conținutul de grăsime;
- nu sunt necesare echipamente care să necesite costuri ridicate prin prisma consumabilelor, utilităților sau o pregătire deosebită a operatorului;
- parametri comuni de lucru pentru toate produsele menționate (lapte, iaurt, smântână și unt), se variază doar cantitățile de probă și reactivi, ceea ce permite izolarea simultană a microplasticelor din diferite categorii de probe (conform Figura 1);
- grad scăzut de toxicitate al produșilor rezultați (reziduuri).

Metoda propusă de prezenta invenție poate fi implementată în fabricile de producție pe parcursul procesului de control cu scopul identificării operațiilor cu risc crescut de contaminare accidentală cu MPs.

Înainte de aplicarea metodei propuse, pentru evitarea unei potențiale contaminări cu microplastice, este necesară filtrarea reactivilor lichizi (inclusiv apa ultrapură) și ștergerea suprafeței de lucru cu alcool etilic 70% (Zhang și colab., 2021). De asemenea, toate instrumentele din sticlă sunt curățate și sterilizate (temperatura minimă 100°C, timp 48 h).

Pentru realizarea invenției se parcurg etapele prezentate în Figura 1:

- A. pretratarea probelor cu reactivi ultrapuri necesari digestiei matricei organice complexe și omogenizarea prin agitare la 150 rpm, timp de 10 minute;
- B. digestia propriu-zisă se realizează prin ultrasonare la 30°C, timp de 20 minute;
- C. filtrarea pe filtre cu porozitate 12-15 μm.

După finalizarea celor 3 etape, filtrele sunt stocate în cutii Petri (sterilizate în prealabil) la temperatura camerei până la analiza propriu-zisă a microplasticelor. Investigațiile fizico-chimice privind cuantificarea și caracterizarea MPs sunt realizate utilizând tehnici analitice de înaltă sensibilitate și precizie, și anume: microscopie optică, microscopie electronică cu baleiaj (SEM) și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier cuplată cu microscopie optică (μ-FTIR) – conform Figurii 1.

1. Pentru extracția microplasticelor din probe de lapte se parcurg următoarele etape:

- A1. pretratarea a 500 mL lapte cu 50 mL apă oxigenată (30-31%, prefiltrată) și omogenizarea prin agitare (utilizând agitator magnetic) la 150 rpm, timp de 10 minute;
- B1. digestia propriu-zisă se realizează prin ultrasonarea amestecului obținut în etapa A1 la 30°C, timp de 20 minute;
- C1. filtrarea amestecului obținut în etapa B1 pe filtre cu porozitate 12-15 μm. Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.

După finalizarea celor 3 etape (A1, B1, C1), filtrele sunt stocate în cutii Petri (sterilizate în prealabil) la temperatura camerei până la analiza propriu-zisă a microplasticelor.

2. Pentru extracția microplasticelor din probe de iaurt se parcurg următoarele etape:

A2. pretratarea a 5 g iaurt (iaurt/iaurt de băut fără adaosuri de fructe, legume sau cereale) cu 1 g hidroxid de sodiu și 500 mL apă distilată prefiltrată și omogenizarea prin agitare (utilizând agitator magnetic) la 150 rpm, timp de 10 minute;

B2. digestia propriu-zisă se realizează prin ultrasonarea amestecului obținut în etapa A2 la 30°C, timp de 20 minute;

C2. filtrarea amestecului obținut în etapa B2 pe filtre cu porozitate 12-15 μm. Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.

După finalizarea celor 3 etape (A2, B2, C2), filtrele sunt stocate în cutii Petri (sterilizate în prealabil) la temperatura camerei până la analiza propriu-zisă a microplasticelor.

3. Pentru extracția microplasticelor din probe de smântână se parcurg următoarele etape:

A3. pretratarea a 5 g smântână cu 0.5 g dodecilsulfat de sodiu, 0.6 g hidroxid de sodiu și 500 mL apă distilată prefiltrată și omogenizarea prin agitare (utilizând agitator magnetic) la 150 rpm, timp de 10 minute;

B3. digestia propriu-zisă se realizează prin ultrasonarea amestecului obținut în etapa A3 la 30°C, timp de 20 minute;

C3. filtrarea amestecului obținut în etapa B3 pe filtre cu porozitate 12-15 μm. Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.

După finalizarea celor 3 etape (A3, B3, C3), filtrele sunt stocate în cutii Petri (sterilizate în prealabil) la temperatura camerei până la analiza propriu-zisă a microplasticelor.

4. Pentru extracția microplasticelor din probe de unt se parcurg următoarele etape:

A4. Pretratarea a 8 g unt cu 4 g dodecilsulfat de sodiu, 1 g hidroxid de sodiu și 500 mL apă distilată prefiltrată și omogenizarea prin agitare (utilizând agitator magnetic) la 150 rpm, timp de 10 minute;

B4. digestia propriu-zisă se realizează prin ultrasonarea amestecului obținut în etapa A4 la 30°C, timp de 20 minute;

C4. filtrarea amestecului obținut în etapa B4 pe filtre cu porozitate 12-15 μm. Amestecul se păstrează pe baie de apă, la temperatura de 60°C până la filtrarea completă.

După finalizarea celor 3 etape (A4, B4, C4), filtrele sunt stocate în cutii Petri (sterilizate în prealabil) la temperatura camerei până la analiza propriu-zisă a microplasticelor.

REFERINȚE

- Abidli S., Lahbib Y., Trigui El Menif N., *Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (Northern Tunisia)*, Marine Pollution Bulletin, 142 (2019), 243–252.
- Akhbarizadeh R., Moore F., Keshavarzi B., Akhbarizadeh R., Moore F., *Investigating microplastics bioaccumulation and biomagnification in seafood from the Persian Gulf: a threat to human health?*, Food Additives & Contaminants: Part A, 36 (2019), 1696–1708.
- Akoueson F., Sheldon L.M., Danopoulos E., Morris S., Hotten J., Chapman E., Li J., Rotchell J.M., *A preliminary analysis of microplastics in edible versus non-edible tissues from seafood samples*, Environmental Pollution, 263 (2020) 114452.
- Alfthan, G.; Aro, A.; Gey, K.F. Plasma homocysteine and cardiovascular disease mortality. Lancet. 1997, 349(9049), 397. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)80014-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)80014-1).
- Amato-Lourenco, L.F.; Carvalho-Oliveira, R.; Junior, G.R.; Dos Santos Galvao, L.; Ando, R.A.; Mauad, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. J. Hazard. Mater. 2021, 416, 126124. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126124>.
- Andrady, A.L. The plastic in microplastics: A review. Mar. Pollut. Bull. 2017, 119(1), 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>.
- Bai, R.; Fan, R.; Xie, C.; Liu, Q.; Liu, Q.; Yan, C.; Cui, J.; He, W. Microplastics are overestimated due to poor quality control of reagents. J. Hazard. Mater. 2023, 459, 132068. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132068>.
- Banica, A.L.; Bucur (Popa), R.M.; Dulama, I.D.; Bucurica, I.A.; Stirbescu, R.M.; Radulescu, C., Assessment of microplastics in personal care products by microscopic methods and vibrational spectroscopy. Sci. Study Res. Chem. Chemic. Eng. Biotechnol. Food Ind. 2023, 24(2), 155-171.
- Barboza L.G.A., Lopes C., Oliveira P., Bessa F., Otero V., Henriques B., Raimundo J., Caetano M., Vale C., Guilhermino L., *Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure*, Science Total Environment, 717 (2020), 134625.

- Beckingham, B.; Apintiloaiei, A.; Moore, C.; Brandes, J. Hot or not: systematic review and laboratory evaluation of the hot needle test for microplastic identification. *Microplastics Nanoplastics*. 2023, 3, 8. <https://doi.org/10.1186/s43591-023-00056-4>.
- Birnstiel S., Soares-gomes A., Gama B.A.P., *Depuration reduces microplastic content in wild and farmed mussels*, *Marine Pollution Bulletin*, 140 (2019) 241–247.
- Bonello G., Varrella P., Pane L., *First Evaluation of Microplastic Content in Benthic Filter-feeders of the Gulf of La Spezia (Ligurian Sea)*, *Journal Aquatic Food Product Technology*, 27 (2018), 284–291.
- Bour A., Avio C.G., Gorbi S., Regoli F., Hylland K., *Presence of microplastics in benthic and epibenthic organisms: Influence of habitat, feeding mode and trophic level*, *Environmental Pollution*, 243 (2018), 1217–1225.
- Buyukunal, S.K.; Zipak, S.R.; Muratoglu, K. Microplastics in a Traditional Turkish Dairy Product: Ayran. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 2023, 73(2), 139–150. <https://doi.org/10.31883/pjfn/163061>
- Campanale, C.; Savino, I.; Massarelli, C.; Uricchio, V.F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Assess the Degree of Alteration of Artificially Aged and Environmentally Weathered Microplastics. *Polymers*. 2023, 15(4), 911. <https://doi.org/10.3390/polym15040911>.
- Cominetti, A.O.; de Franceschi, F.; Pinto, P.R.; Palini, A.G. Detection of plastic microparticles in a powder-based sample by flow cytometry, 2023, WO2021144322A1. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DWO2021144322A1>
- Conti, G.O.; Ferrante, M.; Banni, M.; Favara, C.; Nicolosi, I.; Cristaldi, A.; Fiore M.; Zuccarello, P. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environ. Res.* 2020, 187, 109677. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109677>.
- Dalmau-Soler J., Ballesteros-cano R., Boleda M.R., Paraira M., Ferrer N., Lacorte S., *Microplastics from headwaters to tap water : occurrence and removal in a drinking water treatment plant in Barcelona Metropolitan area (Catalonia NE Spain)*, *Environmental Science Pollution Research*, 28 (2021), 59462–59472.

- Daniel D.B., Ashraf P.M., Thomas S.N., *Microplastics in the edible and inedible tissues of pelagic fishes sold for human consumption in Kerala, India*, Environmental Pollution, 266 (2020), 115365.
- de Franceschi, F.; Cominetti, A.O.; Pinto, P.R.; Palini, A.G. Detection of plastic microparticles in a milk based sample by flow cytometry, 2021, WO2021144321A1. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DWO2021144321A1>
- Diaz-Basantes, M.F.; Conesa, J.A.; Fullana, A. Microplastics in honey, beer, milk and refreshments in Ecuador as emerging contaminants. Sustainability. 2020, 12(14), 5514. <https://www.mdpi.com/2071-1050/12/14/5514>.
- Ding J., Li J., Sun C., Jiang F., Ju P., Qu L., Zheng Y., He C., *Detection of microplastics in local marine organisms using a multi-technology system*, Analytical Methods, 11 (2019) 78–87.
- Directiva 2008/56/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 17 iunie 2008 de instituire a unui cadru de acțiune comunitară în domeniul politicii privind mediul marin (Directiva-cadru „Strategia pentru mediul marin”) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0056>
- Geissen, V.; Mol, H.; Klumpp, E.; Umlauf, G.; Nadal, M.; Ploeg, M.; Zee, S.E.A.T.M.; Ritsema, C.J. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. Int. Soil Water Conserv. Res. 2015, 3(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>.
- Haug, A.; Hostmark, A.T.; Harstad, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. Lipids Health Dis. 2007, 6(25), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1476-511x-6-25>.
- He, H.; Li, F.; Huang, B.; Pan, X. Method for evaluating tap water risk caused by aging of plastic water pipe, 2021, CN116008048A. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DCN116008048A>
- Huang, Z.; Pan, B.; Li, Y.; Zhang, J.; Liu, H. Method for measuring contents of PP, PS and PE micro-plastics in food by pyrolysis gas chromatography, 2022, CN115436504A. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DCN115436504A>
- Jenner, L.C.; Rotchell, J.M.; Bennett, R.T.; Cowen, M.; Tentzeris, V.; Sadofsky, L.R. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. Sci. Total Environ. 2022, 831, 154907. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>.

- Jensen, R.G.; Newburg, D.S. Bovine milk lipids. In Handbook of milk composition, 1st ed.; Jensen, R.G., Ed.; Academic Press, Cambridge, United States, 1995; pp. 543–575.
- Kadac-Czapska, K.; Knez, E.; Grembecka, M. Food and human safety: the impact of microplastics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022, <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2132212>.
- Kankanige D., Babel S., *Smaller-sized micro-plastics (MPs) contamination in single-use PET-bottled water in Thailand*, *Science of The Total Environment*, 717 (2020), 137232.
- Karami, A.; Golieskardi, A.; Keong Choo, C.; Larat, V.; Galloway, T.S.; Salamatinia, B. The presence of microplastics in commercial salts from different countries. *Sci. Rep.* 2017, 7(1), 46173. <https://doi.org/10.1038/srep46173>.
- Keenan, T.W.; Patton, S. The structure of milk: Implications for sampling and storage. In Handbook of milk composition, 1st ed.; Jensen, R.G., Ed.; Academic Press, Cambridge, United States, 1995; pp. 5–50.
- Kosuth, M.; Mason, S.A.; Wattenberg, E.V. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLoS One.* 2018, 13(4), e019497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970>.
- Kutralam-Muniasamy, G.; Perez-Guevara, F.; Elizalde-Martinez, I.; Shruti, V.C. Branded milks – Are they immune from microplastics contamination?. *Sci. Total Environ.* 2020, 714, 136823. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136823>.
- Laskar, N.; Kumar, U. Plastics and microplastics: a threat to environment. *Environ. Technol. Innov.* 2019, 14, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352>.
- Lee, H.J.; Song, N.S.; Kim, J.S.; Kim, S.K. Variation and Uncertainty of Microplastics in Commercial Table Salts: Critical Review and Validation. *J. Hazard. Mater.* 2021, 402, 123743. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123743>.
- Lencho, G.K.; Seblewongel, A.M. Assessment of dairy farmers hygienic milking practices and awareness on cattle milk-borne zoonoses in Bishoftu, Ethiopia. *J. Vet. Med. Anim. Health.* 2018, 10(2), 45–54. <http://dx.doi.org/10.5897/JVMAH2017.0602>.
- Li, L.; Zhou, Q.; Yin, N.; Tu, C.; Luo, Y. Uptake and accumulation of microplastics in an edible plant. *Chin. Sci. Bull.* 2019, 64, 928–934. <http://dx.doi.org/10.1360/N972018-00845>.
- Lu, S.; Qiu, R.; Hu, J.; Li, X.; Chen, Y.; Zhang, X.; Cao, C.; Shi, H.; Xie, B.; Wu, W.M.; He, D. Prevalence of microplastics in animal-based traditional medicinal materials: Widespread

- pollution in terrestrial environments. *Sci. Total Environ.* 2020, 709, 136214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136214>.
- Lusher, A.L.; Welden, N.A.; Sobral, P.; Cole, M. Sampling, isolating, and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Anal. Methods.* 2017, 9, 1346–1360. <https://doi.org/10.1039/C6AY02415G>.
- Mistri, M.; Scoponi, M.; Sfriso, A.A.; Munari, C.; Curiotto, M.; Sfriso, A.; Orlando-Bonaca, M.; Lipej, L. Microplastic contamination in protected areas of the Gulf of Venice. *Water Air Soil Pollut.* 2021, 232, 379. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05323-9>.
- Montano, L.; Giorgini, E.; Notarstefano, V.; Notari, T.; Ricciardi, M.; Piscopo, M.; Motta, O. Raman microspectroscopy evidence of microplastics in human semen. *Sci. Total Environ.* 2023, 901, 165922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165922>.
- Nilsson, M.; Holst, J.J.; Bjorck, I.M. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85(4), 996–1004. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.4.996>.
- Pham, D.T.; Kim, J.; Lee, S.H.; Kim, J.; Kim, D.; Hong, S.; Jung, J.; Kwon, J.H. Analysis of microplastics in various foods and assessment of aggregate human exposure via food consumption in Korea. *Environ. Pollut.* 2023, 322, 121153. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121153>.
- Rummel, C.D.; Jahnke, A.; Gorokhova, E.; Kuhnel, D.; Schmitt-Jansen, M. The impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2017, 4(7), 258–267. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00164>.
- Shruti, V.C.; Perez-Guevara, F.; Elizalde-Martínez, I.; Kuttralam-Muniasamy, G. First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks - Future research and environmental considerations. *Sci. Total Environ.* 2020, 726, 138580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138580>.
- Singh, S.; Trushna, T.; Kalyanasundaram, M.; Tamhankar, A.J.; Diwan, V. Microplastics in drinking water: a macro issue. *Water Supply.* 2022, 22(5), 5650–5674. <https://doi.org/10.2166/ws.2022.189>.

- Wirnkor, V.A.; Ebere, E.C.; Ngozi, V.E. Microplastics, an emerging concern: A review of analytical techniques for detecting and quantifying microplastics. *Anal. Methods Environ. Chem. J.* 2019, 2(2), 13–30. <https://doi.org/10.24200/amecj.v2.i2.57>.
- Yenew, C.; Tadele, F.; Minuye, B.; Sisay, E.; Asmamaw, T.; Mulatu, S.; Demissie, B. Raw cow milk nutritional content and microbiological quality predictors of South Gondar zone dairy farmers in Ethiopia. *Heliyon.* 2020, 8(10), e11020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11020>.
- Zhang, F.; Xu, J.; Wang, X.; Jabeen, K.; Li, D. Microplastic contamination of fish gills and the assessment of both quality assurance and quality control during laboratory analyses. *Mar. Poll. Bull.* 2021, 173(B), 113051. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113051>.
- Zhou, G.; Wu, Q.; Wei, X.F.; Chen, C.; Ma, J.; Crittenden, J.C.; Liu, B. Tracing microplastics in rural drinking water in Chong-Qing, China: Their presence and pathways from source to tap. *J. Hazard. Mater.* 2023, 459, 132206. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132206>.