

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Lab-On-a-Chip per sensing di nanoparticelle in soluzioni acquose

Relatore

Prof.ssa Cinzia Sada

Correlatore

Dr. Giovanni Bragato

Laureando

Sofia Marchetto

Anno Accademico 2022/2023

Indice

Introduzione	2
1 Applicabilità e limitazioni dell'imaging iperspettrale nella rilevazione di nanoparticelle in acqua	4
1.1 Analisi dei dati multispettrali per Componenti Principali ed estrazione degli Endmembers	4
1.1.1 Cubo multispettrale	4
1.1.2 Analisi per Componenti Principali	5
1.1.3 Estrazione degli Endmembers	6
1.2 Apparato sperimentale e condizioni operative	6
1.2.1 Set-up strumentale	6
1.2.2 Soluzioni di microplastiche e preparazione dei vetrini	6
1.2.3 Possibili limiti nell'identificazione di nanoparticelle disperse in soluzioni acquose	7
1.3 Analisi dati e risultati	7
1.3.1 Confronto tra diverse concentrazioni	7
1.3.2 Sovrapposizione di un secondo vetrino	8
1.3.3 Gocce di tipo PS e PMMA	9
1.3.4 Confronto con un frammento di plastica macroscopico	10
1.3.5 Evaporazione della parte acquosa	11
1.4 Stima di rilevabilità di nanoparticelle per l'imaging iperspettrale	12
2 Implementazione di sensing ad elevata sensibilità mediante un Lab-On-a-Chip optofluidico	13
2.1 Chip in Niobato di Litio	13
2.1.1 Stadio ottico	14
2.1.2 Stadio microfluidico	14
2.2 Apparato sperimentale e condizioni operative	14
2.2.1 Laser e detector	15
2.2.2 Regolazione dei flussi	15
2.2.3 Generazione delle gocce	15
2.3 Analisi dati	17
2.4 Misure in fase continua di esadecano	19
2.4.1 Confronto tra integrali in diverse combinazioni di flussi	19
2.4.2 Confronto tra segnali relativi a laser in diverse lunghezze d'onda	20
2.5 Misure in fase continua di novec	20
2.5.1 Soluzione con nanosfere PS - 617 nm	20
2.5.2 Soluzioni con nanosfere PS e PMMA al variare di diametro e concentrazione	22
2.5.3 Confronti tra integrali significativi	22
2.5.4 Analisi di distinguibilità in funzione della larghezza dei picchi	23
2.6 Effetto delle condizioni di accoppiamento tra laser e guida di luce sul risultato dell'integrale	28
Conclusioni	29

Introduzione

L'impatto ambientale dovuto al rilascio di materiali plastici [1], in particolare se non riciclabili, è in forte aumento negli ultimi anni e ha creato grande preoccupazione nella comunità scientifica per i suoi effetti nocivi sulla flora, sulla fauna e sulla salute umana. La pericolosità delle plastiche inquinanti aumenta notevolmente quando queste sono disperse in forma di microplastiche (MP). Attualmente, infatti, quasi il 71% dei rifiuti di plastica viene assorbito direttamente dall'ambiente, mentre i rifiuti rimanenti vengono riutilizzati in un formato diverso, con conseguente maggiore inquinamento da microplastica [2]. È stato riscontrato poi che la concentrazione di microplastiche negli ecosistemi acquatici aumenta costantemente di anno in anno, essendo correlata all'aumento della produzione di plastica su base annuale [2].

Le MP possono avere varie dimensioni, strutture, densità, colori e possono essere costituite da diversi tipi di polimeri e incorporare anche altri inquinanti. A ciò si aggiunge il fatto che le MP sono sempre presenti in concentrazioni sconosciute quando trovate all'interno delle miscele. Data una tale variabilità nelle caratteristiche fisiche e chimiche delle microplastiche, queste sono difficili da rilevare, soprattutto quando disperse in miscele o quando sovrapposte (ciò è particolarmente vero nel caso di frammenti di etichette di plastica trasparente che coprono oggetti di plastica trasparente). Pertanto, una corretta gestione del rilevamento e dell'identificazione dei contaminanti plastici e microplastici potrebbe aiutare a monitorare l'inquinamento ambientale e a salvaguardare ecosistemi, riducendone anche le conseguenze sulla salute umana.

Per il rilevamento delle MP sono state proposte varie tecniche di indagine, che possono essere suddivise in due gruppi principali [2] a seconda dell'approccio analitico utilizzato: si basano su proprietà fisiche (ad esempio colore, dimensione) o chimiche (cioè composizione, struttura) [3]. L'analisi visiva è ancora il metodo maggiormente utilizzato per identificare MP colorate di medio-grandi dimensioni tramite l'imaging, ma la risoluzione spaziale delle telecamere impedisce il rilevamento della maggior parte delle particelle più piccole. Altre tecniche sono state applicate ma non ancora in modo soddisfacente. Tra tutte, lo stereomicroscopio è stato il primo ad essere utilizzato per l'analisi morfologica e il conteggio delle MP, ma soffre di limitazioni dimensionali nel rilevamento delle MP stesse. Infatti è stato stimato che durante il test può verificarsi fino al 70% dell'errore di misurazione e questa percentuale di errore aumenta al diminuire della dimensione delle particelle. La microscopia elettronica a scansione (SEM) è stata invece sfruttata per rilevare le MP grazie alla sua capacità di produrre immagini ad alta definizione [4]. Tuttavia, essendo dispendioso in termini di tempo e denaro, il SEM non può essere utilizzato in modo sistematico. La spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS), è stata impiegata anche per determinare la composizione chimica delle particelle di plastica, ma presenta inconvenienti simili al SEM. È infatti difficile avere accesso regolarmente a strutture adeguate e la preparazione dei campioni richiede tempo e grandi sforzi. Come approcci alternativi sono stati proposti metodi non distruttivi, come la spettroscopia Raman e FTIR, nonché metodi distruttivi come la cromatografia liquida (LC) e la gascromatografia connessa alla spettrometria di massa (GC-MS), che comprende la gascromatografia-pirolisi-spettrometria di massa e la gascromatografia a desorbimento termico [5] rispettivamente. Tutte queste tecniche di indagine hanno alcuni limiti di applicabilità, tra cui sicuramente il loro impiego quando le microplastiche sono disperse in acqua. Le principali ragioni per cui non sono stati scelti ed implementati per rilevare le MP in modo sistematico vanno tuttavia ricercate anche nella lunga procedura di preparazione del campione e/o nei protocolli di misurazione lunghi e complessi, che richiedono ingenti investimenti ed esperti qualificati in particolare per l'analisi

dei dati. Ad ogni modo, la maggior parte di essi non è in grado di distinguere la plastica trasparente quando sovrapposta ad altra plastica. Esiste quindi la necessità di sviluppare un metodo che sia in grado di identificare le (micro)plastiche in modo chiaro, intuitivo ed efficace e allo stesso tempo facilmente implementabile e riproducibile.

In questo lavoro di tesi, si propone l'imaging iperspettrale (HSI) come una soluzione altamente innovativa, non invasiva e di grande interesse per l'industria essendo flessibile, facilmente implementabile e portatile. L'HSI è infatti una tecnica che combina i vantaggi dell'imaging (ovvero la risoluzione spaziale) con quelli dell'analisi spettrale (ovvero una "impronta digitale" dei materiali e la quantificazione dei componenti) consentendo al contempo di analizzare un oggetto in modo non invasivo ed evitando potenziali contaminazioni. Nello specifico, l'HSI permette di acquisire lo spettro di riflettanza in un certo intervallo di frequenza associato a ciascun pixel dell'immagine di un oggetto, perciò fornisce allo stesso tempo dati di imaging e dati spettrali. Si ottengono quindi mappature spazialmente e spettralmente risolte della superficie dei materiali investigati.

L'HSI viene combinato con l'analisi dei componenti principali (PCA) [6] per identificare diverse plastiche con elevata precisione e per distinguere diverse microplastiche in miscele sconosciute. Ciò si ottiene trovando le "firme spettrali pure" (Endmembers) di ciascuna microplastica e quantificando la loro quantità (abbondanza) in ciascun pixel che compone l'immagine originale. La combinazione sinergica di HFI e PCS ha permesso di distinguere un determinato materiale plastico rispetto allo sfondo circostante, dunque in questo lavoro è stata impiegata anche per l'identificazione di miscele di microplastiche disperse casualmente in acqua.

Ad affiancare e potenziare la tecnica di imaging iperspettrale si propone anche un metodo di rilevazione che combina ottica e microfluidica mediante l'utilizzo di un chip di Niobato di Litio, con lo scopo specifico di verificare la rilevabilità di nanoparticelle polimeriche in gocce d'acqua. La microfluidica prevede l'utilizzo di ridotti volumi di fluido (dal nL al pL) e garantisce limitata perturbazione del campione di fluido investigato, prestandosi ad elevate integrabilità e portabilità. L'ottica integrata si occupa invece di controllare e manipolare fenomeni luminosi in modo che la luce nelle guide ottiche svolga un ruolo analogo a quello della corrente nei circuiti elettronici. La funzione dello stadio ottico è quindi quella di un sensore volto a rilevare i materiali presenti nei mezzi attraversati dalla luce.

Il dispositivo integra sullo stesso substrato uno stadio microfluidico, per la generazione di gocce, e uno stadio ottico, formato da guide di luce che permettono la trasmissione confinata di luce. Tali guide sono state realizzate perpendicolarmente al canale microfluidico principale. L'accoppiamento di luce laser alla singola guida di fatto permette di illuminare la goccia lateralmente rispetto il moto della goccia. Rilevando la luce trasmessa attraverso il canale microfluidico, è possibile quindi acquisire un segnale in risposta all'interazione con le microplastiche disperse nelle gocce, permettendone così l'identificazione in maniera non distruttiva.

Nel presente lavoro di tesi, si intende studiare il campo di applicabilità dell'imaging iperspettrale e dell'opto-microfluidica nella rivelazione di microplastiche disperse in soluzioni acquose. Si pongono quindi in evidenza limiti e potenzialità delle due tecniche, analizzando le medesime soluzioni di microplastiche e confrontando i risultati ottenuti. Tale analisi è articolata rispettivamente nel *Capitolo 1* per l'imaging iperspettrale e nel *Capitolo 2* per i metodi di ottica e microfluidica. Oltre all'identificazione delle microplastiche, si studia la distinguibilità tra soluzioni aventi diverse caratteristiche chimiche e fisiche: l'obiettivo è individuare un metodo che sia efficace nel superare le criticità di rilevazione legate all'ampia variabilità delle microplastiche.

Capitolo 1

Applicabilità e limitazioni dell'imaging iperspettrale nella rilevazione di nanoparticelle in acqua

La prima tecnica di misura di cui si è fatto uso per la rivelazione di nanoparticelle in soluzioni acquose è l'imaging iperspettrale, che consente di acquisire lo spettro di riflettanza di un oggetto in un determinato intervallo di lunghezze d'onda, fornendo al contempo una mappatura spettrale spazialmente risolta della sua superficie. Nello specifico, è stata studiata la risposta di varie soluzioni di micro e nanoplastiche, opache e semitrasparenti, all'osservazione mediante la camera multispettrale a infrarossi *Unispectral ColorIR EVK-UNS61000* [7].

L'analisi delle microplastiche tramite imaging iperspettrale si propone di testare un limite di rilevabilità di tale tecnica al diminuire della dimensione dei campioni osservati, potendo così estendere un'analisi già effettuata in lavori precedenti ed applicata prevalentemente a frammenti plastici macroscopici e a plastiche di dimensione millimetrica [8,9]. L'utilizzo di microplastiche disperse in soluzioni acquose permette poi di verificare la capacità della camera multispettrale di individuare i materiali plastici nonostante l'elevata assorbanza dell'acqua nell'infrarosso. In definitiva, ci si propone quindi di definire il campo di applicabilità di questa tecnica per la rivelazione di nanoparticelle in acqua, mettendone in evidenza in particolare le limitazioni che rendono necessario il passaggio ad un metodo a maggiore sensibilità.

1.1 Analisi dei dati multispettrali per Componenti Principali ed estrazione degli Endmembers

Il procedimento di analisi dei dati acquisiti su cui si basa la tecnica di imaging iperspettrale ha come scopo la caratterizzazione dei materiali tramite uno spettro di risposta alla radiazione incidente che possa essere formulato come combinazione lineare di *firme spettrali* pure. Di seguito si presenta il metodo nei suoi elementi fondamentali, rimandando a [7] per una descrizione dettagliata del modello matematico sottostante.

1.1.1 Cubo multispettrale

La camera multispettrale acquisisce immagini della dimensione $M \times N = 1280 \times 800$ pixels. A ciascun pixel ($\simeq 100 \times 100 \mu\text{m}$) viene attribuito un valore di intensità in scala di grigi tra $I_{min} = 0$ e $I_{max} = 2^p - 1$, ove p rappresenta la precisione dello strumento nella misura di intensità: per la camera utilizzata vale $p = 10$ pixels, dunque $I \in [0, 1023]$. Ciascuna immagine viene inoltre acquisita in uno spettro di $K = 8$ lunghezze d'onda (711, 741, 768, 797, 826, 855, 884, 918 nm). Dunque, l'informazione in intensità luminosa ad ogni lunghezza d'onda e per ciascun pixel di un'immagine digitalizzata è racchiusa in un tensore di dimensioni $M \times N \times K$, detto *cubo multispettrale*.

1.1.2 Analisi per Componenti Principali

Per poter trattare un problema di così elevata dimensionalità, senza tuttavia perdere l'originale variabilità in termini di intensità luminosa per ogni lunghezza d'onda, è necessario considerare ciascun cubo multispettrale come costituito da vettori a $\mathcal{N} \equiv M \times N$ componenti e definiti in uno spazio K -dimensionale, per procedere poi con il metodo di *Analisi delle Componenti Principali* (Principal Component Analysis, PCA). Tale procedimento di analisi si propone di ridurre la complessità del problema sfruttando la correlazione presente nell'informazione iniziale fornita dal cubo multispettrale. A questo scopo si calcola la matrice di covarianza Γ , avente elementi di matrice $\Gamma_{i,j}$ pari ai coefficienti di correlazione di Pearson $\rho_{\lambda_i, \lambda_j}$ tra i vettori del cubo multispettrale relativi alle lunghezze d'onda λ_i e λ_j . Γ è funzione della covarianza tra le lunghezze d'onda considerate, $\text{cov}(\lambda_i, \lambda_j)$, e delle deviazioni standard σ_i, σ_j secondo la relazione

$$\Gamma_{i,j} = \rho_{\lambda_i, \lambda_j} = \frac{\text{cov}(\lambda_i, \lambda_j)}{\sigma_i \sigma_j}$$

Si mostra un esempio di matrice di covarianza in Figura 1.1a.

Dato che a comporre gli elementi del cubo multispettrale sono valori di intensità luminosa, questo è formato da componenti reali e di conseguenza anche la matrice di covarianza è reale e simmetrica. È possibile quindi diagonalizzarla in una forma $C = \text{diag}(\lambda_1, \dots, \lambda_K)$ tale per cui valga $\Gamma = UCU^\top$, con $\lambda_1, \dots, \lambda_K$ autovalori ($\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_K$) e U matrice di cambio di base. Tramite la proiezione del set di dati iniziale sulla base di autovettori di Γ si ricavano le componenti principali del set, ciascuna associata ad un particolare autovalore; il peso π con cui la k -esima componente contribuisce nella caratterizzazione dello spettro del materiale è dato da

$$\pi_k = \frac{\lambda_k}{\sum_{k=1}^K \lambda_k} = \frac{\lambda_k}{\text{Tr}(C)}$$

Di fatto, le componenti principali che contribuiscono con maggior peso nello spettro del materiale sono le $D < K$ componenti per cui la varianza cumulativa (il cui andamento è mostrato in Figura 1.1b) è almeno pari a 0.95, dunque si considerano soltanto le proiezioni dei dati iniziali sui primi D autovettori di Γ . Si può dimostrare che le componenti principali così ricavate sono ora totalmente non correlate, per cui è stata rimossa la ridondanza dei dati iniziali e ne è stata ricavata la massima informazione tramite la decomposizione in elementi indipendenti.

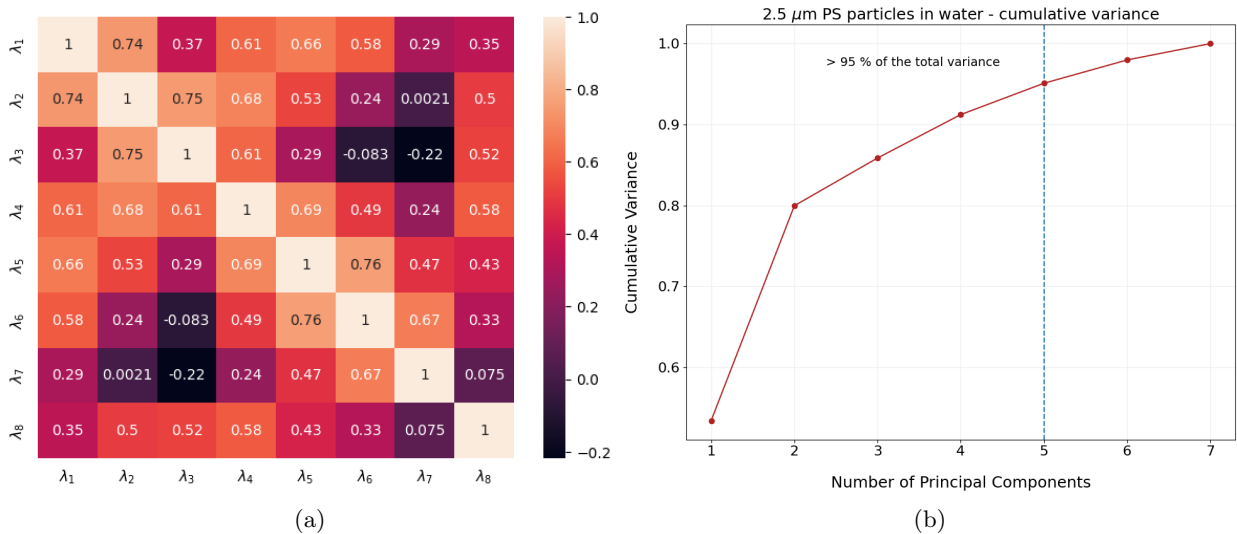


Figura 1.1: Esempi di matrice di covarianza e di varianza cumulativa per l'analisi di un campione di microplastiche

1.1.3 Estrazione degli Endmembers

Ciascun vettore di N pixels, associato ad una delle K lunghezze d'onda, rappresenta una componente principale del set, ottenuta proiettando i dati iniziali su $D < K$ autovettori di Γ . Ogni componente principale può essere considerata come combinazione di firme spettrali pure, definite *Endmembers*, che descrivono la risposta spettrale del materiale alla radiazione incidente. Il modello utilizzato per ricavare tale combinazione (*Linear Mixing Model*) prevede che la sovrapposizione di $L \leq D$ Endmembers sia lineare, ove il peso con cui contribuisce ciascun Endmember è detto *abbondanza*. In notazione matriciale, si può quindi esprimere la matrice $Y_{D \times N}$ delle componenti principali come combinazione lineare, tramite la matrice $A_{L \times N}$ delle abbondanze, di L Endmembers contenuti nella matrice $R_{D \times L}$, a cui si somma l'eventuale rumore dato dalla matrice $G_{D \times N}$, ottenendo

$$Y = RA + G$$

L'estrazione delle firme spettrali relative alle L lunghezze d'onda conservate e il calcolo delle corrispondenti abbondanze procede tramite due algoritmi con i quali è possibile infine ottenere, per ciascun Endmember riconosciuto come firma spettrale del materiale, una mappatura in termini di una scala di colori corrispondenti alle abbondanze.

1.2 Apparato sperimentale e condizioni operative

1.2.1 Set-up strumentale

La camera multispettrale viene posizionata, tramite un braccio metallico regolabile, all'altezza di 25 cm dal banco ottico, ovvero ad una distanza pari alla lunghezza focale della lente che costituisce l'obiettivo della fotocamera. I materiali di cui analizzare la risposta nell'infrarosso vengono invece posti su di un foglio bianco e illuminati sia dal LED a infrarossi della camera, con lunghezza d'onda di (810 ± 5) nm, sia da una lampada a luce LED da scrivania affiancata alla strumentazione, avente potenza di 100 W e flusso luminoso di 1521 lm.

Prima di procedere con le acquisizioni dei campioni di microplastiche, è stata effettuata una scansione del foglio bianco che costituisce un fondo di intensità da sottrarre in corso di analisi dei dati.

1.2.2 Soluzioni di microplastiche e preparazione dei vetrini

I campioni che sono stati analizzati consistono in soluzioni di produzione commerciale contenenti nanoplastiche: nello specifico sono state utilizzate soluzioni contenenti nanosfere PS-Research particles PS-R-KM303 e PMMA-Research particles PMMA-R-KM303 (Micro Particles GmbH, Berlino, Germania).

Si presentano le caratteristiche delle soluzioni utilizzate nelle misure: si è stabilito di svolgere l'analisi per soluzioni di nanosfere PS con tre possibili diametri, ciascuna delle quali in due concentrazioni sufficientemente diverse, mentre per le plastiche di tipo PMMA (semitrasparenti e dunque più difficilmente visibili) sono state analizzate unicamente le nanosfere di diametro più elevato nella soluzione più concentrata.

Tipo di plastica	Massa [mg]	Diametro [nm]	Concentrazione plastica/acqua [mg/g]
PS	1.3	617	0.64 ± 0.05
	16.7	617	4.47 ± 0.03
	7.1	1050	0.66 ± 0.01
	13.4	1050	4.32 ± 0.01
	6.9	2500	0.65 ± 0.01
PMMA	14.0	2500	4.51 ± 0.05
	13.7	2500	4.44 ± 0.06

Tabella 1.1: Soluzioni di microplastiche utilizzate - masse note con deviazione standard di 0.1 mg

Per la scansione tramite camera a infrarossi sono stati posizionati su dei vetrini da microscopio delle gocce di capacità 0.1 ml, prelevate dalle soluzioni di microplastiche. Sono state analizzate le gocce sia direttamente rilasciate sul vetrino con forma approssimativamente semisferica, sia sparse sulla superficie in regioni più ampie, sia completamente ridotte ad un film sottile tramite la sovrapposizione di un secondo vetrino.

Le soluzioni di PMMA e di PS con diametro 617 nm e concentrazione rispettiva 4.44 mg/g e 4.47 mg/g sono state osservate sullo stesso vetrino. Inoltre, relativamente alle soluzioni di PS con diametro 2500 nm e concentrazione 4.51 mg/g, sono state effettuate delle ulteriori scansioni avendo atteso l'evaporazione dell'acqua contenuta nella soluzione e affiancato il vetrino con un frammento macroscopico della medesima plastica.

1.2.3 Possibili limiti nell'identificazione di nanoparticelle disperse in soluzioni acquose

Una particolare condizione operativa con cui si può utilizzare la camera multispettrale è quella in cui i materiali da analizzare siano immersi in una soluzione acquosa. In tal caso, dato che la camera rileva radiazioni in lunghezze d'onda dell'infrarosso, un fattore non trascurabile nella buona riuscita delle misure è dato dall'intensità della radiazione assorbita dall'acqua alle lunghezze d'onda coinvolte. Tale proprietà è detta assorbanza e, se elevata, riduce notevolmente la frazione di radiazione trasmessa dal materiale che può essere rivelata dal sensore della fotocamera.

Lo spettro di assorbanza dell'acqua cresce nelle lunghezze d'onda dell'infrarosso [10], per cui si prevede che la camera, in tali condizioni di misura, potrebbe non avere un potere risolvete sufficiente all'identificazione di nanoparticelle in acqua. L'analisi di micro e nano plastiche in soluzioni acquose tramite imaging iperspettrale si configura quindi anche come una quantificazione della sensibilità strumentale ed una verifica dell'adeguatezza del metodo in presenza di acqua.

1.3 Analisi dati e risultati

Di seguito si espongono i risultati di estrazione degli Endmembers (EMs) per ciascuna scansione effettuata con la camera multispettrale. Si riportano, in alcuni casi, le immagini risultanti dall'analisi con 4 EMs poiché è stato osservato che, quando presenti in numero maggiore, almeno due EMs risultano molto simili e forniscono quindi un'informazione ridondante.

1.3.1 Confronto tra diverse concentrazioni

Si mostrano le acquisizioni per le microplastiche PS con diametro 1050 nm e 2500 nm, nelle due possibili concentrazioni utilizzate, affiancando le immagini relative alle soluzioni contenenti le stesse sfere ma differenti per concentrazione.

Si osserva che le gocce, per le soluzioni meno concentrate, sono messe in evidenza primariamente dal riflesso della luce sulla superficie, che ne definisce il bordo e la sommità con dei punti più scuri, ma nella parte centrale queste tendono a confondersi con il fondo del vetrino. La distinguibilità tuttavia migliora con l'aumento del diametro delle microsfele. Le gocce delle soluzioni più concentrate risultano invece sempre ben distinguibili dal fondo, con un colore della parte centrale in alcuni casi più scuro ed in altri nettamente diverso dal vetrino, mentre la componente di riflesso, comunque presente, è meno rilevante per l'individuazione della goccia rispetto al caso precedente. Da tali osservazioni si deduce che le soluzioni più concentrate, oppure contenenti microplastiche più grandi, vengono rivelate dalla camera a infrarossi nonostante la presenza di acqua.

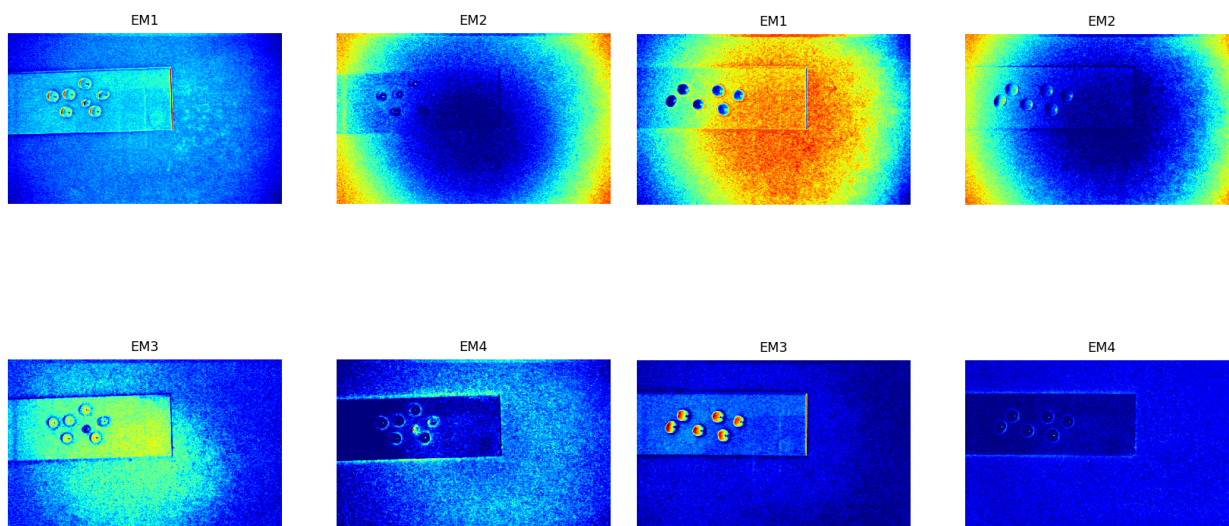


Figura 1.2: Gocce - PS 1050 nm ($C = 0.66$ mg/g - $C = 4.32$ mg/g)

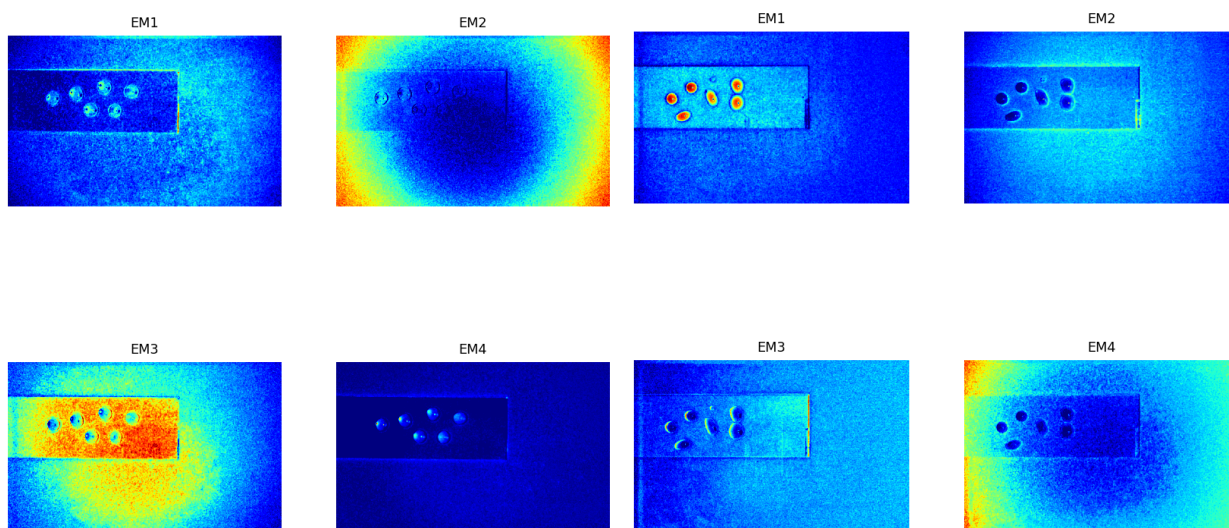


Figura 1.3: Gocce - PS 2500 nm ($C = 0.65$ mg/g - $C = 4.51$ mg/g)

1.3.2 Sovrapposizione di un secondo vetrino

Al fine di sondare il limite di rilevabilità della camera per nanoparticelle maggiormente disperse, sono state eseguite delle acquisizioni dopo la sovrapposizione di due vetrini, tra i quali è stato lasciato interposto il film di soluzione. Questa configurazione, qui analizzata per le plastiche PS 2500 nm più concentrate, anche in presenza di una soluzione con caratteristiche che in precedenza ne hanno favorito la visibilità rende più difficile la rilevabilità delle microplastiche, probabilmente a causa dello spessore molto ridotto della soluzione ed alla conseguente riduzione degli aggregati. Si vede infatti che:

- nel EM 1 il vetrino e lo sfondo vengono quasi interamente caratterizzati dallo stesso colore;
- nel EM 3 domina l'andamento concentrico di intensità della sorgente luminosa, come anche nel EM 6 in cui però il vetrino viene distinto dal fondo;
- nei restanti EMs viene evidenziata in rosso una regione ridotta del vetrino in cui probabilmente sono rimasti aggregati di microplastiche.

La camera a infrarossi mostra quindi di avere una scarsa sensibilità nel rivelare nanoparticelle molto disperse.

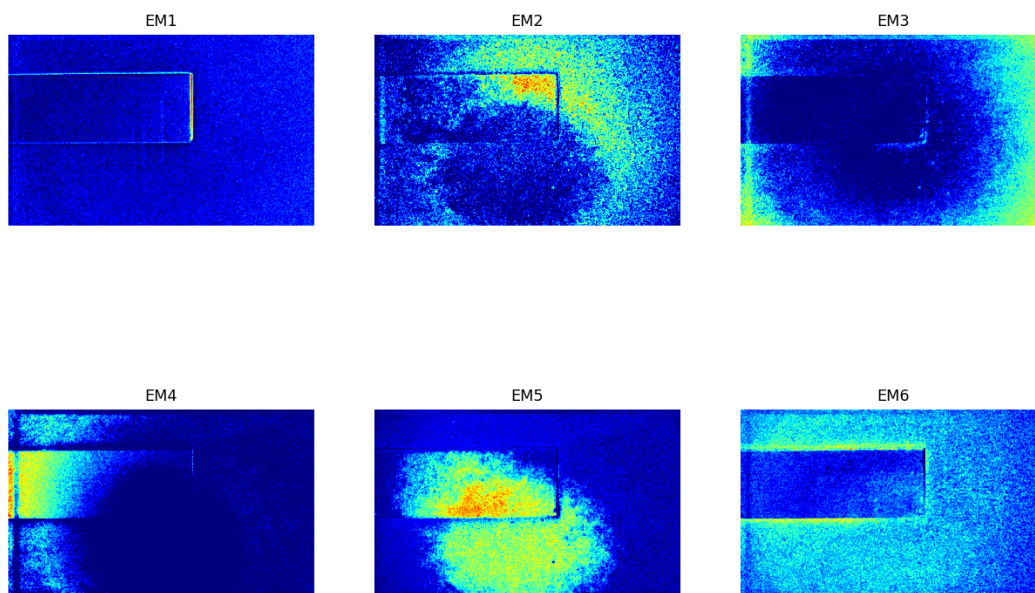


Figura 1.4: Doppio vetrino - PS 2500 nm, $C = 4.51$ mg/g

1.3.3 Gocce di tipo PS e PMMA

Si confrontano i due tipi di microplastiche a disposizione: in Figura 1.5a (PS meno concentrate) alcune gocce sono state sparse sulla superficie del vetrino, riproducendo una condizione simile alla presenza del doppio vetrino. In Figura 1.5b, le gocce di sinistra sono quelle di tipo PS più concentrate e quelle a destra di tipo PMMA di simile concentrazione.

Confrontando le plastiche PS di diversa concentrazione si ritrova conferma di quanto già osservato per le altre taglie relativamente al ruolo dei riflessi di luce e alla differenza in intensità di colorazione tra le due soluzioni. Vale lo stesso per le gocce che sono state sparse e rese così meno visibili.

Comparando poi le plastiche PS e PMMA di concentrazione simile e stessa taglia, si nota che queste ultime sono poco visibili, probabilmente perché semitrasparenti: infatti, nel EM 2 e 4 si distinguono difficilmente dallo sfondo se non grazie al riflesso sulla sommità. Negli altri EMs, tuttavia, si evidenzia un bordo diffuso e un comportamento tipico delle plastiche trasparenti, ovvero la generazione di riflessi multipli sullo sfondo. Si può concludere quindi che la camera restituisce un'immagine diversa per plastiche opache o semitrasparenti, nonostante le piccole dimensioni.

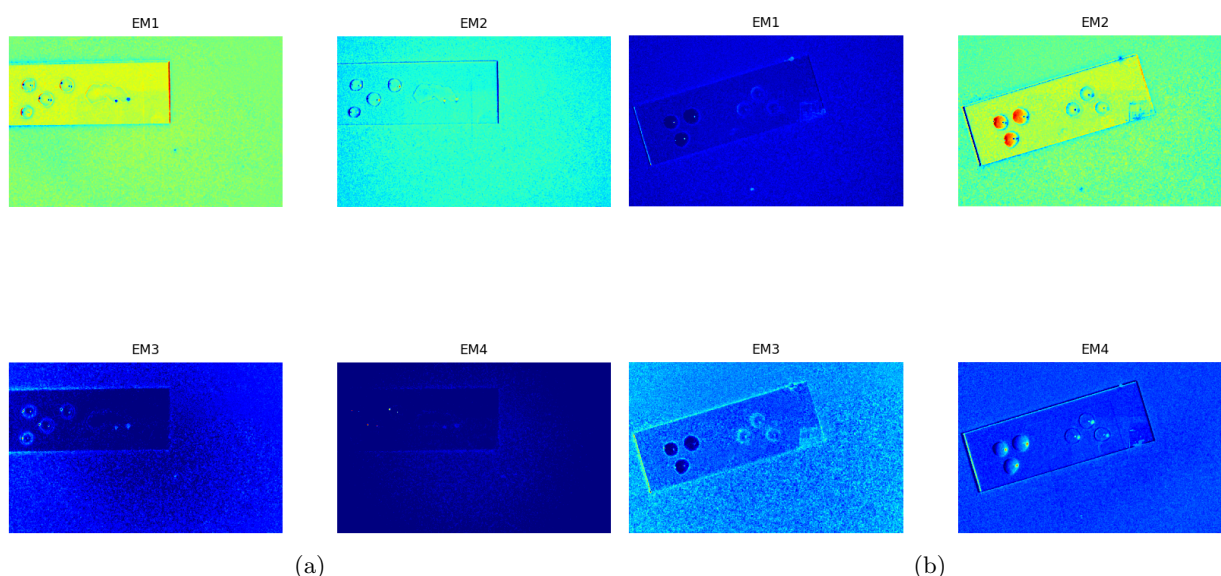


Figura 1.5: PS 617 nm, $C = 0.64$ mg/g - PS 617 nm, $C = 4.47$ mg/g + PMMA 2500 nm, $C = 4.44$ mg/g

Si confronta un EM tratto da un'acquisizione analogica (Figura 1.6a, dove le gocce di PMMA sono quelle superiori) ed uno con un secondo vetrino sovrapposto (Figura 1.6b, in cui si vede anche una lieve linea di separazione rimasta tra le due soluzioni al momento della sovrapposizione), con l'immagine risultante dall'utilizzo di frammenti di plastiche PET trasparente, provenienti da una bottiglia, alla concentrazione di 1.05 mg/g (Figura 1.6c): si osserva una notevole somiglianza nei riflessi multipli interni al vetrino, per cui si riconosce la corretta rilevazione della camera.

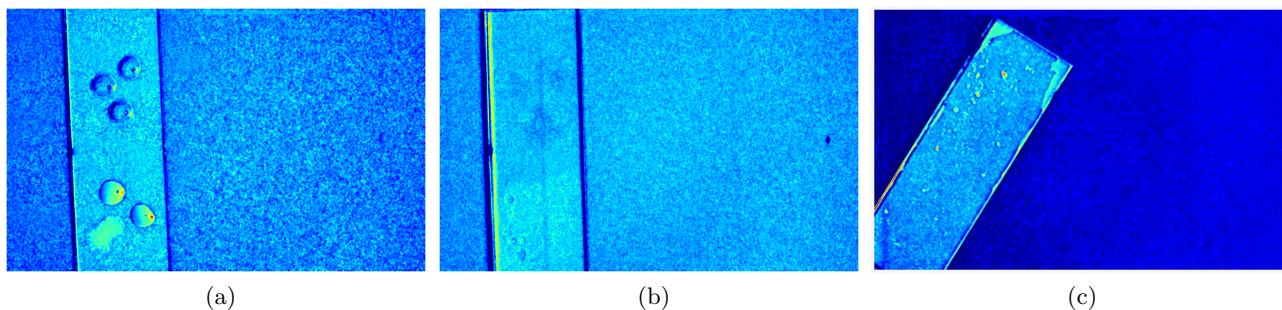


Figura 1.6: Comportamento di plastiche trasparenti e semitrasparenti

1.3.4 Confronto con un frammento di plastica macroscopico

È stata eseguita una scansione dopo aver posizionato un frammento di polistirene con dimensioni dell'ordine del centimetro, proveniente da oggetti di uso comune, accanto al vetrino con soluzione di PS 2500 nm, $C = 4.51$ mg/g. Mentre sul vetrino la colorazione non omogenea si spiega con la formazione di aggregati delle microplastiche sparse, sul frammento di polistirene è possibile che la presenza di additivi permetta di differenziare il polistirene puro da altre sostanze superficiali: si vede infatti che la camera a infrarossi riconosce con lo stesso colore alcune zone del vetrino e del frammento, identificando la presenza dello stesso materiale.

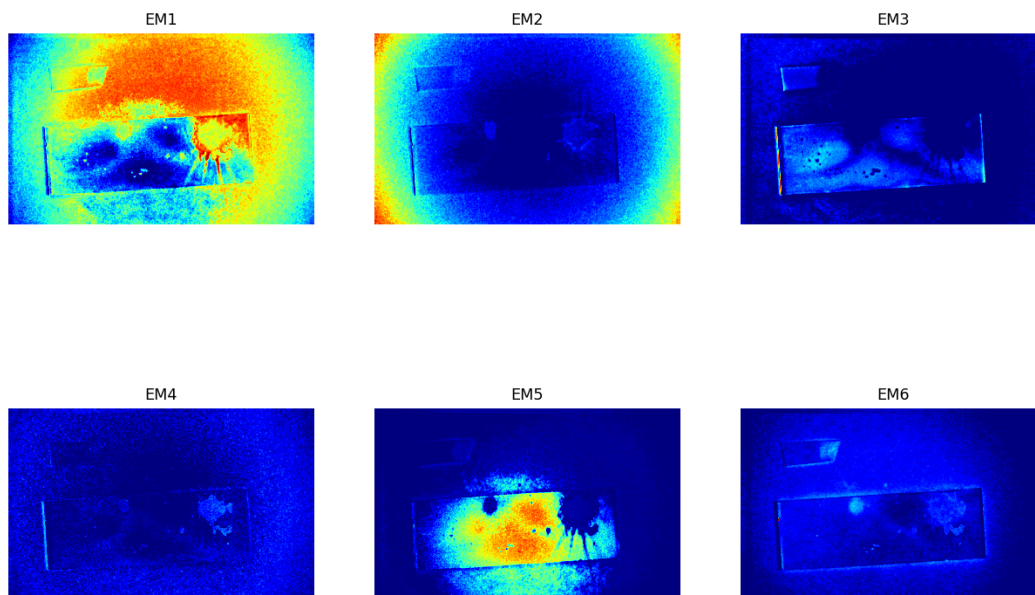


Figura 1.7: Doppio vetrino - PS 2500 nm, $C = 4.51$ mg/g con frammento di polistirene

1.3.5 Evaporazione della parte acquosa

Dopo aver sovrapposto un secondo vetrino alle gocce di PS 2500 nm alla concentrazione $C = 4.51$ mg/g, è stato atteso un tempo sufficiente a far evaporare la parte acquosa della soluzione: in questa condizione si nota una maggiore definizione degli aggregati di microplastiche, tra cui sembrano visibili anche i profili delle gocce iniziali. In presenza del frammento di plastica, poi, è più evidente l'identificazione tra il materiale del polistirene macroscopico e delle microplastiche, particolarmente negli EMs 1 e 3. Questo comportamento prova che in assenza di acqua, che ha un'elevata assorbanza nell'infrarosso, la camera diventa più sensibile e la rilevazione assomiglia maggiormente al caso di plastiche macroscopiche.

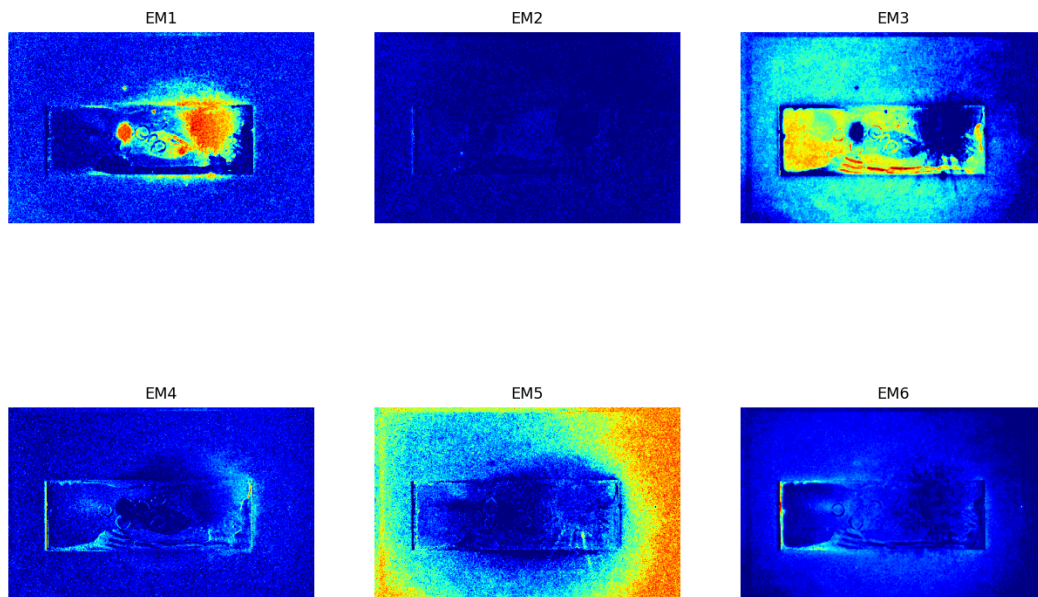


Figura 1.8: Doppio vetrino con evaporazione della parte acquosa - PS 2500 nm, $C = 4.51$ mg/g

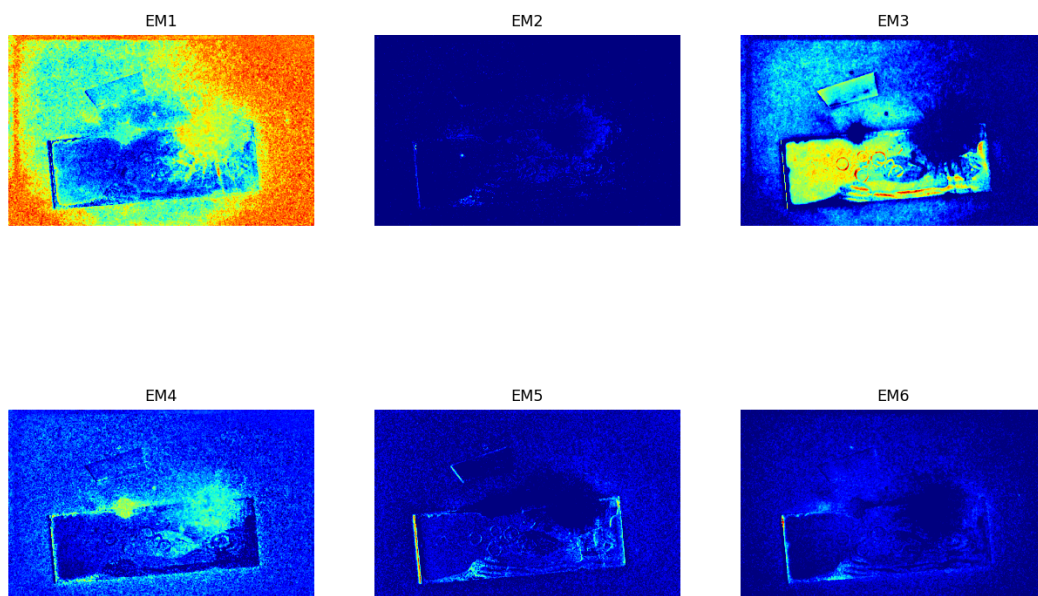


Figura 1.9: Doppio vetrino con evaporazione della parte acquosa - PS 2500 nm, $C = 4.51$ mg/g con frammento di polistirene

1.4 Stima di rilevabilità di nanoparticelle per l'imaging iperspettrale

Sulla base delle microplastiche analizzate, si può affermare che il limite di sensibilità alla dimensione delle nanoparticelle di polistirene della camera a infrarossi sia inferiore al diametro minimo utilizzato, pari a 617 nm. Per la rilevazione delle nanoparticelle in soluzione acquosa, inoltre, la minima concentrazione a cui si è ottenuto un segnale visibile è 0.64 mg/g. Tuttavia, la diversità di taglie e concentrazioni analizzate fa emergere che la capacità di rilevazione diminuisce notevolmente per particelle più piccole, più disperse superficialmente o contenute in soluzioni meno concentrate. Anche per le nanoparticelle di PMMA si è osservata una scarsa visibilità, nonostante la dimensione e la concentrazione fossero più elevate rispetto a scansioni di PS che hanno fornito un segnale simile: ciò è probabilmente dovuto alla natura semitrasparente del materiale.

In conclusione, l'analisi è ritenuta soddisfacente perché ha consentito, relativamente ai campioni utilizzati, di quantificare la risposta della camera multispettrale e di evidenziarne il campo di applicabilità. Si ricava in particolare che nei casi di microplastiche disperse superficialmente o contenute in soluzioni meno concentrate è necessario adottare un altro protocollo di misura per raggiungere lo stesso potere risolvibile osservato negli altri casi.

Capitolo 2

Implementazione di sensing ad elevata sensibilità mediante un Lab-On-a-Chip optofluidico

Obiettivo dell'analisi con metodi di opto-microfluidica è la rilevazione ad elevata sensibilità di micro e nano plastiche in gocce d'acqua. Segue poi uno studio di distinguibilità tra plastiche del medesimo tipo, ma di diversa taglia o concentrazione, e tra varie tipologie di plastiche. Si confrontano infine i risultati per misure condotte in diverse condizioni di accoppiamento tra il laser e la guida di luce. Si presentano le caratteristiche fondamentali del chip in Niobato di Litio e dell'apparato sperimentale, rimandando a [11] per una descrizione dettagliata.

2.1 Chip in Niobato di Litio

Alla base di tale tecnica di identificazione di microplastiche è previsto l'impiego di una piattaforma opto-microfluidica integrata in un chip di Niobato di Litio (LiNbO_3 , LN). I canali microfluidici e le guide di trasmissione ottica (guide di luce) vengono ricavati nello stesso substrato, sono cioè complanari e in particolare ortogonali, in modo che la luce trasmessa nel circuito ottico attraversi anche i fluidi passanti nel canale microfluidico e possa essere rivelata da un detector. Il segnale raccolto dal fotodiodo risente quindi dell'interazione della luce con i fluidi nel canale e con eventuali nanoparticelle disperse in essi, dato che nell'attraversarli la luce subisce una variazione di trasmittanza ottica legata alla differenza di indice di rifrazione dei mezzi attraversati. Dall'analisi del segnale è possibile quindi rilevare la presenza di microplastiche e, possibilmente, individuarne le principali caratteristiche (opacità o trasparenza, dimensione, concentrazione) grazie alle quali identificarle con precisione e distinguerle da altre microparticelle.

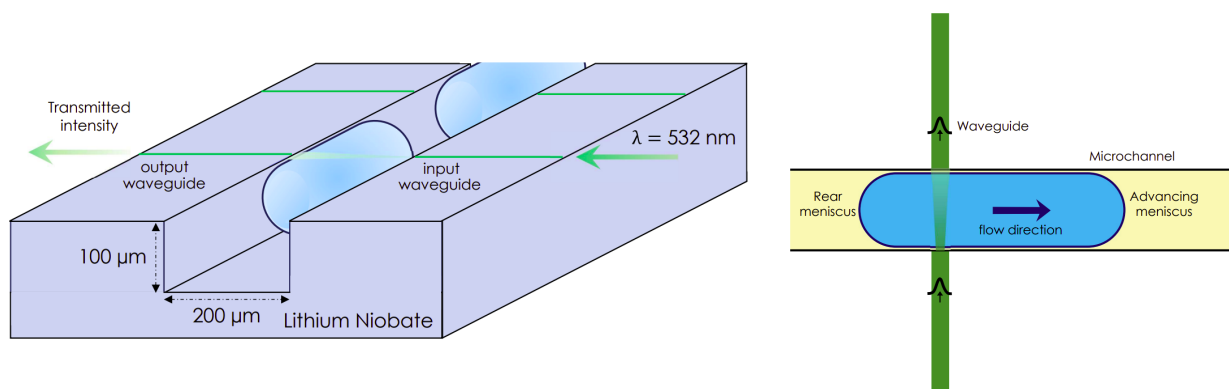


Figura 2.1: Stadio ottico e microfluidico integrati

2.1.1 Stadio ottico

Lo stadio ottico integrato del dispositivo ha la funzione di confinare la luce entro una guida grazie alla riflessione totale interna, ottenuta aumentando localmente l'indice di rifrazione del materiale in una striscia di qualche micrometro di larghezza e profondità e qualche centimetro di lunghezza (si tratta dello stesso principio fisico su cui si basa la propagazione confinata di luce nelle fibre ottiche). La guida di trasmissione ottica viene realizzata mediante un processo di diffusione termica locale di titanio e può assumere varie configurazioni, come quella di interferometro di Mach Zehnder (MZI) o di guida dritta. Nel primo caso, la luce viene separata in due fasci all'ingresso del chip, ciascuno dei quali attraversa il canale microfluidico interagendo con i fluidi e le microparticelle disperse; i due fasci vengono poi ricongiunti nella struttura a Y della guida, mostrando gli effetti dell'interferenza all'uscita del chip. Nel secondo caso, la configurazione prevede un'unica guida di trasmissione ottica, di cui il tratto in ingresso e in uscita affacciati sul canale microfluidico sono allineati. Nel presente lavoro di tesi sono state analizzate misure prese in configurazione di guida di luce dritta.

2.1.2 Stadio microfluidico

Lo stadio microfluidico prevede l'impiego di piccole quantità di fluidi, delle dimensioni dei micro e nano litri, i quali vengono confinati in un canale di larghezza media (200 ± 1) μm e profondità media (100 ± 1) μm . La struttura del canale è data da una giunzione a croce realizzata tramite un processo meccanico di asportazione del substrato per abrasione, che garantisce ottima finitura superficiale dei canali e non altera le proprietà fisiche del cristallo costituente il chip. Tale finitura deve essere di grado ottico per permettere l'accoppiamento con le guide di luce. Il circuito microfluidico viene inoltre funzionalizzato con OTS per modificarne le proprietà di bagnabilità e consentire così il passaggio di un fluido laminare all'interno del canale.

Chiudendo uno dei due bracci della croce è possibile realizzare un generatore di gocce in configurazione di giunzione a T, per il quale è richiesto l'uso combinato di due fluidi immiscibili costituenti la fase continua e la fase dispersa. Il frazionamento del fluido in gocce, eventualmente contenenti le nanoparticelle da identificare, permette di realizzare porzioni di fluido isolate dall'ambiente esterno: in questo lavoro di tesi è stato analizzato infatti il segnale risultante dall'interazione della luce con gocce microfluidiche.

Il circuito microfluidico viene chiuso superiormente con un coperchio in vetro, dato che questo materiale è compatibile con il LN, consente la realizzazione di connessioni microfluidiche in silicone ed è adeguato anche in presenza dei fluidi che comunemente vengono immessi nel canale.

2.2 Apparato sperimentale e condizioni operative

Il chip in Niobato di Litio viene installato su una piattaforma meccanica, al di sotto della quale viene posizionata una videocamera monocromatica ad alta velocità e obiettivo $10\times$ utile a visualizzare le gocce nel canale. Oltre al chip, l'apparato sperimentale comprende un laser, un sistema di generazione e regolazione dei flussi monitorato da un PC esterno e un fotodiodo come detector.

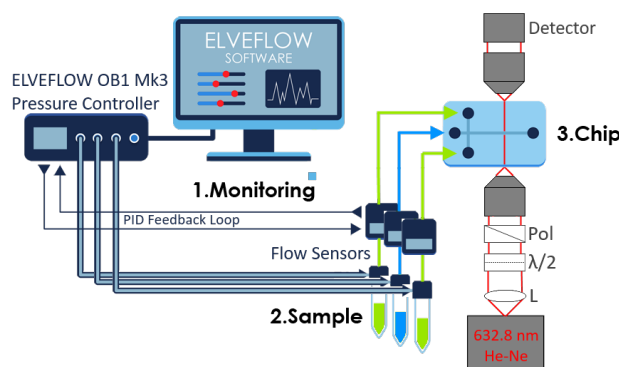


Figura 2.2: Apparato sperimentale

2.2.1 Laser e detector

Come luce in ingresso alla guida ottica del chip si utilizza un raggio laser continuo nelle lunghezze d'onda di 532 nm (verde) e 633 nm (rosso) rispettivamente alla potenza di 7.35 mW e 4.11 mW. Questo viene polarizzato e focalizzato sull'ingresso della guida di luce con un obiettivo 20×, mentre all'uscita dal chip viene focalizzato da un obiettivo 50× su un fotodiodo in silicio. Il segnale così rivelato viene amplificato in transimpedenza e quindi digitalizzato.

Tale configurazione ottica richiede che venga monitorato e ristabilito spesso l'accoppiamento tra il laser e la guida di luce del chip, dato che anche lievi sollecitazioni meccaniche possono destabilizzare il sistema e causare un disaccoppiamento del fascio incidente rispetto al canale ottico.

2.2.2 Regolazione dei flussi

Il riempimento del chip avviene sotto l'azione di una pompa pneumatica Elveflow OBI Mk3 (Elveflow, Parigi, Francia) equipaggiata con tre canali (range di pressione 0 - 8 bar). Il controllo dei flussi microfluidici immessi avviene in feedback mediante tre flussimetri BFS Coriolis10 (Bronkhorst, AK Ruurlo, Olanda), che misurano il flusso passante nei microtubi al loro interno sfruttando l'effetto Coriolis. Per immettere la fase dispersa, contenente eventuali componenti solide che potrebbero danneggiare i flussimetri, si utilizza un dispositivo detto gavitello biconico, realizzato tramite l'assemblaggio di due puntali di micropipetta e collegato al canale d'uscita di un flussimetro e al chip con due cilindretti di silicone. Il gavitello biconico viene riempito con la fase dispersa dall'estremità riservata al collegamento con il chip, mentre dall'altro lato il fluido proveniente dal flussimetro funge da liquido spingente, trasmettendo la pressione della pompa pneumatica alla fase dispersa (immiscibile con esso) e permettendone l'ingresso nel canale microfluidico. Nella fase di riempimento è necessario anche provvedere all'eliminazione di eventuali bolle d'aria formatesi all'interno del dispositivo.

2.2.3 Generazione delle gocce

Chiudendo uno dei due bracci della croce presente nel chip si realizza una giunzione a T, alla quale sono affacciati i due canali di immissione della fase continua e della fase dispersa. Poiché i due fluidi sono immiscibili, il contatto alle interfacce e la pressione data a monte dalla pompa sulla fase continua daranno come risultato la formazione delle gocce. La forma, la dimensione e la velocità delle gocce e, più in generale, il regime di coesistenza dei due fluidi dipendono dalle proprietà fisiche di questi (viscosità, densità, tensione superficiale) e dall'effetto combinato delle forze di pressione e di quelle che intervengono alle interfacce tra le due fasi [11].

Le gocce che sono state realizzate nei canali microfluidici possono essere costituite da acqua con grado di purezza MilliQ, oppure dalle soluzioni di microplastiche già analizzate con la tecnica di imaging iperspettrale. In aggiunta, si è fatto uso anche di una soluzione mista in cui sono state mescolate pari quantità di microplastiche PS e PMMA con diametro 2500 nm e concentrazione rispettiva 0.65 mg/g e 0.66 mg/g.

Per la fase continua sono state utilizzate due possibili sostanze con l'aggiunta di surfattanti: Esadecano con SPAN 80 alla concentrazione del 3% W/W e Novec 7500 con Krytox Peg alla concentrazione del 2% W/V.

Si elencano le soluzioni di microplastiche analizzate, con le principali caratteristiche

Tipo di plastica	Massa [mg]	Diametro [nm]	Concentrazione plastica/acqua [mg/g]
PS	1.3	617	0.64 ± 0.05
	16.7	617	4.47 ± 0.03
	7.1	1050	0.66 ± 0.01
	6.9	2500	0.65 ± 0.01
PMMA	7.6	2500	0.66 ± 0.02

Tabella 2.1: Soluzioni di microplastiche utilizzate - masse note con deviazione standard di 0.1 mg

Sono state utilizzate le seguenti combinazioni di flussi della fase continua e della fase dispersa, indicati rispettivamente con Q_c e Q_d

Fase continua	Q_c [$\mu L/min$]	Q_d [$\mu L/min$]	Q_d/Q_c
Esadecano + SPAN 80 3%	8	20	2.5
	8	16	2
	8	8	1
	10	8	0.8
Novec + Krytox Peg 2%	16	8	0.5
	10	8	0.8

Tabella 2.2: Combinazioni di flussi di fase continua e dispersa

Si riportano di seguito alcuni esempi di gocce osservate nel canale microfluidico, sia in esadecano che in novec, mettendo in evidenza anche l'interazione con la luce proveniente dalla guida di luce affacciata al canale microfluidico.

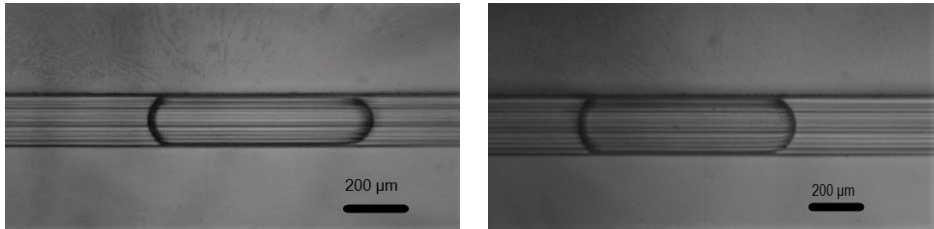
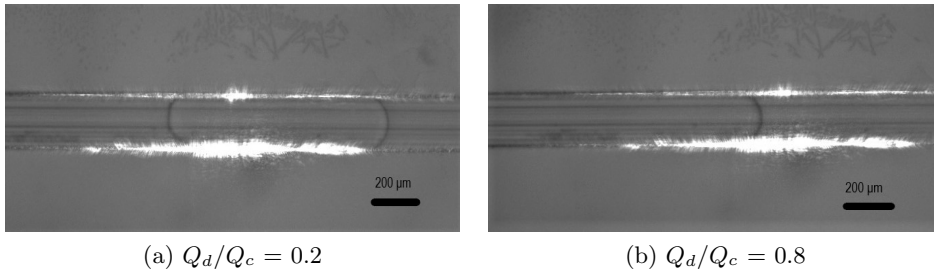


Figura 2.3: Gocce in esadecano ($Q_d/Q_c = 0.8$): Acqua MilliQ e PS 617 nm, $C = 0.64$ mg/g



(a) $Q_d/Q_c = 0.2$

(b) $Q_d/Q_c = 0.8$

Figura 2.4: Gocce d'acqua MilliQ in novec

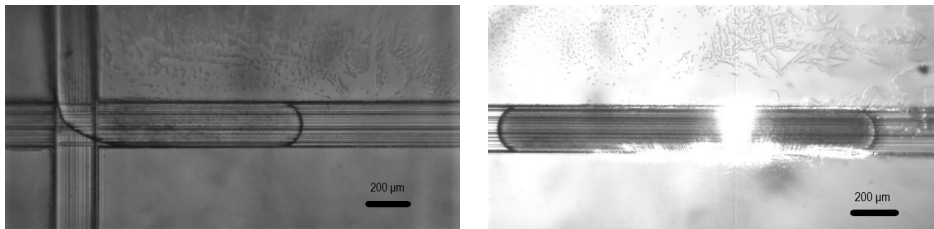


Figura 2.5: Gocce in novec ($Q_d/Q_c = 0.8$): PS 2500 nm, $C = 0.64$ mg/g e PS 617 nm, $C = 4.47$ mg/g

Le gocce prodotte in novec, a parità di flussi, risultano notevolmente più lunghe di quelle in esadecano, al punto che le dimensioni delle gocce sono visivamente confrontabili solo modificando il flusso della fase dispersa in novec da $8 \mu L/min$ a $2 \mu L/min$ (Figura 2.4a). La lunghezza delle gocce prodotte e la forma dei menischi è legata infatti alla velocità delle gocce ed è proporzionale al rapporto Q_d/Q_c [12]; ciò si spiega con l'effetto combinato delle forze agenti tra i due fluidi, in relazione alla diversa viscosità e tensione superficiale.

2.3 Analisi dati

Si riportano alcuni esempi di segnale in corrispondenza dell'interazione del laser con una serie di gocce d'acqua Milliq e di soluzione di microplastiche, dapprima in esadecano e poi in novec. Si mostra anche un esempio rappresentativo di andamento della lunghezza temporale delle gocce nelle due fasi continue: l'analisi successiva si propone di selezionare le parti di acquisizione più stabili riferendosi anche a questo parametro.

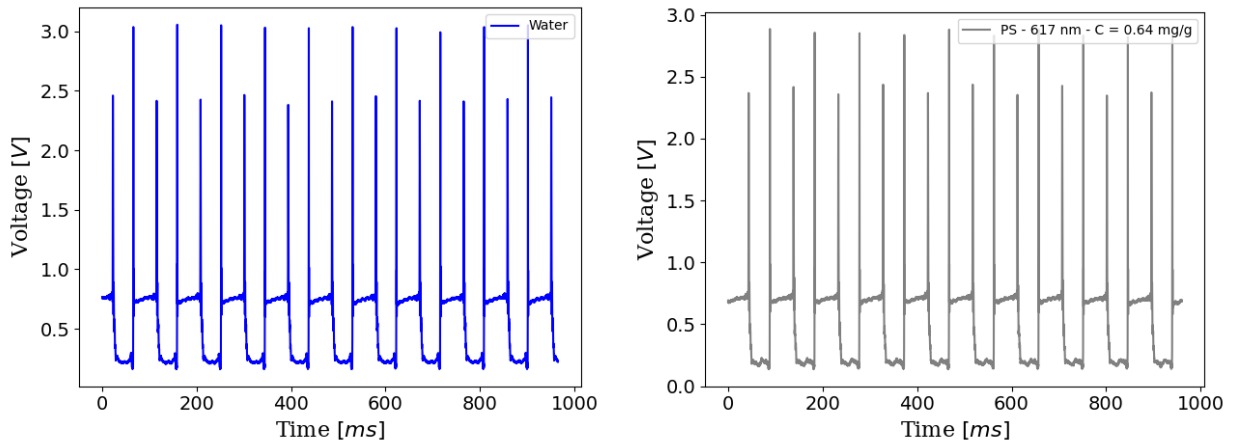


Figura 2.6: Segnale di generazione delle gocce - esadecano

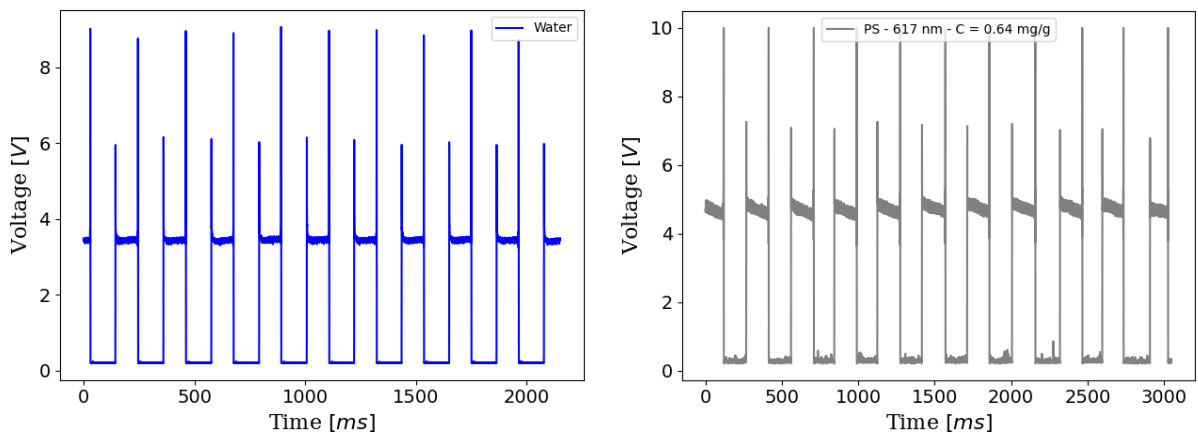


Figura 2.7: Segnale di generazione delle gocce - novec

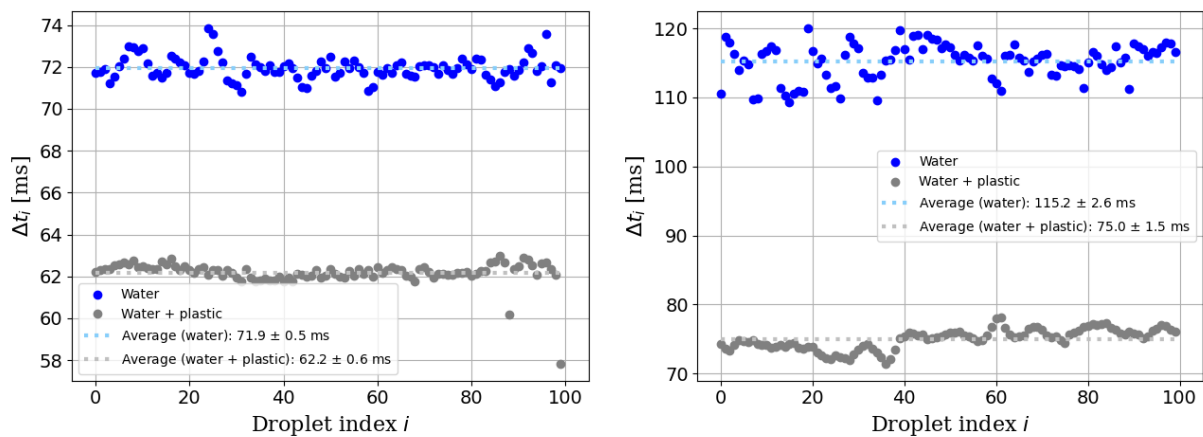


Figura 2.8: Andamento della lunghezza temporale di gocce d'acqua Milliq e PS - esadecano e novec

Tali rappresentazioni grafiche sono una conferma della riproducibilità delle misure e della stabilità dei flussi.

Si può osservare una differenza tra il segnale risultato dalla presenza di microplastiche rispetto al segnale in acqua pura: particolarmente per le gocce in novec, la forma del segnale nella parte centrale è sostanzialmente diversa e induce una maggiore difficoltà di modellizzazione per la presenza di molti picchi, non sempre simili tra loro o distribuiti regolarmente.

Non essendo possibile analizzare l'andamento dei segnali con fit di funzioni note, è stata presa in considerazione una tecnica di analisi adeguata a trattare segnali notevolmente diversi e che sia il più possibile indipendente dall'accoppiamento della guida con il laser, variabile tra un'acquisizione e l'altra. È stata quantificata quindi l'entità dei diversi segnali con l'integrale della curva compresa tra i due massimi di segnale ai confini della goccia i -esima ($i \in [0, N - 1]$, con N numero delle gocce), corrispondenti agli istanti di tempo t_{2i} e t_{2i+1} in cui si verifica l'interazione dei menischi con il laser. L'integrale è normalizzato sul valore medio della fase continua, ΔV_c , e sulla lunghezza temporale di ciascuna goccia Δt_i . La formula con cui si calcola l'integrale normalizzato per la goccia i -esima $I_{N,i}$ risulta quindi

$$I_{N,i} = \frac{1}{\Delta V_c \cdot \Delta t_i} \int_{t_{2i+1}}^{t_{2i}} V(t) dt$$

Poiché l'integrale rappresenta l'area sottesa alla curva nel piano V/ms e questo viene normalizzato al segnale in V della fase continua e alla lunghezza temporale delle gocce in ms, I_N risulta adimensionale. È importante ricordare che il segnale in V è proporzionale all'intensità della luce trasmessa attraverso la goccia quando immersa nella fase continua e per tale ragione l'integrale I_N normalizzato è espressione dell'intensità relativa rivelata. Le figure seguenti evidenziano la regione considerata.

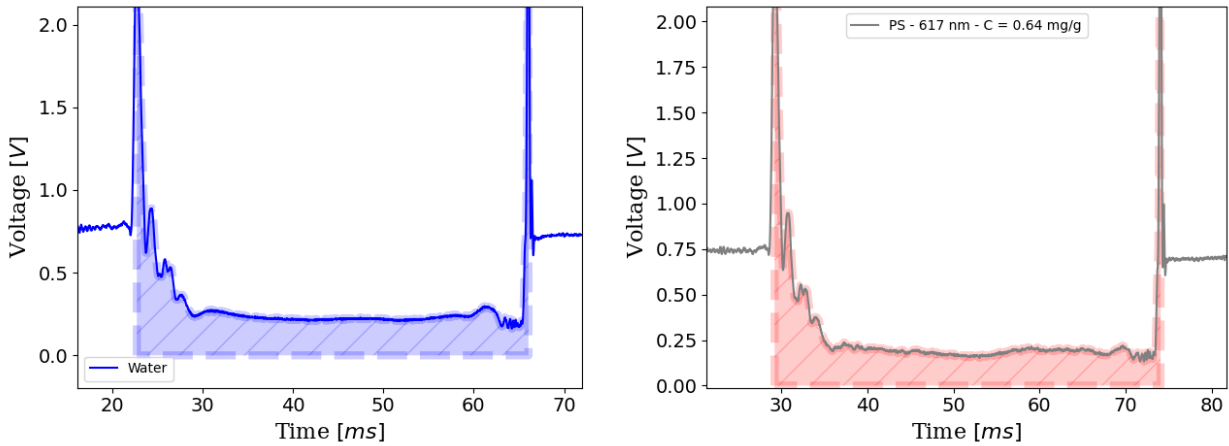


Figura 2.9: Regione di integrale del segnale - esadecano

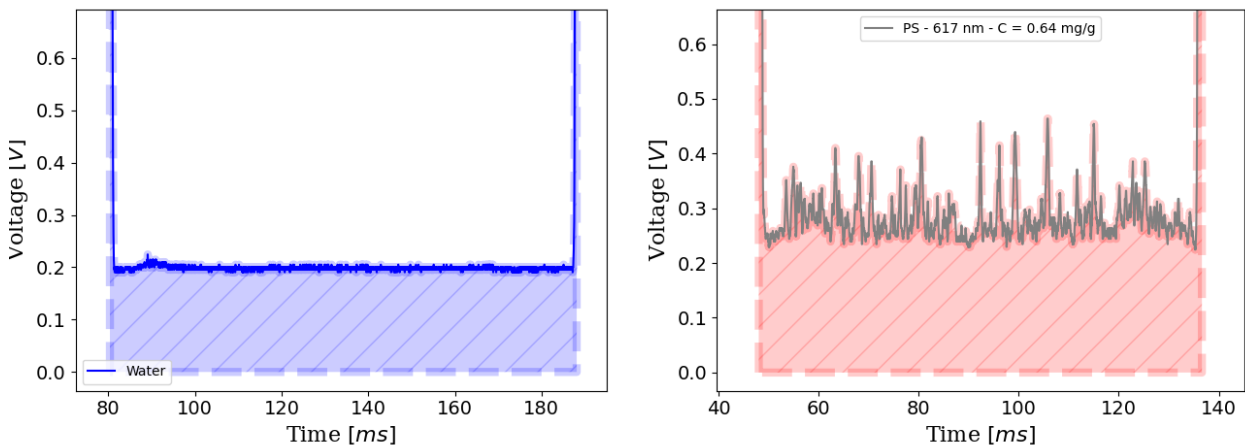


Figura 2.10: Regione di integrale del segnale - novec

Nell'analisi che segue verrà calcolato l'integrale del segnale per ogni goccia e si assumerà una distribuzione gaussiana per l'andamento dell'integrale nel corso di un'acquisizione, calcolando media e deviazione standard.

L'utilizzo dell'integrale come quantificatore per le misure in esadecano permette inoltre di confrontare la presente analisi, relativa ad una guida ottica dritta, con quella svolta in precedenti lavori di tesi [11] in cui la guida ottica utilizzata era in configurazione di interferometro di Mach Zehnder.

2.4 Misure in fase continua di esadecano

Con la fase continua costituita di esadecano si analizzano gocce d'acqua contenenti microsferi di polistirene di diametro 617 nm e concentrazione pari a $C = 0.64$ mg/g: infatti, essendo queste le plastiche più piccole e meno concentrate tra quelle osservate con la tecnica dell'imaging iperspettrale, sono risultate meno evidenti e si prestano ad un'analisi più approfondita. A tale scopo, oltre alla combinazione di flussi $Q_d/Q_c = 0.8$ (analizzata anche in [11] per guida ottica in configurazione MZI), si effettuano misure con diverse combinazioni di flussi di esadecano e acqua, come elencato in Tabella 2.2.

2.4.1 Confronto tra integrali in diverse combinazioni di flussi

Da ciascuna acquisizione è stata selezionata una regione di 100 gocce avente valori di integrale il più possibile stabili. Generalmente si tratta della parte finale dell'acquisizione, dove si suppone sia stata raggiunta maggiore stabilità del segnale ¹.

Si mostra un esempio rappresentativo dell'andamento dell'integrale normalizzato per il segnale relativo a $Q_d/Q_c = 0.5$, posto anche in forma di istogramma con relativo fit gaussiano. La tabella riporta i risultati di media e deviazione standard per tutte le combinazioni di flussi analizzate, avendo indicato con I_N^w e I_N^{w+p} rispettivamente gli integrali dell'acqua e delle gocce con acqua e microplastiche. Si calcola anche la differenza tra i due integrali rapportata all'integrale dell'acqua.

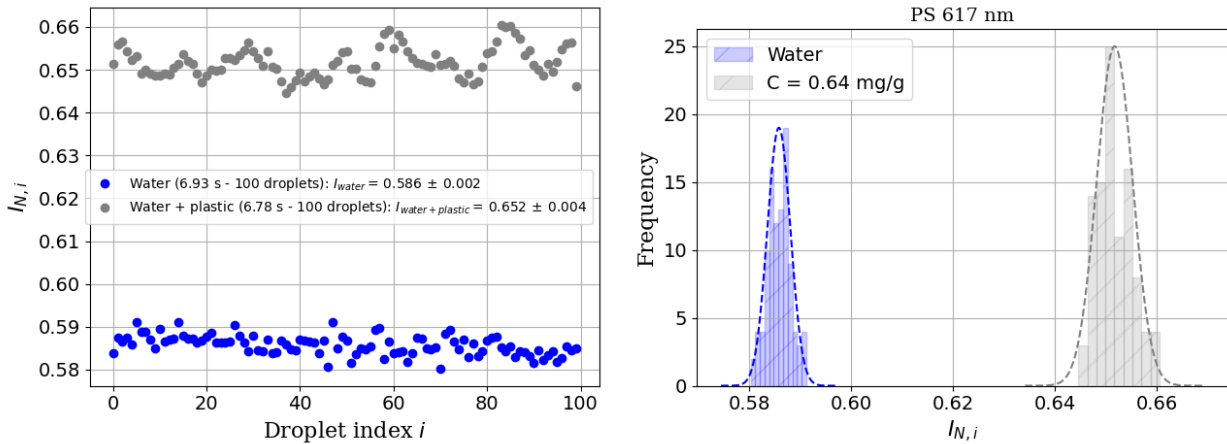


Figura 2.11: Andamento dell'integrale normalizzato in un campione di 100 gocce

Q_d/Q_c	I_N^w	I_N^{w+p}	$ I_N^w - I_N^{w+p} / I_N^w$
2.5	0.504 ± 0.003	0.692 ± 0.004	0.37
2	0.492 ± 0.004	0.663 ± 0.003	0.35
1	0.458 ± 0.003	0.559 ± 0.004	0.22
0.8	0.409 ± 0.002	0.367 ± 0.003	0.10
0.5	0.586 ± 0.002	0.652 ± 0.004	0.11

Tabella 2.3: Risultati degli integrali normalizzati in esadecano

¹Si precisa che, talvolta, la presenza di gocce d'aria nei canali microfluidici ha reso necessaria l'esclusione di una regione intermedia più o meno estesa di segnale, prolungata fino a quando non fossero più evidenti perturbazioni nella lunghezza temporale delle gocce o nel valore dell'integrale lasciate dal passaggio dell'aria.

Si osserva una netta separazione tra l'integrale calcolato per il segnale delle gocce d'acqua e il segnale delle gocce con microplastiche, dell'ordine del 30%. Si vede anche che la separazione aumenta al crescere del rapporto Q_d/Q_c , perciò ci si attendono istogrammi ancor più distanti per gli altri campioni: questo prova l'efficacia della configurazione sperimentale ottica e microfluidica scelta per la rivelazione delle microsfele, con risoluzione più elevata rispetto all'analisi tramite imaging iperspettrale. Si può inoltre considerare appropriato l'utilizzo dell'integrale come indicatore quantitativo.

Per tutte le combinazioni di flussi utilizzate, eccetto per $Q_d/Q_c = 0.8$, si osserva $I_N^{w+p} > I_N^w$. In relazione a come è stato definito l'integrale, si può affermare che la diversità tra i due integrali derivi dalla differente lunghezza temporale delle gocce di pura acqua e di quelle contenenti microplastiche. Queste ultime, come mostra la Figura 2.8, hanno infatti una lunghezza temporale mediamente minore rispetto alle gocce d'acqua, dato che sfere di queste dimensioni possono agire come tensioattivi (emulsioni di Pickering) quando disperse in gocce, riducendone la tensione superficiale e portando alla generazione di gocce di lunghezza inferiore. Uno studio dettagliato di questo aspetto, che potrebbe spiegare il comportamento anomalo nel caso di $Q_d/Q_c = 0.8$, va oltre gli scopi del presente lavoro di tesi e perciò non sarà qui ulteriormente approfondito [11].

2.4.2 Confronto tra segnali relativi a laser in diverse lunghezze d'onda

Relativamente ai flussi $Q_d/Q_c = 0.8$ è stata effettuata un'ulteriore acquisizione con laser di lunghezza d'onda pari a 633 nm, per individuare una possibile dipendenza del segnale dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente. Si confrontano di seguito gli integrali del segnale per le misure con nanosfere PS 617 nm alla concentrazione 0.64 mg/g sia in laser verde che rosso, mostrando l'andamento degli integrali e i rispettivi istogrammi.

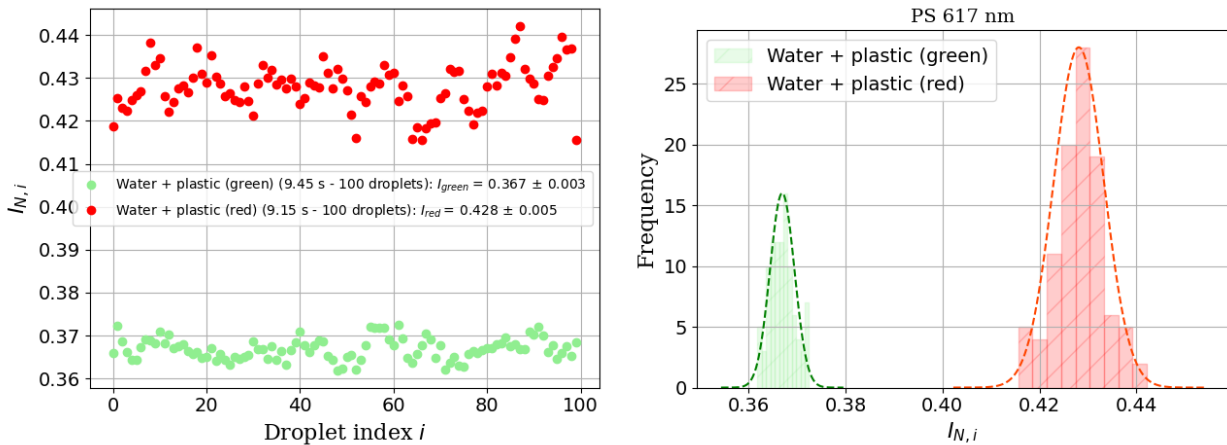


Figura 2.12: Confronto tra integrali ottenuti per laser in diverse lunghezze d'onda

Si può ipotizzare che il segnale raggiunga un'intensità maggiore (di circa il 15%) perché lo scattering con nanoparticelle in tale lunghezza d'onda comporta una più consistente emissione in avanti della radiazione rispetto a quanto avviene nel verde [13]. Lo studio della dipendenza dell'integrale dalla lunghezza d'onda incidente potrebbe essere utile ad un miglioramento nell'efficienza della rivelazione, ma non essendo obiettivo del presente lavoro di tesi non verrà ulteriormente approfondito.

2.5 Misure in fase continua di novec

2.5.1 Soluzione con nanosfere PS - 617 nm

Sono state eseguite le medesime misure per le plastiche PS di diametro 617 nm e concentrazione $C = 0.64$ mg/g anche in fase continua di novec, nella sola combinazione di flussi $Q_d/Q_c = 0.8$: il fine è mettere in evidenza possibili diversità nell'andamento del segnale e nell'efficacia della rivelazione, mantenendo una scelta di flussi dimostratasi in passato adeguata alla buona condotta delle misure.

In Figura 2.7 è stato riportato un esempio di segnale acquisito durante il passaggio di gocce d'acqua MilliQ e della soluzione di nanosfere considerata. Si osservano delle importanti differenze rispetto a quanto visto in fase continua di esadecano per la stessa combinazione di flussi:

- le gocce d'acqua hanno una lunghezza temporale maggiore di un fattore $\simeq 1.5$ e appaiono nettamente più stabili;
- le gocce con microplastiche presentano, nella parte centrale del segnale, un gran numero di picchi;
- il rapporto tra l'intensità del segnale in fase dispersa e continua è $\simeq 0.1$, mentre in esadecano vale $\simeq 0.3$, dunque la separazione tra i due, in novec, è aumentata di circa tre volte;
- il valore massimo in V del segnale raggiunto in corrispondenza dell'interazione con i menischi delle gocce è circa 10 V, tale da portare in saturazione il fotodiode, mentre in esadecano si raggiungevano 3 V;
- l'interazione con il primo menisco genera un picco più elevato in V rispetto al secondo menisco (si osserva l'opposto in esadecano).

La diversa lunghezza temporale delle gocce, le caratteristiche del segnale in fase continua e l'aspetto dei menischi possono dipendere dalla viscosità dell'olio, come già osservato con le immagini delle gocce nel canale microfluidico, ma anche da possibili differenze nelle condizioni di accoppiamento tra il laser e la guida ottica raggiunte nelle due sessioni di misure. Riguardo ai picchi che emergono in corrispondenza delle gocce con microplastiche (non attesi dato che la configurazione di guida ottica non è MZI) si pensa primariamente al cambio di indice di rifrazione avvenuto rispetto all'esadecano. A fronte di un indice di rifrazione dell'acqua pari a 1.33, quello dell'esadecano è superiore e pari a 1.43, mentre quello del novec è leggermente inferiore e pari circa a 1.29 [14]. La presenza di una fase dispersa con indice di rifrazione inferiore alla fase continua potrebbe, sotto particolari condizioni geometriche, portare al fenomeno della riflessione totale interna della luce laser nella goccia. Ciò suggerisce che la presenza di numerosi picchi, del tutto assenti per la medesima configurazione ottica in esadecano, possa essere dovuta ad un effetto combinato di riflessione della luce e di interazione con le microplastiche.

Si riportano i risultati degli integrali normalizzati per le due fasi continue a confronto, a cui seguono l'andamento dell'integrale e il relativo istogramma.

Gocce	Esadecano	Novec
Acqua	0.409 ± 0.002	0.072 ± 0.002
Acqua + Plastica	0.367 ± 0.003	0.077 ± 0.002

Tabella 2.4: Risultati degli integrali normalizzati per $Q_d/Q_c = 0.8$ in esadecano e novec

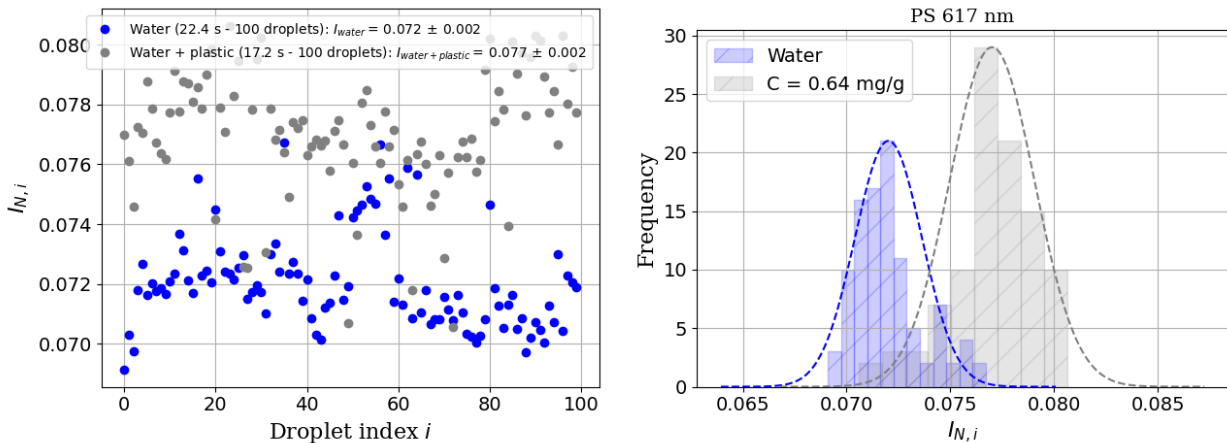


Figura 2.13: Andamento dell'integrale normalizzato in un campione di 100 gocce

Il valore dell'integrale si è ridotto di circa l'80% per le gocce in novec, sia per l'acqua che per le soluzioni con microplastiche. Le distribuzioni rimangono comunque sufficientemente separate, nonostante un peggioramento della distinguibilità tra acqua e plastiche rispetto all'analisi precedente.

2.5.2 Soluzioni con nanosfere PS e PMMA al variare di diametro e concentrazione

Dato il particolare comportamento del segnale in corrispondenza delle gocce con microplastiche, sono state condotte ulteriori analisi con alcune soluzioni di nanosfere PS aventi diametro e concentrazione diversi e in seguito anche con soluzioni di microplastiche di tipo PMMA (come descritto in precedenza nella Tabella 2.1). Alcune caratteristiche dei picchi emersi al centro delle gocce potrebbero infatti permettere una differenziazione tra segnali relativi a plastiche di tipo diverso, oppure a plastiche della stessa tipologia ma con varia dimensione e concentrazione. La verifica di questa ipotesi è particolarmente utile perché si potrebbe così estendere, oltre la semplice distinguibilità dalle gocce di acqua pura, il margine di rilevabilità di microplastiche a disposizione dell'apparato. Considerazioni a favore di questo tipo di analisi vengono sviluppate dal paragrafo successivo.

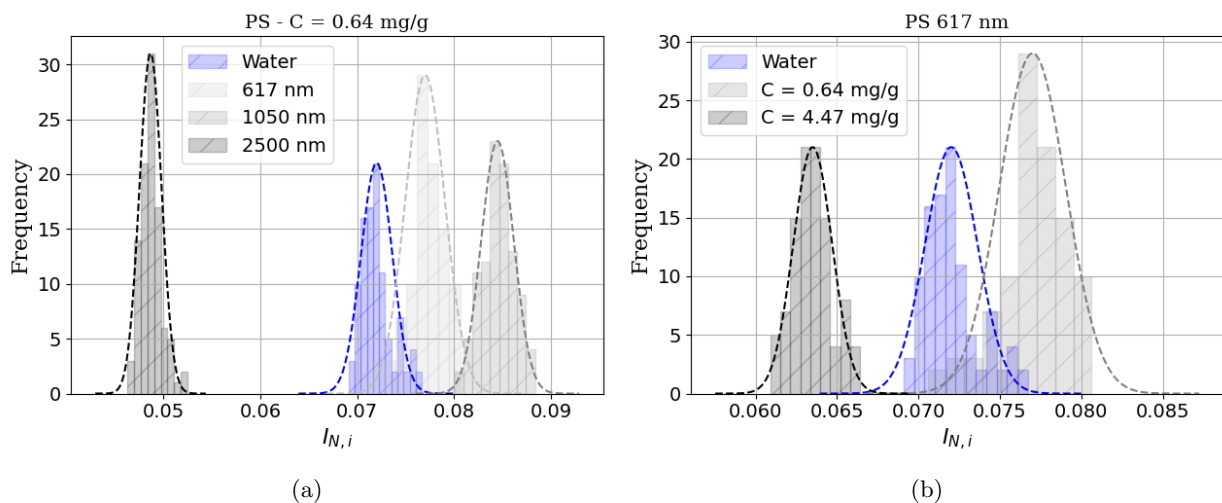
Si mostrano i risultati ottenuti per gli integrali normalizzati, insieme a quello già riportato per la soluzione analizzata nel paragrafo precedente; si è mantenuta la stessa acquisizione di gocce d'acqua MilliQ nel confronto con le diverse plastiche ($I_N^w = 0.072 \pm 0.002$). Anche per questi risultati si calcola la differenza tra l'integrale delle gocce d'acqua e delle gocce con acqua e microplastiche, rapportandolo all'integrale dell'acqua.

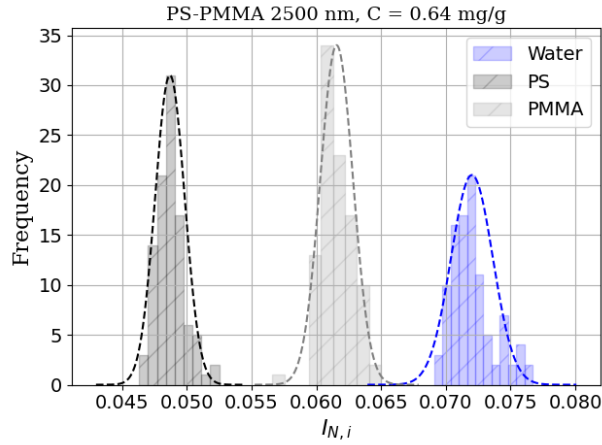
Plastica	Diametro [nm]	Concentrazione [mg/g]	I_N^{w+p}	$ I_N^w - I_N^{w+p} / I_N^w$
PS	617	0.64	0.077 ± 0.002	0.07
	617	4.47	0.064 ± 0.001	0.11
	1050	0.66	0.084 ± 0.001	0.17
	2500	0.65	0.049 ± 0.001	0.32
PMMA	2500	0.66	0.062 ± 0.001	0.14

Tabella 2.5: Risultati degli integrali normalizzati in novec

2.5.3 Confronti tra integrali significativi

I seguenti istogrammi mettono in evidenza un confronto tra gli integrali del segnale delle seguenti microplastiche: PS con diametri di 617 nm, 1050 nm, 2500 nm; PS con diametro di 617 nm nelle concentrazioni di 0.64 mg/g e 4.47 mg/g; PS e PMMA aventi diametro 2500 nm e concentrazione 0.64 mg/g.





(c)

Figura 2.14: Confronti tra integrali

In Figura 2.14a si vede che, rispetto all'integrale dell'acqua, le plastiche con diametro 2500 nm hanno integrale più basso di circa il 30%, mentre l'integrale delle sfere di diametro 617 nm e 1050 nm è più alto rispettivamente del 7% e del 17%. Per questi due campioni l'integrale mostra inoltre un andamento crescente con il diametro. Si ipotizza che la diversità nel comportamento delle prime sia dovuta all'aumento del diametro delle nanosfere e al cambio di rapporto con la lunghezza d'onda della radiazione incidente rispetto alle altre: infatti $2500/532 \simeq 5$, mentre gli altri rapporti sono inferiori a 2. Ciò è indice di un possibile spostamento verso il regime macroscopico, che mette in evidenza un diverso comportamento delle plastiche con diametro maggiore.

La Figura 2.14b mostra che la soluzione con concentrazione più elevata ha un integrale inferiore di circa il 17% rispetto a quello della soluzione meno concentrata: è un comportamento coerente con quanto atteso, perché alla maggiore interazione del laser con le microplastiche nella soluzione più concentrata consegue un segnale in uscita dalla goccia più debole.

Nel confronto tra plastiche di tipo diverso in Figura 2.14c, si osserva un integrale maggiore per le PMMA rispetto alle PS di circa il 20%, consistente con il fatto che le prime sono plastiche semitrasparenti che permettono un maggiore passaggio della luce laser attraverso la goccia.

È stata verificata la distinguibilità delle combinazioni di plastiche presentate anche tramite un Test di Fisher, potendo affermare che i campioni considerati appartengono a distribuzioni statistiche distinte.

Si può concludere che soluzioni di microplastiche di diverse dimensioni, disperse in gocce d'acqua in fase continua di novoc, sono ben distinguibili tra di loro e dall'acqua con il metodo di analisi utilizzato. Esiste però un limite di diametro al di sopra del quale il comportamento del segnale non è più coerente con i campioni di microplastiche più piccole, dettato probabilmente dal passaggio ad un regime macroscopico nel confronto con la lunghezza d'onda del laser: per la presente analisi, tale limite è $1050/532 \simeq 2$. Si è osservato inoltre che in tale fase continua anche soluzioni di microplastiche con concentrazioni molto diverse sono ben distinguibili tra di loro. Lo stesso vale per plastiche di stessa dimensione e concentrazione, ma di tipo diverso, in relazione alla differente interazione con la luce laser incidente.

2.5.4 Analisi di distinguibilità in funzione della larghezza dei picchi

Data la particolarità del segnale nell'interazione del laser con le microplastiche, è stata approfondita l'analisi dei picchi al fine di individuare nella loro forma dei possibili parametri di differenziazione tra le soluzioni utilizzate: in particolare si confrontano le larghezze temporali medie dei picchi, dato che da una prima osservazione qualitativa queste sembrano rappresentare la differenza più evidente tra i picchi delle plastiche PS e PMMA.

Confronto visivo tra singole gocce Si riportano degli ingrandimenti sui picchi di ogni soluzione di microplastiche analizzata, mantenendo circa costante l'ampiezza dell'intervallo selezionato in ms e in V per facilitare il confronto visivo sulla forma dei picchi e sulla lunghezza temporale delle gocce.

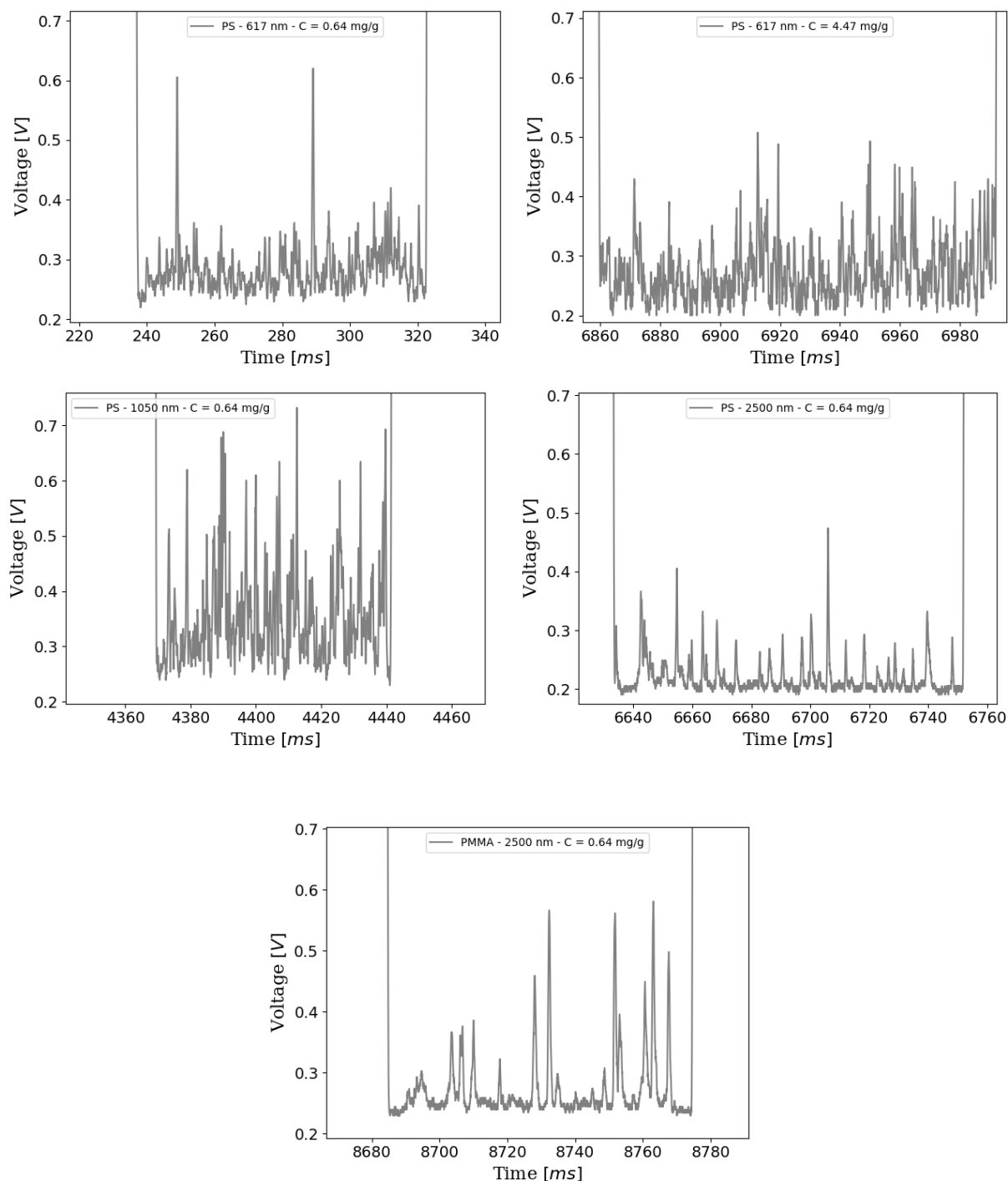


Figura 2.15: Segnale di singole gocce

Si osserva che i picchi delle plastiche di tipo PS sono più stretti e frequenti rispetto a quelli delle plastiche PMMA. Si nota anche una somiglianza tra PMMA e PS con diametro 2500 nm: è possibile che l'aumento della dimensione delle sfere manifesti anche in questo caso una deviazione dal comportamento degli altri campioni indipendentemente dal tipo di plastica, ma è ugualmente visibile, come detto in precedenza, che alcuni picchi delle plastiche PMMA appaiono più larghi alla base. Si vede anche che, mediamente, il segnale delle PS con diametro 1050 nm e delle PMMA produce picchi più alti. Nel primo caso, confrontando con le PS di diametro 617 nm e tralasciando, per quanto detto,

quelle di taglia 2500 nm, si può affermare che l'altezza dei picchi possa aumentare con la dimensione delle sfere. Nel secondo caso, le PMMA si distinguono con ottima probabilità per la natura semitrasparente del materiale. Una ulteriore considerazione si può fare sulla lunghezza temporale delle gocce: ci si aspetterebbe di trovare durate temporali minori per gocce più concentrate a parità di flussi (e quindi di velocità delle gocce) poiché, come già detto, la presenza di sfere plastiche potrebbe ridurre la tensione superficiale delle gocce e diminuirne la lunghezza rispetto a soluzioni con concentrazioni minori di sfere. Si vede tuttavia dalle PS di concentrazione maggiore che questo non è verificato ed è perciò necessario condurre ulteriori analisi che vanno oltre lo scopo del presente lavoro di tesi.

Calcolo della larghezza dei picchi È stato analizzato il segnale implementando il codice Python con una funzione che misuri la larghezza dei picchi a metà altezza, alla quale viene fornito il minimo valore in Volt al di sotto del quale non considerare i picchi (più probabilmente causati da rumore dell'elettronica) e vengono indicati gli estremi di minima e massima larghezza di un picco selezionabile, per escludere eccessive deviazioni dall'andamento complessivo visibile nella goccia. A causa però della forte irregolarità dei picchi in una stessa goccia e alla presenza di strutture complesse, come la formazione di molti picchi separati a partire da un'unica base, tale analisi si configura solo come uno studio di prima approssimazione, finalizzato ad evidenziare andamenti particolari che possano direzionare una successiva analisi più accurata.

A titolo esemplificativo si mostrano due esempi di gocce in cui sono stati individuati dal programma i picchi di interesse, a cui segue una tabella con i parametri di media \bar{w} e deviazione standard $\sigma_{\bar{w}}$ relativi alla distribuzione di larghezze dei picchi individuati nel segnale di 10 gocce consecutive. A conferma della precisione ancora scarsa del metodo, si vede che per tutti i campioni la deviazione standard è elevata.

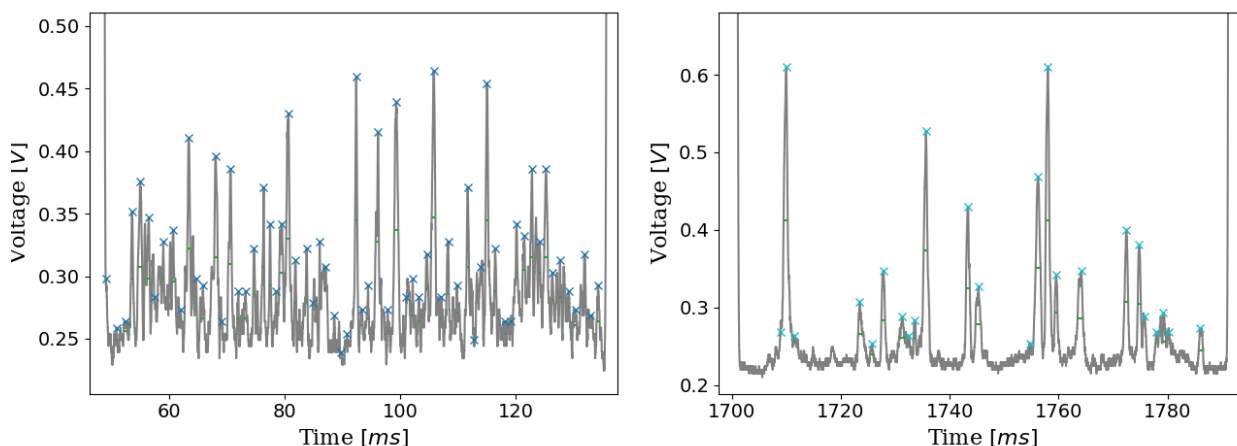


Figura 2.16: PS 617 nm ($C = 0.64$ mg/g) - PMMA 2500 nm ($C = 0.65$ mg/g)

Plastica	Diametro [nm]	Concentrazione [mg/g]	\bar{w} [ms]	$\sigma_{\bar{w}}$ [ms]
PS	617	0.64	0.42	0.19
	617	4.47	0.45	0.22
	1050	0.66	0.39	0.17
	2500	0.65	0.55	0.17
PMMA	2500	0.66	0.62	0.21

Tabella 2.6: Media e deviazione standard per larghezze temporali dei picchi di diverse soluzioni

Confronto tra distribuzioni a parità di plastica o di taglia Si sovrappongono le distribuzioni delle larghezze dei picchi ottenute per le PS 617 nm al variare della concentrazione e per le sfere di taglia 2500 nm variando il tipo di plastica. Si mostra a sinistra un ingrandimento, per rendere più visibile il carattere della distribuzione, e a destra il grafico completo per il numero di gocce analizzate.

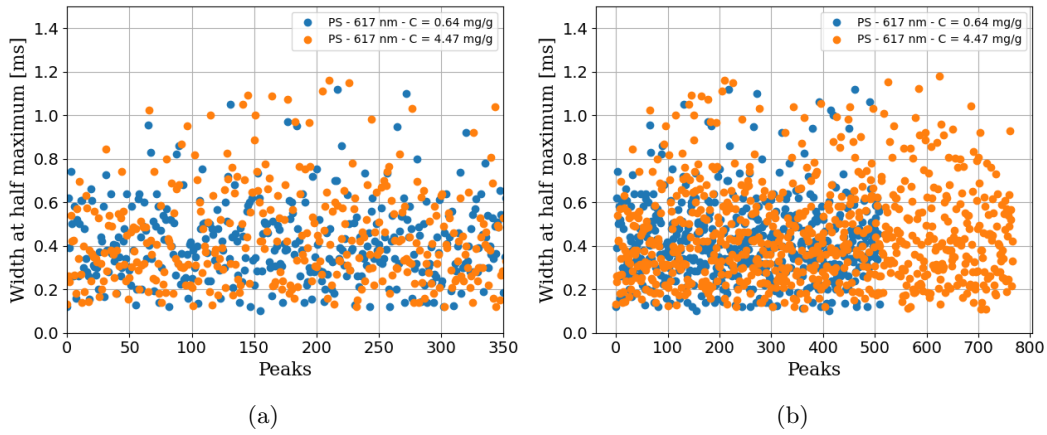


Figura 2.17: PS 617 nm, confronto tra $C = 0.64$ mg/g e $C = 4.47$ mg/g

Le due distribuzioni dei picchi non sono graficamente distinguibili, ma si nota dalla Figura 2.17b che le plastiche di soluzione più concentrata producono un numero di picchi superiore (767 picchi rispetto a 510, un fattore $\simeq 1.5$) a parità di gocce analizzate: si può ipotizzare che uno specifico tipo di nanosfere interagisca con il laser generando picchi di segnale caratteristici, la cui larghezza non dipende dalla concentrazione, mentre è naturale dedurre che un maggior numero di centri di interazione produca picchi più frequenti di segnale.

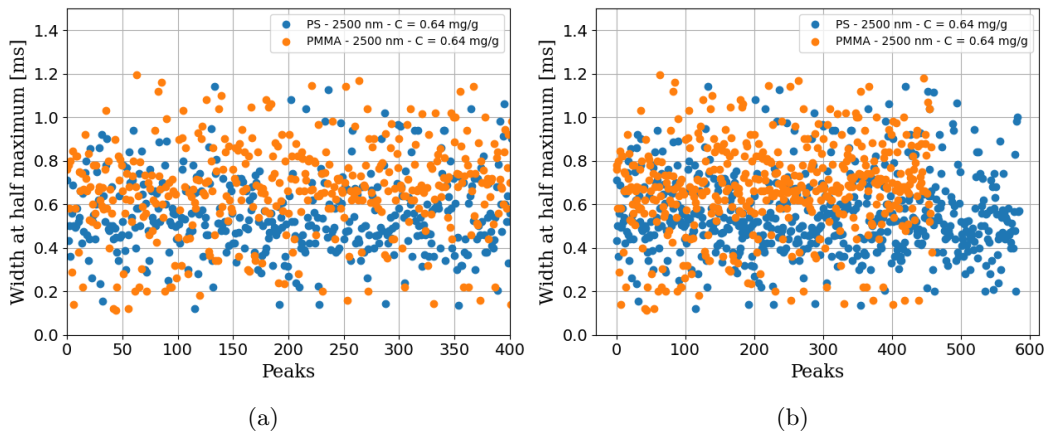


Figura 2.18: 2500 nm, confronto tra PS ($C = 0.64$ mg/g) e PMMA ($C = 0.66$ mg/g)

I grafici per le nanosfere di diametro 2500 nm, diversamente dai precedenti, risultano dall'analisi del segnale di 25 gocce, dal momento che 10 gocce erano insufficienti a visualizzare una possibile diversità di andamento tra le due distribuzioni. Da questa osservazione si ricava che il numero di picchi che soddisfano ai parametri fissati è nettamente più basso rispetto alle sfere di taglia inferiore, dato che a parità di concentrazione il numero di sfere diminuisce se ne viene aumentata la dimensione.

Osservando nello specifico il comportamento delle plastiche PMMA, risulta confermato che queste reagiscono all'interazione con il laser con picchi più larghi delle plastiche PS, tanto che è visibile una certa separazione tra le due distribuzioni.

Come si osserva in Figura 2.18b, anche per questi campioni, a pari numero di gocce analizzate, c'è una differenza nel numero di picchi risultanti nel segnale (585 per le PS e 459 per le PMMA, per un rapporto $\simeq 1.3$). In questo caso non dipende dalla concentrazione o dalla taglia, ma dalla natura semitrasparente delle PMMA e opaca delle PS: si può ipotizzare che il materiale trasparente alle lunghezze d'onda incidenti, in combinazione con la possibile riflessione totale interna dell'onda nelle gocce, dia un segnale più intenso, ma che si formi a seguito di fenomeni più rari. Non è tuttavia possibile dare una spiegazione sufficiente con i risultati ottenuti da questa analisi.

Distribuzione dei picchi nelle gocce di soluzione PS + PMMA Al fine di approfondire il confronto tra le larghezze dei picchi generati da plastiche PS e PMMA, è stata analizzata una soluzione in cui sono stati mescolati i due tipi di sfere, entrambi aventi diametro 2500 nm e concentrazione $\simeq 0.65$ mg/g. Si vuole cioè verificare se è possibile individuare due distinte popolazioni di picchi nel segnale fornito da una stessa goccia, dato che un tale comportamento potrebbe essere un valido elemento di riconoscimento di plastiche diverse in campioni di composizione non definita.

Le figure seguenti mostrano il segnale dato dalle gocce contenenti microplastiche e la distribuzione delle larghezze dei picchi.

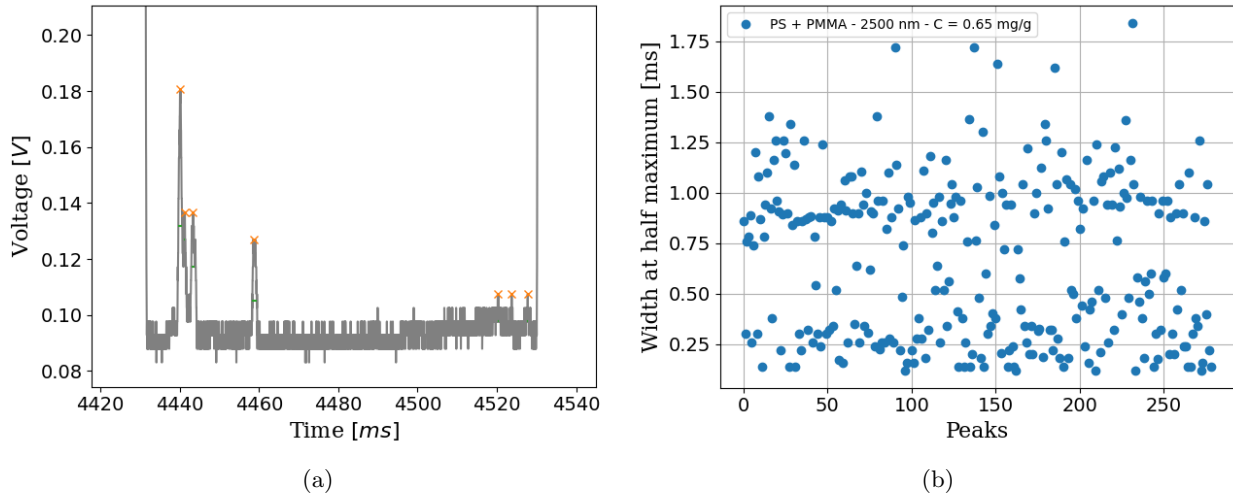


Figura 2.19: Segnale di singola goccia e distribuzione delle larghezze dei picchi per la soluzione PS + PMMA

Dalla distribuzione delle larghezze dei picchi in Figura 2.19b è possibile vedere una certa separazione dei punti in due zone, verifica del fatto che i due tipi di plastiche forniscono un segnale caratteristico anche quando si trovano nella stessa goccia. Il fatto che i picchi si addensino attorno a valori di larghezza non compatibili con quelli ottenuti nell'analisi delle soluzioni distinte, riportati in Tabella 2.6, può essere attribuito a possibili diversità nelle condizioni di accoppiamento tra laser e guida di luce, dato che tale soluzione è stata analizzata in una sessione di misure successiva. È positivo però il fatto che questo non abbia compromesso la distinguibilità dei picchi.

Questo problema sarà facilmente risolto quando l'accoppiamento della luce sarà effettuato con Pig-tailing [15], ovvero incollando una fibra connessa al laser alla guida di luce di ingresso. Tale configurazione è implementata anche a livello commerciale nei dispositivi ottici ed elettro-ottici di impiego nelle telecomunicazioni. Non è stata qui impiegata perché il Pig-tailing di fatto fissa la lunghezza d'onda del laser accoppiato, mentre il presente studio mira a lasciare all'operatore la facoltà di modificare la lunghezza d'onda del laser per individuarne il più performante, trattandosi di uno studio di fattibilità.

Volendo rendere più evidente la distinzione tra le due distribuzioni si potrebbe analizzare una soluzione contenente sfere di diametro 617 nm o 1050 nm, poiché a parità di concentrazione il minore diametro comporta un aumento del numero di sfere e ci si attenderebbero perciò picchi più numerosi e una separazione più marcata.

Si conclude che la larghezza a metà altezza dei picchi può rappresentare un parametro utile a distinguere plastiche opache e trasparenti, ma anche plastiche dello stesso tipo e di dimensioni diverse o contenute in soluzioni di varia concentrazione. Tuttavia, per poter riconoscere diverse plastiche solo dalla forma dei picchi sarebbe più efficace affiancarvi altri parametri, come l'altezza o l'area sottesa, affinando inoltre il procedimento di scelta dei picchi significativi.

2.6 Effetto delle condizioni di accoppiamento tra laser e guida di luce sul risultato dell'integrale

Sono state analizzate alcune misure svolte in una sessione successiva relativamente alla soluzione di microplastiche PS con diametro 2500 nm e concentrazione $C = 0.65$ mg/g. Le condizioni di accoppiamento tra luce laser e guida ottica, però, non sono risultate le stesse, dato che l'intensità del segnale in Volt in fase continua e in corrispondenza delle gocce ha fornito valori diversi per le due acquisizioni. Si mostrano i segnali confrontati nelle figure seguenti, dove il primo grafico è relativo allo stesso campione di cui si sono analizzati i risultati nei precedenti paragrafi

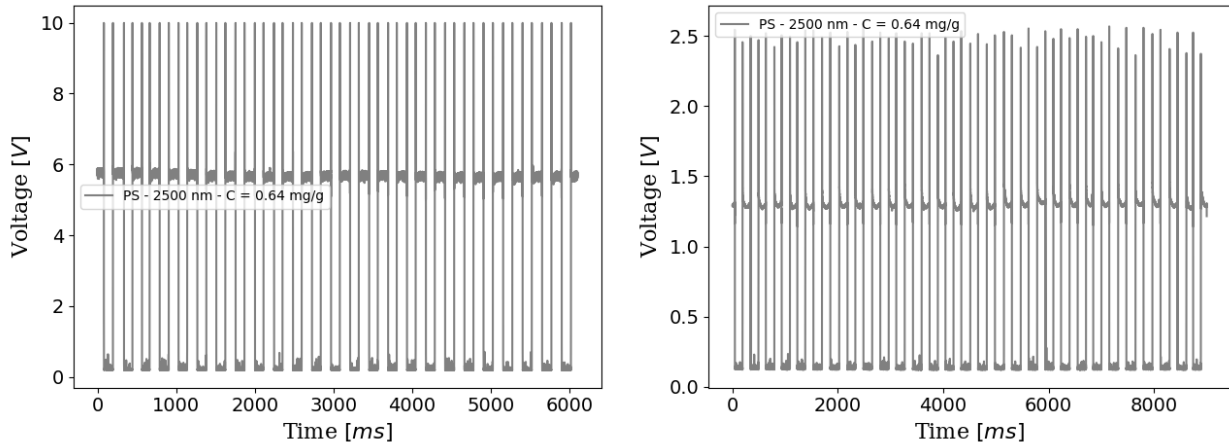


Figura 2.20: Confronto tra segnali ottenuti in diverse condizioni di accoppiamento

Per la prima acquisizione è stato raggiunto un accoppiamento certamente migliore, poiché è stata massimizzata l'intensità del segnale rivelato dal fotodiode. La seconda acquisizione presenta un segnale in fase continua inferiore di oltre il 70% rispetto alla prima, mentre il minimo del segnale misurato in corrispondenza delle gocce si è abbassato del 35% (dato che misura rispettivamente 0.20 V e 0.13 V per la prima e la seconda acquisizione).

Calcolando l'integrale per i due casi (indicizzati con i pedici 1,2) e ricordando che questo viene normalizzato al valore medio della fase continua, si ottengono risultati non compatibili, nonostante derivino dall'analisi della stessa soluzione di microplastiche. Infatti i risultati sono i seguenti e differiscono per più di un fattore 2

$$I_{N,1} = 0.049 \pm 0.001$$

$$I_{N,2} = 0.109 \pm 0.002$$

Si può ipotizzare che una tale discrepanza tra i risultati degli integrali sia dovuto al fatto che il livello di segnale in fase continua sia calato circa del doppio rispetto alla fase dispersa: per la seconda acquisizione, cioè, il valore medio del segnale in nove a denominatore dell'integrale è relativamente dimezzato e dà quindi un risultato circa doppio per l'integrale.

Da tali osservazioni si conclude che un non ottimale accoppiamento tra il laser e la guida di luce incide in modo non trascurabile sul risultato dell'integrale. Si ricava però anche che confrontando le variazioni relative del segnale tra fase dispersa e continua in condizioni di accoppiamento diverse è possibile risalire ad un valore compatibile per l'integrale nei due casi, come ci si attenderebbe dall'analisi dello stesso campione. Dato che nel caso analizzato le condizioni di misura sono state tali da far variare di un fattore 2 il rapporto tra segnale in fase continua e in fase dispersa, si ritiene che mantenendo il più possibile costante la quantità di luce all'ingresso della guida l'integrale possa essere ancora considerato un buon quantificatore, in generale poco dipendente da piccole variazioni nell'accoppiamento. Si può realizzare questa condizione con la tecnica Pig-tailing, come prima citato.

Si ha conferma infine del fatto che, per le caratteristiche fisiche del chip e per la sensibilità dell'apparato a perturbazioni esterne, sarebbe ottimale ristabilire spesso le condizioni di accoppiamento tra il laser e la guida di luce, in modo da svolgere misure il più possibile riproducibili e confrontabili.

Conclusioni

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato lo studio dell'applicabilità di due tecniche di rivelazione nell'individuazione di nanoparticelle in soluzioni acquose, l'imaging iperspettrale e il sensing a più elevata sensibilità che prevede l'uso di una piattaforma opto-microfluidica integrata in Niobato di Litio. Infatti, è in tali condizioni che è attualmente difficile rilevare la presenza di microplastiche, nonché distinguerle quando sono aggregate in miscele, ed è tuttora aperto lo sviluppo di un metodo efficace a questo scopo e che sia anche di ridotto impatto ambientale.

Sono state quindi analizzate, con entrambe le tecniche di rivelazione, alcune soluzioni di micro e nano sfere di polistirene e di materiale polimerico semitrasparente, di diametro variabile e di due diverse concentrazioni. Per il primo metodo, le microplastiche sono state osservate sia in gocce sia quando diffuse superficialmente in un film sottile di soluzione. Per il secondo metodo, sono state utilizzate due diverse fasi continue, esadecano e novec, aventi rispettivamente indice di rifrazione superiore e inferiore a quello dell'acqua in cui sono disperse le microplastiche. Dalle analisi svolte si conclude che:

- con la tecnica di imaging iperspettrale è possibile identificare la presenza di plastiche di dimensione micro e nanometrica, tuttavia con una limitata risoluzione nel caso delle soluzioni poco concentrate e di plastiche non aggregate;
- con l'uso del chip opto-microfluidico è possibile distinguere le gocce contenenti microplastiche da quelle di acqua pura tramite l'integrale del segnale relativo al passaggio della goccia. In aggiunta, si è potuto verificare che il tipo di analisi svolta ha permesso la distinguibilità dei diversi campioni analizzati con più elevata risoluzione rispetto al metodo precedente, avendo fatto emergere nuovi parametri del segnale utili a tale scopo.

L'obiettivo proposto può dirsi raggiunto, in quanto si è ricavato che il sensing su base opto-microfluidica è più sensibile all'individuazione di nanoparticelle in acqua rispetto all'imaging iperspettrale.

I risultati di alcune analisi per il secondo dei metodi esposti hanno inoltre messo in luce dei fenomeni non attesi dall'interazione tra raggio laser e microplastiche, per i quali si sono cercate interpretazioni fisiche consistenti senza tuttavia poter fornire una spiegazione esaustiva. Misurando l'intensità di luce trasmessa dalle gocce quando in flusso in un canale microfluidico ed illuminate trasversalmente rispetto alla direzione del moto, si è osservato che:

- la presenza di picchi nel segnale corrispondente alle gocce con microplastiche, quando queste sono disperse in novec, non era atteso in presenza di una guida di luce dritta e può essere spiegato ipotizzando il fenomeno della riflessione totale interna;
- le plastiche con diametro maggiore e le plastiche semitrasparenti, relativamente all'andamento dell'integrale e alla forma dei picchi, hanno mostrato un comportamento anomalo;
- la variabilità dell'integrale con l'accoppiamento tra raggio laser e guida di luce fa emergere l'importanza di operare in condizioni riproducibili e stabili nella quantità di luce incidente.

Il presente lavoro di tesi rappresenta uno studio di fattibilità pionieristico nel campo del sensing di microplastiche e ha permesso di individuare indicatori quantitativi e qualitativi per l'identificazione di microplastiche disperse. Su questi temi sarà quindi necessario investigare tramite protocolli di misura specifici, volti a dare conferma delle ipotesi già formulate ma anche a far emergere nuovi elementi di identificazione e distinguibilità delle microplastiche in acqua.

Bibliografia

- [1] John N Hahladakis, Costas A Velis, Roland Weber, Eleni Iacovidou, and Phil Purnell. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of hazardous materials*, 344:179–199, 2018.
- [2] Thuhin K Dey, Md Elias Uddin, and Mamun Jamal. Detection and removal of microplastics in wastewater: evolution and impact. *Environmental Science and Pollution Research*, 28:16925–16947, 2021.
- [3] Won Joon Shim, Sang Hee Hong, and Soeun Eo Eo. Identification methods in microplastic analysis: a review. *Analytical methods*, 9(9):1384–1391, 2017.
- [4] David A Cooper and Patricia L Corcoran. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of kauai, hawaii. *Marine pollution bulletin*, 60(5):650–654, 2010.
- [5] Mirka Lares, Mohamed Chaker Ncibi, Markus Sillanpää, and Mika Sillanpää. Occurrence, identification and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge process and advanced mbr technology. *Water research*, 133:236–246, 2018.
- [6] Ian T Jolliffe. *Principal component analysis for special types of data*. Springer, 2002.
- [7] Giovanni Piccolo. Physical approaches for components identification: from spectroscopy to modelling. 2022.
- [8] GABRIELE SATTIER. Metodi fisici per la rilevazione e identificazione di microplastiche in acqua.
- [9] REBECCA LEGNARO. Imaging multispettrale per l’analisi di microplastiche disperse in acqua.
- [10] Ronald AJ Litjens, Terence I Quickenden, and Colin G Freeman. Visible and near-ultraviolet absorption spectrum of liquid water. *Applied optics*, 38(7):1216–1223, 1999.
- [11] EMANUELE PERFETTI. Droplet-based optofluidics sensing of micro plastics in aqueous solutions.
- [12] GIOVANNI BRAGATO. Study of light-driven phenomena for opto-microfluidic sensing on multifunctional lithium niobate platforms.
- [13] Jiulin Shi, Haopeng Wu, Feng Yan, Junjie Yang, and Xingdao He. Experimental study on stimulated scattering of zno nanospheres dispersed in water. *Journal of Nanoparticle Research*, 18:1–8, 2016.
- [14] Shaohua Ma, Joseph M Sherwood, Wilhelm TS Huck, and Stavroula Balabani. The microenvironment of double emulsions in rectangular microchannels. *Lab on a Chip*, 15(10):2327–2334, 2015.
- [15] Riccardo Zamboni et al. Study of light driven phenomena for optofluidic applications in lab-on-a-chip platforms in lithium niobate. 2019.