



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Invecchiamento artificiale di microplastiche e analisi con tecniche Raman avanzate

Relatore: Prof. Moreno Meneghetti

Correlatore: Dott. Lucio Litti

Controrelatrice: Prof.ssa Marta De Zotti

LAUREANDA: Giulia Gentili

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Sommario

Abstract	1
1 Introduzione	3
1.1 Microplastiche	3
1.1.1 Cosa sono le microplastiche e come si formano	3
1.1.2 Problematiche legate alla dispersione delle microplastiche	5
1.1.3 Analisi di microplastiche	8
1.1.3.1 Tecniche distruttive	9
1.1.3.2 Tecniche non distruttive	9
1.1.4 Legislazione EU	11
1.2 Raman	14
1.2.1 La tecnica	14
1.2.2 Raman applicato all'analisi di microplastiche	18
1.2.3 SERS	21
2 Strumenti	25
2.1 Sonicatore a punta	25
2.2 Lampada allo Xenon	26
2.3 Micro-Raman	27
2.4 Microscopio in <i>darkfield</i>	29
2.5 UV-Vis-NIR	30
2.6 SEM	31
3 Materiali e metodi	33
3.1 Materiali per l'invecchiamento simulato di microplastiche	33
3.2 Preparazione dei campioni di microplastiche	33
3.3 Metodi per l'invecchiamento di microplastiche	34
3.4 Caratterizzazione delle microplastiche	35
3.5 Sintesi delle particelle di SiO ₂	37
3.5.1 Materiali per la sintesi delle particelle di SiO ₂	37
3.5.2 Metodo per la sintesi delle particelle di SiO ₂	37
3.6 Sintesi AuNS-MBA	38

3.6.1	Materiali per la sintesi di AuNS-MBA	38
3.6.2	Sintesi di AuNS-MBA	38
3.7	Incubazione particelle con AuNS-MBA	40
3.8	Prove di selettività PS vs SiO ₂	40
4	Risultati e discussione	43
4.1	Invecchiamento simulato	43
4.1.1	Invecchiamento mediante sonicazione	45
4.1.2	Fotodegradazione	64
4.2	<i>Labeling</i> per rivelazione SERS	76
4.2.1	Sintesi e caratterizzazione delle particelle di SiO ₂ e PS	77
4.2.2	Calcolo della concentrazione delle soluzioni di particelle di SiO ₂ e PS	83
4.2.3	Prove di selettività PS vs SiO ₂	86
5	Conclusioni	93
	Bibliografia	95

Abstract

Le microplastiche sono un contaminante emergente ubiquitario che sta destando sempre più preoccupazione a livello mondiale a causa dei possibili effetti nocivi sugli esseri viventi. Negli ultimi anni si è osservato un crescente interesse, sia da parte della comunità scientifica che dal legislatore, in merito ai loro effetti tossicologici ed allo sviluppo di tecnologie e metodologie per la loro determinazione e quantificazione in differenti matrici. Riguardo quest'ultimo aspetto, ovvero quello delle metodologie analitiche, una delle più importanti difficoltà sta nella grande variabilità delle microplastiche, in termini di materiali, forme e specie adsorbite, che ne modificano notevolmente le proprietà. Per questo stesso motivo non sono ancora disponibili sul mercato dei campioni standard di micro- e nanoplastiche da usare per lo sviluppo e la validazione dei metodi di analisi.

Questo elaborato di tesi si prefigge lo scopo di sviluppare un modello di invecchiamento di particelle micrometriche di una varietà di materiali polimerici commerciali, allo scopo di avvicinarsi alle analoghe microplastiche rinvenute come contaminanti ambientali. I metodi utilizzati per l'invecchiamento sono l'ultrasonificazione e l'esposizione a radiazione solare simulata ad alta intensità, richiamando quindi due tipici stress naturali (erosione meccanica e fotodegradazione).

I campioni vengono caratterizzati con tecniche di microscopia (ottica ed elettronica) e di spettro-microscopia (micro-Raman).

Inoltre, in questa tesi viene anche presentato lo sviluppo di una tecnologia di *labeling* di nanoplastiche ad opera di nanoparticelle di oro con proprietà SERS. Questa metodologia si è dimostrata altamente efficace e selettiva rispetto a particelle di equivalenti dimensioni ma di materiale inorganico e permette la riduzione dei tempi di analisi al micro-Raman di comuni filtri di ossido di alluminio fino a quasi due ordini di grandezza.

1 Introduzione

1.1 Microplastiche

1.1.1 Cosa sono le microplastiche e come si formano

Negli ultimi anni si è assistito alla crescita dell'attenzione della comunità scientifica e delle agenzie governative preposte alla salvaguardia dell'ambiente verso i cosiddetti contaminanti emergenti. Queste sono specie fino ad ora sconosciute o non considerate interessanti da monitorare, ma che rappresentano un potenziale pericolo per gli ecosistemi e la salute umana. In questo grande insieme dei contaminanti emergenti figurano le microplastiche, ovvero del materiale polimerico artificiale di dimensione ridotta. L'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (ECHA) definisce le microplastiche come particelle o fibre di plastica con lunghezza inferiore a 5 mm. I frammenti di plastiche di dimensioni inferiori a 1 μm (o 100 nm, in base alla definizione adottata) sono chiamati invece nanoplastiche.^{1,2}

Le microplastiche si dividono, inoltre, in due macrocategorie a seconda del modo con cui vengono generate: le microplastiche primarie sono prodotte come tali e si possono trovare, ad esempio, all'interno di prodotti cosmetici; le microplastiche secondarie si originano dalla degradazione di altri vari materiali polimerici in seguito alla loro dispersione nell'ambiente. Esempi di queste ultime sono il deterioramento di materiali plastici, come lo sfregamento degli pneumatici sull'asfalto o il rilascio di fibre a causa del lavaggio di capi sintetici.³

La maggior parte delle tipologie di plastiche comunemente utilizzate al giorno d'oggi sono state sviluppate negli anni '30 e da allora la produzione globale è cresciuta esponenzialmente fino a raggiungere 460 milioni di tonnellate nel 2019 (*Figura 1.1A*).^{4,5} Considerata questa tendenza, si stima che l'inquinamento da microplastiche non possa che peggiorare in futuro a meno che non vengano presi dei seri provvedimenti.

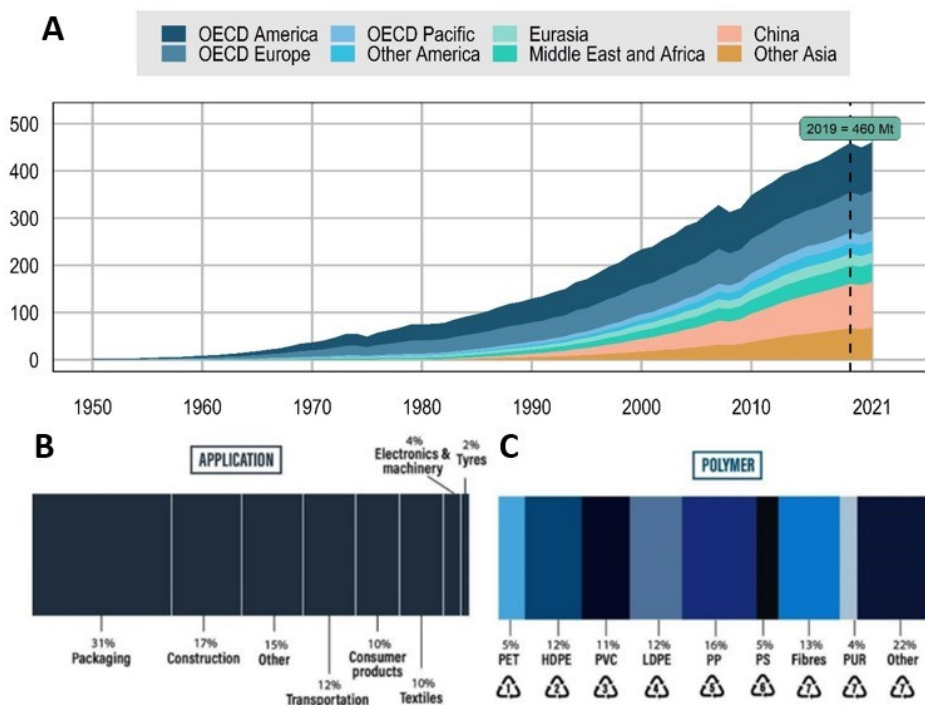


Figura 1.1 Andamento del consumo di plastiche a livello mondiale negli ultimi decenni (A). Divisione delle plastiche in base alle principali applicazioni (B) e alle tipologie (C) nel 2019.⁵

Il polimero più diffuso è il polietilene (HDPE, LDPE, LLDPE), seguono il polipropilene (PP), il polivinilcloruro (PVC), il polietilene tereftalato (PET) ed il polistirene (PS) (Figura 1.1C).^{4,5} Esistono, tuttavia, numerosi altri polimeri e copolimeri ciascuno con le proprie proprietà e caratteristiche. Questa ampia varietà si ripercuote evidentemente anche sulla natura delle microplastiche, creando non poche difficoltà a livello di sviluppo di standard e metodi di analisi, come vedremo in seguito.

In natura avvengono tre principali processi di degradazione della plastica che possono operare in modo sinergico portando alla formazione di microplastiche secondarie: la degradazione fisica, la degradazione fotochimica e la biodegradazione.^{4,6} La velocità di degradazione dipende sia da fattori intrinseci alla plastica, come il rapporto superficie/volume, la composizione chimica e la presenza di additivi, che da fattori estrinseci come la temperatura, l'umidità e la matrice in cui essa si trova.

Con "degradazione fisica" si intende l'abrasione dovuta al contatto con altri oggetti (ivi compresa la lisciviazione dovuta all'acqua), gli sbalzi di temperatura e le variazioni di umidità.

La degradazione fotochimica è invece causata dall'esposizione alla radiazione solare e all'ossigeno presente in atmosfera, o dissolto in acqua, che porta alla rottura delle lunghe catene polimeriche mediante una serie di processi radicalici. I polimeri maggiormente soggetti a questo tipo di degradazione sono ad esempio il polipropilene (PP), l'acrilonitrile-butadiene-stirene (ABS) e le poliammidi aromatiche, per loro natura propensi all'ossidazione, sebbene ne siano soggetti anche polimeri più resistenti, come il policarbonato (PC) e il polietilene tereftalato (PET), specialmente se in presenza di difetti o additivi.⁴

Infine, è riportato che alcuni microorganismi, come batteri, funghi e alghe, siano in grado di biodegradare dei polimeri come, per esempio, il LDPE (*Aspergillus* sp. e *Rhodococcus* sp.), il PP (*Rhodococcus* sp.) ed il PS (*Exiguobacterium* sp., *Thermus* sp., *Bacillus* sp. e *Geobacillus* sp.), i quali risultano come fonte di carbonio per la produzione di energia, CO₂, H₂O e CH₄.⁶

1.1.2 Problematiche legate alla dispersione delle microplastiche

La plastica in generale, e quindi le microplastiche, è un contaminante ubiquitario e persistente in quanto la sua completa degradazione può richiedere fino a migliaia di anni, favorendone la diffusione pressoché ovunque nel globo.

Nel 2019 la frazione di rifiuti globale costituita da plastica era pari a 353 milioni di tonnellate, di cui solamente il 9% è stato riciclato.⁵ Nello stesso anno, ben 22 milioni di tonnellate sono state disperse nell'ambiente, il 12% delle quali è di dimensioni tali da poter essere definito microplastica (*Figura 1.2*).

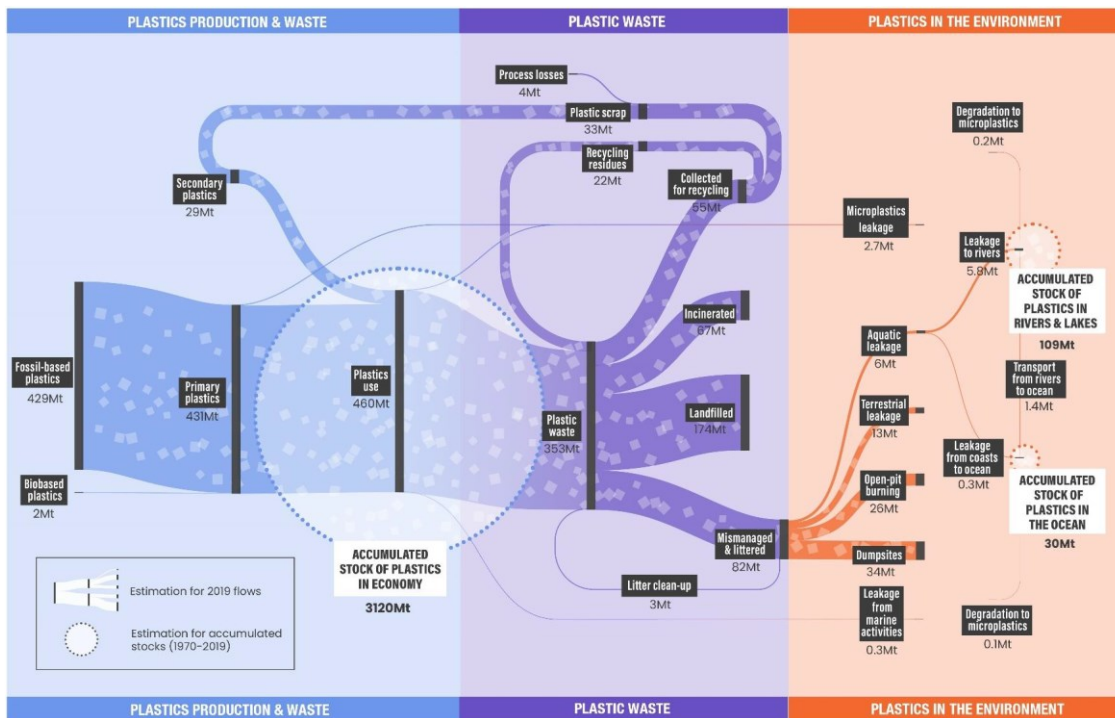


Figura 1.2 Ciclo vitale della plastica con valori riferiti al 2019.⁵

A causa delle loro dimensioni, le microplastiche vengono ingerite facilmente dalla fauna e tendono a bioaccumularsi negli organismi rilasciando tal volta sostanze nocive che risalgono la catena alimentare.^{7,8} Alcuni esempi di sostanze tossiche sono monomeri o additivi, entrambi dovuti al processo di sintesi, ma anche altre sostanze che vengono adsorbite sulla loro superficie, come POPs (*Persistent Organic Pollutants*) e metalli pesanti. Queste ultime specie possono accumularsi sulla superficie delle microplastiche in concentrazioni fino a sei ordini di grandezza superiori alla loro concentrazione nell'ambiente.⁸

Tuttavia, l'alimentazione non è l'unica sorgente di microplastiche a cui l'uomo può essere esposto, anche l'acqua potabile e l'aria che viene respirata ne veicolano la diffusione. Microplastiche di dimensioni inferiori ai 150 µm possono entrare all'interno dei linfonodi e via via che le loro dimensioni diminuiscono hanno sempre un maggiore accesso nell'organismo, fino al sangue e agli organi (*Figura 1.3*).⁷ In letteratura sono riportati studi che dimostrano la presenza di microplastiche perfino nella placenta umana.^{9,10}

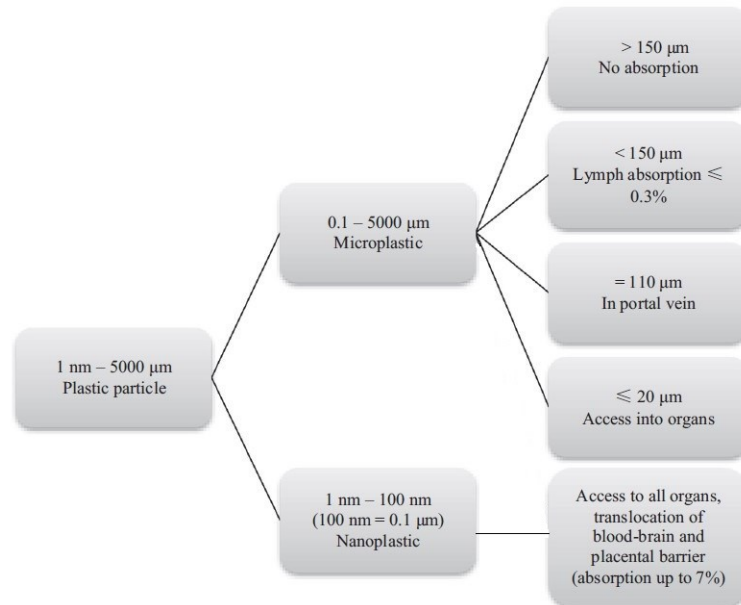


Figura 1.3 Distribuzione di microplastiche e nanoplastiche nei mammiferi a seconda delle loro dimensioni. (Adattato da Ref. 7)

Al momento, gli effetti a breve e lungo termine causati dall'inquinamento di microplastiche sui diversi organismi non sono ancora stati del tutto compresi e sono oggetto di studi. Tuttavia, la loro tendenza ad accumularsi in alcuni tipi di organi come il fegato, il cuore e il cervello, provocando una cascata di effetti negativi, è ormai un dato di fatto e si sospetta che il loro meccanismo principale di tossicità si manifesti attraverso lo stress ossidativo cellulare.⁷ In aggiunta, è possibile che provochino ostruzioni intestinali e l'abrasione dei tessuti innescando infiammazioni locali. Attualmente, gli organismi acquatici sono i più studiati e analisi specifiche hanno individuato, nei casi più estremi, danni genotossici.⁷

1.1.3 Analisi di microplastiche

Le microplastiche sono una categoria estremamente eterogenea di sostanze che varia sia per composizione chimica che per morfologia (dimensione e forma) e proprietà chimico-fisiche.⁴ Le molecole organiche che possono polimerizzare sono innumerevoli e alcuni polimeri, come l'ABS, si sintetizzano per copolimerizzazione di due o più monomeri differenti allo scopo di conferire al materiale le proprietà desiderate. Con lo stesso fine, in fase di sintesi vengono spesso aggiunti additivi come coloranti, rinforzanti o stabilizzanti. Considerate queste differenze sostanziali nella composizione, risulta evidente come anche le loro proprietà chimico-fisiche varino ampiamente, così come il loro comportamento una volta disperse nell'ambiente. In acqua, plastiche poco dense, come il polietilene, tendono a galleggiare, al contrario di plastiche più dense, come il PET. Inoltre, plastiche tipicamente idrofobiche come PE, PP e PS favoriscono l'adsorbimento sulla propria superficie di molecole apolari, e viceversa le plastiche idrofiliche, come le poliammidi ed il PET, favoriscono l'adsorbimento di molecole polari.¹¹

Considerata quindi la varietà compositiva dei polimeri, l'eventuale presenza di additivi, le proprietà differenti e l'ampio ventaglio dimensionale e morfologico che dovrebbe racchiudere tutte queste specie sotto la dicitura "microplastiche", risulta semplice comprendere la difficoltà nell'identificare metodi standard di campionamento ed analisi, così come di figure di merito univoche per indicarne il grado di concentrazione (semplice concentrazione in massa, piuttosto che suddivisa per tipologia di polimeri o dimensioni, forma ecc.). La comunità scientifica si sta adoperando intensamente per uscire da questa *impasse*, ed in letteratura sono disponibili numerosi metodi differenti adottati nell'analisi delle microplastiche, quelli più comuni sono descritti nei paragrafi successivi.

Un altro problema di fondamentale importanza, anch'esso direttamente correlato alla questione dell'ampia varietà delle microplastiche, è il fatto di non disporre di materiali di riferimento certificati, indispensabili per la validazione di un qualsiasi metodo analitico.⁸ Come verrà descritto in dettaglio più avanti, uno degli obiettivi principali di questa tesi riguarda esplicitamente quest'ultimo punto.

1.1.3.1 Tecniche distruttive

Le tecniche distruttive impiegate nell'analisi delle microplastiche sono tipicamente metodi termoanalitici che necessitano di un minimale trattamento preliminare del campione, eventualmente ivi compreso un arricchimento dell'analita per poter superare il limite di rivelabilità, e per questo motivo sono particolarmente veloci.^{8,12} I campioni decompongono ad alte temperature in atmosfera inerte e i prodotti di decomposizione, che sono tipici per ciascun polimero, vengono rivelati da uno spettrometro di massa e quantificati previa calibrazione.

Nella pirolisi accoppiata con gas cromatografia e spettrometria di massa (Py-GC-MS) singole particelle vengono pirolizzate, i loro prodotti di degradazione sono separati con una colonna cromatografica e identificati con uno spettrometro di massa. È un metodo che richiede del tempo in quanto è necessaria una preselezione delle singole particelle ed, inoltre, è particolarmente soggetto a contaminazioni e ostruzioni.¹³

La tecnica di estrazione e desorbimento termici accoppiata con gas cromatografia e spettrometria di massa (TED-GC-MS) prevede l'estrazione dell'analita dal campione mediante TGA a 600°C su degli adsorbenti solidi e la conseguente analisi mediante desorbimento termico accoppiato a GC-MS (TDS-GC-MS). A differenza della pirolisi, con questa tecnica è possibile ottenere misure più veloci.

Un punto di forza legato a questo tipo di approccio è il fatto che il risultato è dominato dal materiale di bulk delle particelle. Di conseguenza leggere variazioni nella composizione o nello strato superficiale maggiormente degradato non ne pregiudicano il risultato. Tuttavia, essendo un'analisi in massa, il contributo di particelle più grandi domina su quello di particelle più piccole e queste tecniche, di per sé, non permettono di raccogliere nessuna informazione sulla morfologia sulle particelle analizzate.

1.1.3.2 Tecniche non distruttive

L'approccio più comunemente utilizzato per la determinazione di microplastiche prevede l'utilizzo combinato di tecniche di microscopia ottica/elettronica e tecniche

spettroscopiche: la prima serve per l'analisi morfologica, mentre la seconda per la composizione chimica.

Le tecniche di microscopia ottica sono veloci, semplici, economiche e possono essere effettuate *in situ*. Sono alcune volte utilizzate da sole per l'analisi di microplastiche, tuttavia, essendo complicato distinguere le particelle di plastica da altri materiali, è facile incorrere in casi di falsi positivi e falsi negativi.⁸ Per cercare di superare questo problema il campione può essere trattato, prima dell'analisi, con una soluzione contenente *Nile Red*, un colorante organico sufficientemente selettivo nei confronti dei materiali polimerici meno polari come PP e PE, che rende le microplastiche fluorescenti, permettendone anche la suddivisione in plastiche polari e apolari grazie alla sua idrofobicità.¹⁴⁻¹⁶

Il SEM (*Scanning Electron Microscopy*) è la microscopia elettronica più utilizzata in questo campo, essa permette di ottenere immagini dettagliate e ad alta risoluzione delle particelle analizzate. Se accoppiato alla spettroscopia di dispersione di energia (SEM-EDS) è possibile ricavare informazioni sulla composizione elementare delle particelle distinguendo così quelle organiche da quelle inorganiche. Tuttavia, anche in questo caso non è possibile distinguere i diversi polimeri e, inoltre, anche eventuali sostanze adsorbite sulla superficie, o additivi, rendono più complicato isolare i segnali derivanti dalla microplastica.⁸

Le tecniche spettroscopiche tipicamente utilizzate per l'analisi di microplastiche sono quelle vibrazionali, ovvero l'IR ed il Raman. Entrambe richiedono piccole quantità di campione e una preparativa necessaria a rimuovere i contributi interferenti della matrice, nonché il maggior numero di particelle diverse dalle microplastiche. A differenza delle tecniche descritte in precedenza, queste ultime permettono di distinguere le diverse microplastiche analizzate grazie allo spettro vibrazionale caratteristico e, se dotate di un microscopio, diventano delle tecniche ibride di microspettroscopia, fornendo sia informazioni sulla morfologia che sulla composizione chimica delle particelle.

Recentemente, sono emerse ulteriori tecniche più avanzate per l'analisi di microplastiche. Tra queste, la tecnica SERS che ha aperto la strada anche all'analisi delle nanoplastiche e che verrà discussa più in dettaglio nel capitolo 1.2.3.

1.1.4 Legislazione EU

Come accennato nei capitoli precedenti, al giorno d'oggi c'è una crescente preoccupazione legata alla dispersione delle microplastiche nell'ambiente che, non essendo biodegradabili, si stanno accumulando sempre di più nei diversi comparti ambientali.

Già da qualche anno i paesi della Comunità Europea hanno iniziato, in modo indipendente, ad imporre delle restrizioni per frenare questa tendenza prima che venga raggiunto un punto di non ritorno. In Italia, ad esempio, con la legge 205/2017, è stato imposto il divieto di commercio e produzione, a partire dal 1° gennaio 2019, dei bastoncini per la pulizia delle orecchie con il supporto in plastica o in altri materiali non biodegradabili. Sempre nella stessa legge, ma con entrata in vigore dal 1° gennaio 2020, è vietato il commercio di prodotti cosmetici da risciacquo ad azione esfoliante o detergente contenenti microplastiche.¹⁷ Provvedimenti simili sono stati presi anche da altri paesi europei e non.¹

Con questa legge sono state in parte abbattute le emissioni di microplastiche primarie, tuttavia, i prodotti cosmetici sono solamente una tra le tante applicazioni di microplastiche primarie, come la medicina, il cibo, i carburanti, le vernici, i detersivi e l'agricoltura.¹⁸ Si stima che la principale fonte di inquinamento da microplastiche primarie sia il materiale di riempimento granulare nei campi di erba sintetica, che rilascia annualmente 16 000 tonnellate di microplastiche.¹⁹

Nel 2019 l'ECHA (*European Chemicals Agency*) ha compilato una proposta di restrizione che comprende tutte le microplastiche aggiunte intenzionalmente nei prodotti, allo scopo di raggiungere un accordo armonizzato tra tutti i paesi europei. I comitati RAC (*Committee for Risk Assessment*) e SEAC (*Committee for Socio-Economic Analysis*) hanno approvato la proposta nel 2020 consigliando addirittura restrizioni più severe di quelle proposte dall'ECHA. Al momento si è in attesa dell'elaborazione da parte della Commissione Europea di una proposta di modifica dell'allegato XVII del REACH, dove sono elencate tutte le sostanze soggette a restrizione, che è prevista entro il quarto trimestre del 2022.²⁰ Seguirà poi un voto da parte dei membri dell'Unione Europea in

seno al comitato REACH e la proposta andrà al vaglio del Parlamento Europeo e del Consiglio Europeo.²¹

Le microplastiche primarie sono solamente parte del problema, si stima che le microplastiche secondarie formatesi annualmente per degradazione nelle acque superficiali europee siano circa pari a 176 000 tonnellate, ovvero quattro volte tanto le microplastiche disperse come tali che contano per 42 000 tonnellate annue.¹⁹ Per risolvere il problema delle microplastiche è quindi necessario agire alla fonte, ovvero le materie plastiche. Il problema è già stato in parte affrontato nella stesura dell'Agenda 2030 in cui è prevista la riduzione significativa dell'inquinamento marino entro 2025 (obiettivo 14), un aumento del riciclaggio e una diminuzione dell'impatto ambientale negativo entro il 2030 (obiettivi 6, 11 e 12).²²

Più recentemente, con il recepimento della direttiva europea 2019/904 attraverso il Decreto Legislativo 196/2021, l'Italia ha posto dei nuovi limiti riguardanti la plastica monouso. Il provvedimento è entrato in vigore il 14 gennaio 2022 e, con l'obiettivo di prevenire e ridurre l'incidenza di determinati prodotti di plastica sull'ambiente, in particolare quello acquatico, e sulla salute umana, ha posto delle restrizioni all'immissione sul mercato degli imballaggi in plastica monouso non conformi allo standard europeo della norma UNI EN 13432 o UNI EN 14995 e ha fissato degli obiettivi di riciclaggio.²³ Sono conformi alla norma gli imballaggi in plastica biodegradabile e compostabile con percentuali di materia prima rinnovabile uguali o superiori al 40% e, dal 1° gennaio 2024, superiori al 60%. Gli obiettivi sul riciclaggio prevedono di riciclare almeno il 77% in peso delle bottiglie per bevande fino a tre litri immesse sul mercato annualmente entro il 2025 e di alzare la soglia al 90% entro il 2029. Tali bottiglie, se fabbricate con PET, a partire dal 2025 dovranno essere costituite almeno al 25% da plastica riciclata, valore che salirà al 30% dal 2030. Inoltre, dal 3 luglio 2024 i contenitori con tappi e coperchi in plastica potranno essere immessi sul mercato solamente se i corrispettivi tappi e coperchi ne resteranno attaccati per la durata prevista del prodotto.

Decisa la strategia da adottare per limitare l'incontrollato inquinamento dovuto alle microplastiche, l'obiettivo attuale è quello di quantificare i danni ambientali attuali.

Per fare ciò, è di primaria importanza riuscire a concordare una metodologia standard comune e uniforme per il campionamento e l'analisi delle microplastiche.

Al fine di rispondere alla crescente preoccupazione del pubblico circa gli effetti sulla salute umana dei contaminanti emergenti, nella direttiva europea 2020/2184 si è deciso che, entro il 12 gennaio 2024, andrà redatta una relazione sulle potenziali minacce dovute alle microplastiche per le fonti di acque destinate al consumo umano.²⁴ Inoltre, entro la stessa data andrà scelta una metodologia per misurare le microplastiche in vista di includerle nell'elenco di controllo. Entro il 12 gennaio 2029 dovrà invece essere trasmessa al Parlamento ed al Consiglio Europeo una relazione sulle potenziali minacce per le fonti di acque destinate al consumo umano dovute alle microplastiche.

La scelta della metodologia standard è particolarmente gravosa data la grande eterogeneità della classe di composti sotto esame, tuttavia, nella DIN EN ISO 24187 e nel rapporto ISTISAN 21/2 sono riportati una serie di osservazioni e consigli utili che spaziano dalla fase di campionamento a quella dell'analisi dei dati.^{11,25} Nel primo documento è affrontato anche il problema dei materiali di riferimento che sono essenziali per valutare la bontà di un metodo e per effettuare confronti tra laboratori. Per la realizzazione di uno standard, viene consigliato di soffermarsi sui polimeri più frequenti nell'ambiente come PE, PP, PS, PET, PA e PVC la cui composizione, però, è tipicamente alterata a causa di processi di degradazione. Risulta inoltre importante che dimensioni e forma rispecchino la variabilità tipicamente riscontrata nei campioni naturali.

A questo proposito, in questo lavoro di tesi viene presentato un modello di invecchiamento standard di una serie di materiali polimerici commerciali di dimensioni micrometriche, simulando lo stesso genere di degradazione a cui è tipicamente sottoposta la plastica dispersa in un ambiente acquatico, con lo scopo di avvicinarsi alle analoghe microplastiche rinvenute come contaminanti ambientali.

1.2 Raman

1.2.1 La tecnica

Come accennato nel capitolo precedente, la tecnica Raman è una spettroscopia di tipo vibrazionale che viene talvolta impiegata nell'analisi delle microplastiche. In un tipico esperimento di spettroscopia Raman il campione viene irradiato con una sorgente monocromatica ad alta energia (un laser con lunghezza d'onda nel visibile o nel vicino IR) e si misura lo scostamento in frequenza tra la radiazione incidente e quella diffusa.²⁶ In base all'energia del fotone diffuso si possono distinguere due fenomeni:

- Se i due fotoni, incidente e diffuso, hanno la medesima frequenza ν_0 si parla di diffusione elastica o diffusione Rayleigh;
- Se il fotone diffuso ha una frequenza differente, che può essere sia minore che maggiore di quella del fotone incidente ($\nu_0 \pm \nu_m$), si parla di diffusione anelastica o diffusione Raman.

Nel secondo caso, la differenza di energia (o in frequenza) tra i due fotoni, che è indipendente dalla frequenza della radiazione incidente, è detta *Raman shift* (RS) e corrisponde a transizioni vibro-rotazionali della specie analizzata. Misurando la diffusione di tipo anelastico è possibile ricavare informazioni sui legami chimici e, per questa ragione, gli spettri Raman vengono espressi in funzione del RS in numero d'onda. A differenza della diffusione Rayleigh, la diffusione Raman è un fenomeno molto meno probabile e quindi per poterne misurare l'intensità è richiesta una sorgente di luce molto intensa e spesso tempi di acquisizione lunghi.

Per comprendere come viene generato il segnale Raman è utile considerare il caso semplice di una molecola biatomica dove i due atomi siano connessi da un singolo legame covalente. Il sistema si può trattare secondo la meccanica classica come un oscillatore armonico, dove il legame corrisponde ad una molla e gli atomi sono corpi liberi di oscillare attorno alla posizione di equilibrio.

La frequenza di vibrazione ν_m della molecola è descritta da Eq. 1.1, dove K è la costante elastica e μ è la massa ridotta.²⁷

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad \text{Eq. 1.1}$$

Esprimendo la vibrazione molecolare lungo la coordinata temporale si può definire la coordinata di vibrazione q attorno alla posizione di equilibrio q_0 , secondo Eq. 1.2.

$$q = q_0 \cos 2\pi \nu_m t \quad \text{Eq. 1.2}$$

Ritornando ora al mondo molecolare, ricordiamo come un legame chimico altro non sia che una distribuzione elettronica localizzata con alta probabilità attorno all'asse interatomico. La proprietà della polarizzabilità, α , esprime il modo in cui la distribuzione elettronica molecolare viene perturbata sotto l'azione di uno stimolo esterno. Per quanto detto fin ora, risulta evidente come la polarizzabilità possa venire espressa in funzione delle coordinate normali di vibrazione, in quanto la posizione degli atomi determina grandemente la distribuzione elettronica. In Eq. 1.4 viene espressa tale dipendenza come espansione in serie troncata al primo termine, approssimazione valida per vibrazioni di piccola entità.

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 + \dots \quad \text{Eq. 1.3}$$

Quando la molecola, dotata quindi di un tensore polarizzabilità α , viene colpita da una luce laser, quest'ultima induce un momento di dipolo P (Eq. 1.4).

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \quad \text{Eq. 1.4}$$

E è la componente del campo elettrico dell'onda elettromagnetica del laser usato per l'eccitazione, E_0 è l'ampiezza del campo e ν_0 è la frequenza del laser.

Riarrangiando le equazioni 1.2, 1.3 e 1.4 è possibile esprimere P come somma di tre contributi dovuti alla diffusione Rayleigh, e Raman anti-Stokes e Stokes (Eq. 1.5).

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 [\cos\{2\pi(\nu_0 + \nu_m)t\} + \cos\{2\pi(\nu_0 - \nu_m)t\}] \quad \text{Eq. 1.5}$$

Il primo termine rappresenta il contributo della diffusione detta di Rayleigh, dove il fotone diffuso ha la stessa energia del fotone incidente. Il secondo ed il terzo contributo sono invece chiamati coerentemente alla legge di Stokes, nota soprattutto per i fenomeni di emissione da stati elettronici eccitati.²⁶ Il secondo è quindi quello della diffusione Raman anti-Stokes, attribuibile ai fotoni con frequenza maggiore della luce

incidente, ed il terzo di quella Raman Stokes che è attribuibile ai fotoni con frequenza minore rispetto alla luce incidente.

In *Figura 1.4* è rappresentato un esempio di spettro Raman nel quale si osservano chiaramente le bande relative ai tre modi di vibrazione Raman-attivi della molecola di CCl_4 . La banda centrale, più intensa, che cade a RS uguale a 0 rappresenta la diffusione di tipo elastico di Rayleigh e di conseguenza non fornisce particolari informazioni sulla molecola. A sinistra, a RS positivi, si osservano le bande di Stokes che sono di media intensità, mentre a destra, a RS negativi, si trovano le bande anti-Stokes, le meno intense.

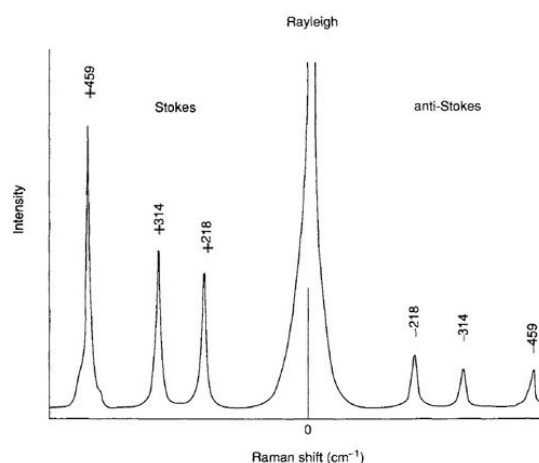


Figura 1.4 Spettro Raman di CCl_4 (lunghezza d'onda di eccitazione = 488.0 nm). (Adattato da Ref. 27)

Le differenti intensità delle bande relative alla diffusione Raman Stokes ed anti-Stokes si spiegano facilmente osservando un tipico diagramma di Jablonski (*Figura 1.5*). Nella spettroscopia Raman, la frequenza del laser di eccitazione è tale da non riuscire a popolare il primo stato elettronico eccitato, ed è quindi come se i fotoni incidenti occupassero uno stato detto "virtuale" che, in figura, è rappresentato da delle linee tratteggiate. Il vantaggio di ciò sta nel fatto che, dato che non si ha un vero e proprio assorbimento di fotoni, è possibile sfruttare questo fenomeno anche a lunghezze d'onda in cui tipicamente le molecole non assorbono.²⁷ In caso contrario, ovvero se l'eccitazione popolasse uno stato elettronico eccitato, si parlerebbe di Raman risonante.

Nel caso di Raman Stokes il punto di partenza è lo stato vibrazionale fondamentale $v=0$ dove la popolazione, in accordo con la legge di distribuzione di Maxwell-Boltzmann, è molto maggiore di quella nello stato vibrazionale $v=1$, il punto di partenza per il Raman

anti-Stokes. Considerato che i Raman Stokes ed anti-Stokes sono perfettamente speculari (tranne che per le intensità), in genere si preferisce misurare solamente la parte Stokes dello spettro per avere un migliore rapporto segnale/rumore.

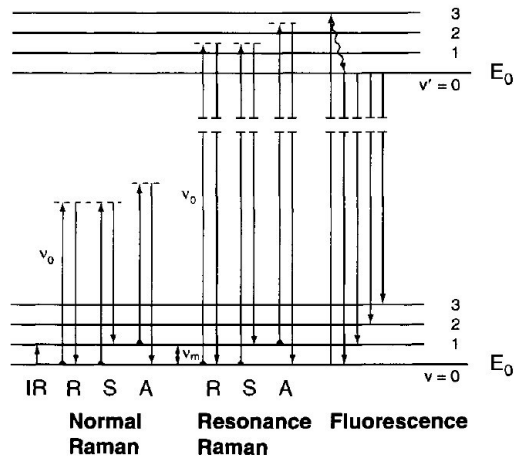


Figura 1.5 Confronto dei livelli energetici per uno spettro Raman normale, per uno di Raman risonante e per uno di fluorescenza.²⁷

Come mostrato in Eq. 1.5, affinché una vibrazione sia Raman attiva è necessario che il termine $(\partial\alpha/\partial q)_0$ sia diverso da zero, ovvero, è necessario che il modo normale di vibrazione produca una variazione di polarizzabilità.

Considerando questa volta una molecola lineare poliatomico (es. CO₂), i suoi 3N-5 (=4) gradi di libertà vibrazionali possono essere espressi come modi normali di vibrazione, totalmente indipendenti tra loro (Figura 1.6).

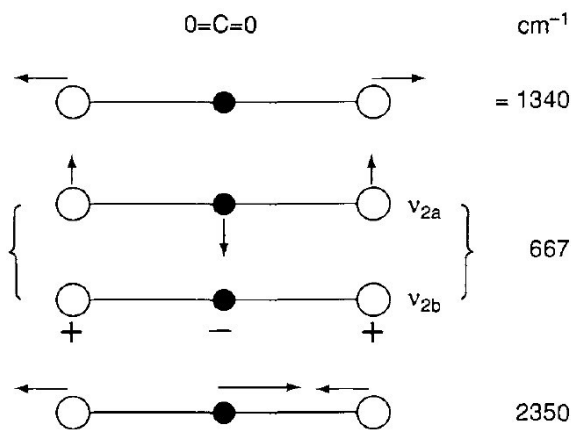


Figura 1.6. Modi normali di vibrazione della CO₂. I + rappresentano uno spostamento al di sopra del piano, mentre i - uno spostamento sotto al piano entrambi perpendicolarmente.²⁷

Per molecole semplici come questa è possibile rappresentare la nube elettronica come un'ellisse, e plottando $1/\sqrt{\alpha_i}$ (dove $i = x,y,z$) si ottiene un corpo tridimensionale detto "ellissoide di polarizzabilità", quelli relativi alla CO_2 sono mostrati in *Figura 1.7A*.

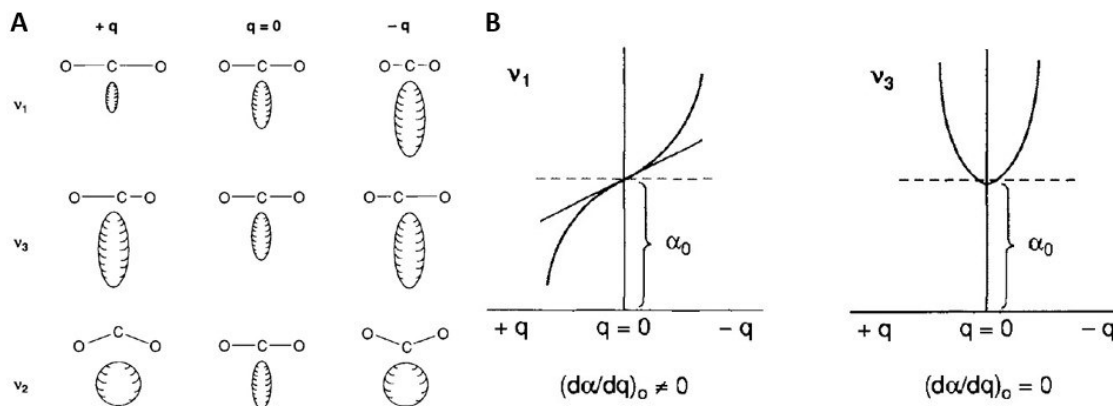


Figura 1.7. Cambiamento degli ellissoidi di polarizzabilità durante le vibrazioni di CO_2 (A) e plot delle derivate della polarizzabilità (B).²⁷

La forma dell'ellissoide durante la prima vibrazione è diversa ai due estremi $+q$ e $-q$ e per questo si tratta di una vibrazione Raman-attiva. Al contrario, nella seconda e nella terza vibrazione le due forme sono identiche e ciò sta a significare che non sono vibrazioni Raman-attive, come dimostrato dai plot di $(\partial\alpha/\partial q)$ in *Figura 1.7B*.

1.2.2 Raman applicato all'analisi di microplastiche

Come già accennato in precedenza, le spettroscopie Raman e IR sono le più utilizzate per la caratterizzazione delle microplastiche. Entrambe sono spettroscopie di tipo vibrazionale ma con un principio di funzionamento diverso: a differenza del Raman, l'IR utilizza una sorgente luminosa nell'infrarosso con energia tale da permettere l'assorbimento di fotoni da parte delle molecole, le quali vengono perturbate fino ad uno stato vibrazionale eccitato.²⁷ In questo caso, ciò che viene misurato dal rivelatore è l'intensità luminosa trasmessa, ovvero quella che non viene assorbita dal campione. Affinché un modo normale di vibrazione sia IR-attivo è necessario che avvenga una variazione del momento di dipolo della molecola, quindi una vibrazione Raman-attiva può essere o non essere IR-attiva, e viceversa.

Ci sono vantaggi e svantaggi nell'usare una tecnica anziché l'altra, i principali vantaggi del Raman sono i seguenti:

- La tecnica Raman permette di analizzare campioni in soluzione acquosa senza interferenze da parte dei segnali dell'acqua che sono particolarmente deboli. Ciò avviene perché le vibrazioni caratteristiche dei legami molto polarizzati sono intrinsecamente deboli negli spettri Raman mentre quelle dei legami poco polarizzati producono segnali intensi. Viceversa, per gli spettri IR.
- Il diametro di un laser, non focalizzato, è tipicamente di 1-2 mm e quindi in un'analisi Raman sono richieste minori quantità di campione rispetto a un'analisi IR.
- Per lo stesso principio del punto sopra, il Raman permette l'analisi di un campione con maggiore risoluzione in quanto, in accordo con *Eq. 1.6*, la risoluzione spaziale è direttamente proporzionale alla lunghezza d'onda della radiazione incidente. Nel caso del micro-Raman, ovvero uno strumento Raman accoppiato con un microscopio, lo spot del laser può raggiungere dimensioni circa pari a qualche centinaio di nanometri se viene utilizzato un laser a bassa lunghezza d'onda ed un obiettivo ad elevata apertura numerica (NA). La massima risoluzione spaziale ottenibile è limitata dalla diffrazione della luce ed è circa pari alla metà della lunghezza d'onda della radiazione impiegata: per lo spettrometro IR varia da 1.5 μm a 10 μm , per il Raman da 250 nm a 500 nm.²⁸

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad \text{Eq. 1.6}^{29}$$

NA, l'apertura numerica, è un parametro adimensionale che indica il massimo angolo utile al sistema obiettivo per ricevere o emettere luce. In microscopia, per migliorare il potere risolutivo si preferiscono ottiche con un'elevata apertura numerica.

- Il vetro non interferisce nella raccolta degli spettri Raman come fa con quelli IR dove assorbe la radiazione. Questo permette di analizzare anche sostanze igroscopiche sigillate all'interno di tubi in vetro.

- Si possono raccogliere spettri in un ampio range di numeri d'onda che va da 50 a 4000 cm^{-1} in una singola scansione. Per ottenere un risultato simile l'IR richiede una serie di reticoli, *beam splitters*, filtri e rivelatori.

I principali svantaggi del Raman sono invece:

- Il costo elevato della strumentazione.
- La possibilità di rovinare il campione usando il laser a una potenza troppo elevata o per troppo tempo.
- La presenza di fluorescenza in certi campioni che va a coprire parte dei segnali.
- I tempi di acquisizione lunghi spesso richiesti per ottenere spettri con un rapporto segnale/rumore accettabile.
- La difficoltà nell'ottenere spettri rotazionali e roto-vibrazionali ad alta risoluzione. Ciò è dovuto al fatto che gli spettri Raman vengono osservati nella regione UV-visibile dove è complicato raggiungere un'elevata risoluzione spettrale.

Per le ragioni elencate sopra, la spettroscopia IR (o più propriamente FTIR) viene comunemente preferita per l'analisi di un numero elevato di campioni di microplastiche, ma diventa poco efficiente nel caso in cui se ne voglia analizzare la frazione più piccola, ovvero microplastiche inferiori a 10 μm .

In letteratura si trovano alcuni esempi di analisi di microplastiche mediante micro-Raman, tuttavia i casi in cui viene analizzata la frazione più piccola delle microplastiche sono pochi.²⁹⁻³³ Ad esempio, Sobhani *et al.* sono riusciti a visualizzare particelle di PS di dimensioni pari a 100 nm mediante mappe Raman utilizzando un laser da 532 nm ed un obiettivo 100x con apertura numerica pari a 0.9.²⁹ La risoluzione, a causa delle dimensioni dello spot del laser circa pari a 300 nm, non è sufficiente a discriminare le singole particelle, ma a prescindere che le nanoparticelle fossero aggregate o meno, ne è comunque stata possibile la rivelazione anche se con segnali molto deboli e sondando solamente piccole aree di 1 μm^2 .

I metodi di preparazione dei campioni sono vari, ma hanno tutti come scopo l'estrazione delle microplastiche dal resto della matrice in modo da evitare la presenza di interferenti

ed eventuale materiale fluorescente che renderebbero difficile l'acquisizione degli spettri.

L'analisi si può effettuare depositando le particelle su vetrini per microscopio nel caso di campioni particolarmente puliti, o su filtri di diversa composizione a condizione che la superficie sia il più liscia possibile e che non presenti segnali Raman di per sé. La deposizione su filtro permette in aggiunta di selezionare le microplastiche in base alle dimensioni dei pori. Una superficie a limitata rugosità è un requisito essenziale per permettere l'acquisizione di una serie di spettri, comunemente detti "mappa", delle singole particelle o di una porzione della superficie del filtro senza che il fuoco dell'obiettivo, essenziale per l'acquisizione di uno spettro con buona qualità, venga perso.²⁹ A questo scopo i filtri in ossido di alluminio sono quelli maggiormente utilizzati per l'analisi delle microplastiche di campioni acquosi.^{25,34-36}

1.2.3 SERS

Nonostante un micro-Raman permetterebbe teoricamente l'analisi di particelle di dimensioni nell'ordine delle centinaia di nanometri, in realtà più le dimensioni dell'analita sono piccole, più le bande Raman diventano deboli e facilmente confondibili col rumore. Questo per una mera questione di quantità di materiale. Di conseguenza l'acquisizione degli spettri può diventare non più possibile o richiedere tempi di acquisizione molto lunghi.

Questo problema può essere superato impiegando la tecnica SERS, ovvero la *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*. Si tratta di un'evoluzione della spettroscopia Raman in cui i segnali vengono amplificati di diversi ordini di grandezza grazie a due effetti sinergici denominati *chemical-* ed *eletromagnetic enhancement*. In entrambi i casi il SERS prevede l'utilizzo di un materiale di supporto per l'analita di interesse, detto appunto substrato, il quale è il vero artefice dell'amplificazione del segnale Raman. Mentre il *chemical enhancement* (CE) prevede una interazione intima tra gli stati elettronici dell'analita e del substrato, tale da influenzarne la polarizzabilità (e quindi l'efficienza di *scattering* Raman), l'*electromagnetic enhancement* (EE) necessita che il substrato

supporti quelle che si chiamano risonanze plasmoniche superficiali localizzate (LSPR).³⁷ L'EE è di gran lunga il contributo predominante al SERS, quando presente, tanto che spesso si fa riferimento solo a quello. Generalmente, i substrati SERS più utilizzati sono nanostrutture di oro o argento perché possiedono le giuste proprietà per sviluppare LSPR nel range del visibile/vicino IR, ovvero il tipico intervallo di lunghezze d'onda di eccitazione in uno spettro Raman. L'EE prevede che la nanostruttura plasmonica, una volta eccitata da un campo elettromagnetico esterno, sviluppi sulla sua superficie dei campi locali estremamente amplificati rispetto al campo incidente. Una specie chimica che si trova in tali zone di campi locali amplificati ne risulta interessata, con conseguente aumento, ad esempio, del segnale Raman ad essa associato. Affinché si manifesti l'amplificazione dei segnali dell'analita è quindi necessario che esso sia adsorbito sulla superficie del metallo o comunque che non sia più distante di circa 10 nm, per questo motivo l'analita deve avere proprietà chimiche tali da permettere la formazione di un legame covalente con il metallo o almeno la presenza di interazioni elettrostatiche favorevoli.

In *Figura 1.8* sono riportati due spettri, quello in alto è lo spettro Raman di una singola molecola i cui segnali sono stati amplificati mediante SERS, mentre quello sotto è lo spettro di una frazione di soluzione della stessa molecola ma non amplificata.

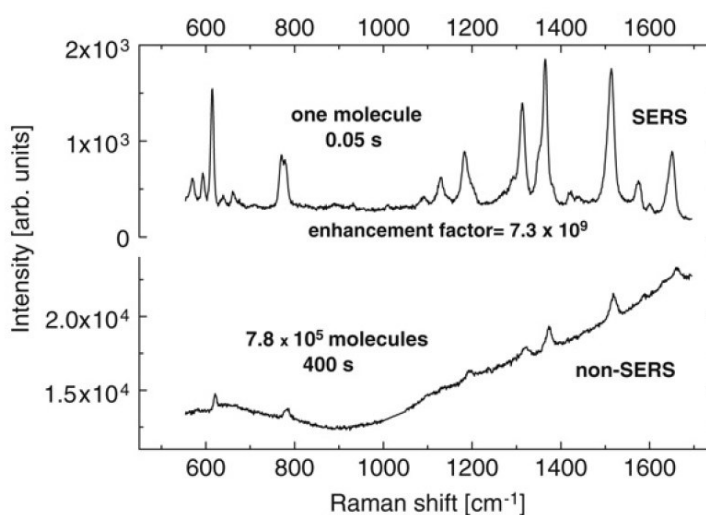


Figura 1.8. Spettro SERS e non SERS di molecole di rodamina 6G (RH6G) con laser da 633 nm.³⁷

Il guadagno portato dall'approccio SERS è palese. La presenza di un substrato SERS non solo ha reso possibile l'acquisizione dello spettro di una singola molecola in tempi

estremamente ridotti, ma ha anche fatto sì che la qualità dei segnali fosse migliore. In questo caso il fattore di amplificazione (EF, *enhancement factor*) è stato calcolato come pari a $7.3 \cdot 10^9$.³⁷

L'EF è una classica figura di merito per i substrati SERS ed è un parametro che indica di quanto è stato aumentato il segnale Raman di base dell'analita. L'EF è direttamente correlato all'efficienza di amplificazione secondo i già citati meccanismi di CE ed EE. Ne risulta che, ad esempio, diversi modi vibrazionali Raman attivi di una stessa molecola possano venire amplificati in modo diverso. Oppure che la lunghezza d'onda del laser, in risonanza o meno con le risonanze plasmoniche del substrato, abbia un forte impatto sul EF. Infine, la morfologia a livello nanometrico del substrato SERS può favorire l'insorgenza di zone dove i campi locali possano accumularsi od interferire positivamente che vengono chiamate *hotspot*.

Recentemente, la tecnica SERS è stata applicata per l'analisi di micro- e nanoplastiche con ottimi risultati, ma non ne sono ancora state sfruttate pienamente le potenzialità.^{38,39} Il substrato realizzato da Lê *et al.* è costituito da *nanostar* d'oro ricoperte da argento ed inserite in un substrato poroso di ossido di alluminio anodizzato (AuNSs@Ag@AAO). Questo ha permesso di rivelare concentrazioni estremamente basse (50 ppm) di nanoparticelle di polistirene di dimensioni pari a 0.4 μm da soluzioni acquose. Purtroppo, lo stesso *set-up* si è rivelato non efficace nella rivelazione di particelle di dimensioni superiori, già a partire da 0.8 μm .³⁸

Xu *et al.* hanno impiegato substrati commerciali Klarite (costituiti da un pattern di piramidi ricoperte di Au) sempre allo scopo di rivelare nano- e microparticelle di polistirene.³⁹ In questo caso è stato possibile aumentare i segnali Raman del polimero sfruttando le proprietà SERS del substrato sia per particelle di dimensioni nanometriche (360 e 500 nm) che di dimensioni micrometriche (1 μm , 2 μm e 5 μm). Tuttavia, la posizione delle particelle rispetto al substrato Klarite è fondamentale per l'aumento dei segnali: particelle troppo grandi per entrare nelle cavità piramidali ampie 1.5 μm e particelle che comunque si depositano al loro esterno sono caratterizzate da spettri Raman con intensità molto minori rispetto alle particelle che riescono a posizionarsi correttamente. Di conseguenza, questo substrato è maggiormente adatto per l'analisi

di plastiche sub-micrometriche e, anche in questo caso, potrebbe portare a una sottostima della loro quantità nel caso in cui esse non si depositino nelle zone di *hotspot*.

Ulteriori studi in questo campo potrebbero aprire nuove vie per l'analisi di questo tipo di contaminante. A questo scopo, nei capitoli successivi di questa tesi viene proposto un metodo d'analisi basato sul SERS che permette un'analisi relativamente rapida di campioni di micro- e nanoplastiche depositate su filtri utilizzando un microspettrometro Raman.

2 Strumenti

2.1 Sonicatore a punta

Per effettuare l'invecchiamento delle microplastiche che simuli stress puramente fisici è stato utilizzato un sonicatore a punta *Bandelin SONOPULS HD 2070* con frequenza di funzionamento a 20 kHz e potenza massima pari a 70 W. Per evitare il surriscaldamento del dispositivo durante gli esperimenti, la potenza è stata mantenuta attorno al 30% e sono stati generati ultrasuoni impulsati anziché continui. L'intero apparato è mostrato in *Figura 2.1*.

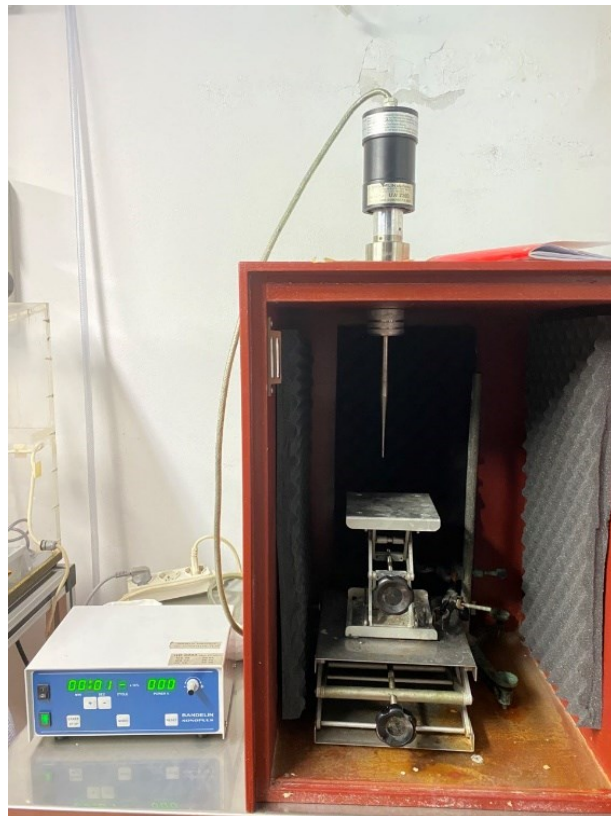


Figura 2.1 Sonicatore a punta Bandelin SONOPULS HD 2070.

2.2 Lampada allo Xenon

Per effettuare l'invecchiamento delle microplastiche che simuli stress puramente fotonici è stata utilizzata una lampada allo Xenon *Spectra Physics 6253* con potenza massima pari a 150 W. Questo tipo di lampada emette luce con uno spettro molto simile a quello della radiazione solare che raggiunge la superficie terrestre, soprattutto nella regione di lunghezze d'onda tra 290 e 700 nm. Il *set-up* utilizzato è mostrato in *Figura 2.2*.

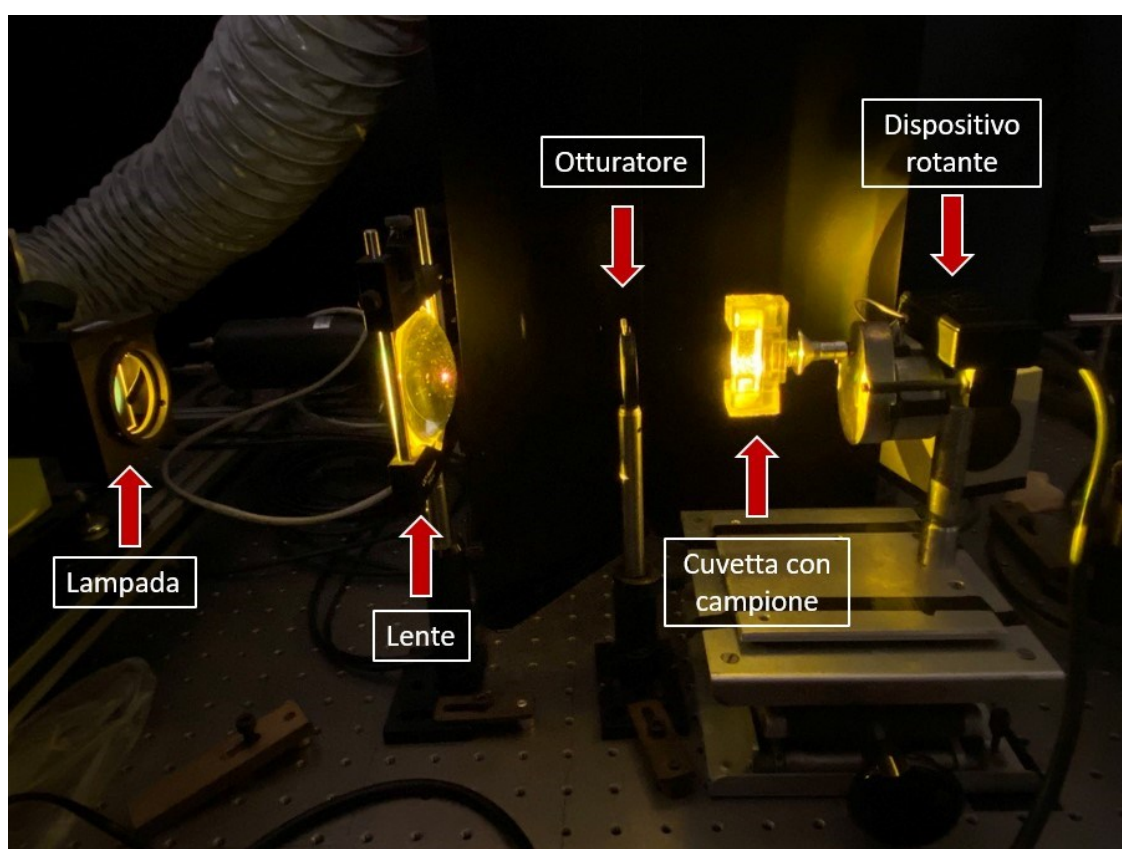


Figura 2.2 Set-up per l'invecchiamento di microplastiche mediante lampada allo Xenon.

Da sinistra si vedono la lampada allo Xenon, una lente che permette di focalizzare il fascio luminoso, un otturatore ed una cuvetta in quarzo contenente un campione di microplastiche supportata su un dispositivo motorizzato che ruotando permette di mescolarne il contenuto.

2.3 Micro-Raman

Per la raccolta di immagini e spettri delle particelle è stato utilizzato un Raman *InVia Renishaw* interfacciato a un microscopio *Leika DM-LM*. Lo strumento è dotato di sorgenti laser a diverse lunghezze d'onda:

- un diodo che emette luce con lunghezza d'onda pari a 785 nm;
- un laser ad Argon che emette luce a 633 nm;
- un laser HeNe che emette luce a 488 nm e 514 nm.

In questo lavoro è stata impiegata la linea laser da 633 nm sia per la caratterizzazione delle microplastiche invecchiate sia negli esperimenti di *labeling* con le *nanostar* d'oro, nel secondo caso è stato utilizzato anche il laser da 785 nm.

In *Figura 2.3* è riportata una rappresentazione schematica dei componenti essenziali di un generico micro-Raman.

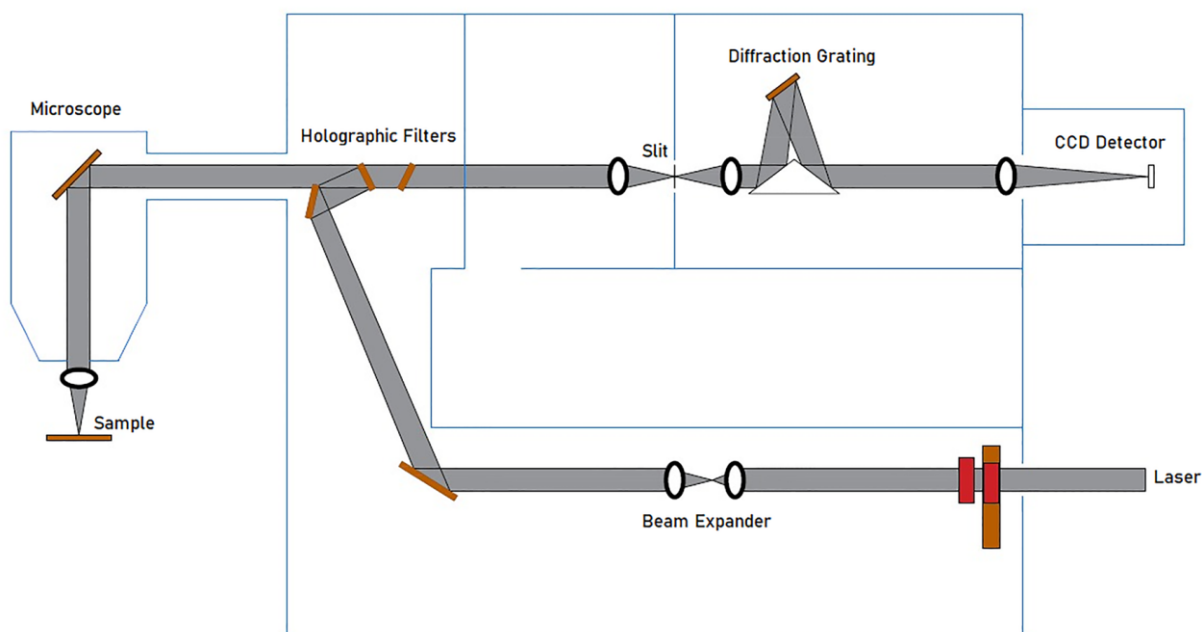


Figura 2.3 Rappresentazione schematica di un micro-Raman.⁴⁰

L'intensità del laser che raggiunge il campione può essere modulata in modo discontinuo da una serie di filtri a diversa densità ottica. Dopo gli specchi di ingresso, il fascio puntiforme del laser viene trasformato da un *beam expander* in un fascio di raggi

paralleli di diametro pari a 6 mm, questo permette un'illuminazione uniforme dell'ingresso del microscopio. La radiazione passa poi attraverso un *beam splitter* che ne permette il direzionamento sul campione.

La luce diffusa dal campione viene filtrata mediante un filtro *edge* che rimuove le componenti Rayleigh e anti-Stokes con una capacità di *cut-off* di circa 80 cm^{-1} . La componente anelastica Stokes raggiunge quindi un reticolo di diffrazione con 1800 linee/mm, per poi passare attraverso una lente e una fenditura e raggiungere il rivelatore costituito da un CCD (*Charge-Coupled Device*) di 400 *pixel*, delle dimensioni di $22 \mu\text{m} \times 22 \mu\text{m}$. Ogni *pixel* cattura un fotone e, per effetto fotoelettrico, genera una corrente elettrica. Il sensore può analizzare un ampio intervallo di numeri d'onda se impostato in modalità estesa (circa da 100 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}), o una piccola finestra di numeri d'onda di ampiezza pari a 540 cm^{-1} , centrata attorno a un preciso *Raman shift*, se utilizzato in modalità statica.

Il microscopio ottico è dotato di obiettivi 5x, 10x, 20x, 20x a lunga focale *Olympus*, 50x, 100x e 100x *Leica Fluotar* con apertura numerica di 0.9.

2.4 Microscopio in *darkfield*

Le immagini delle particelle in *darkfield* sono state raccolte utilizzando un microscopio *Zeiss AxioTech 100 reflected-light* e una fotocamera *Nikon*. Una rappresentazione schematica del dispositivo è riportata in *Figura 2.4*.

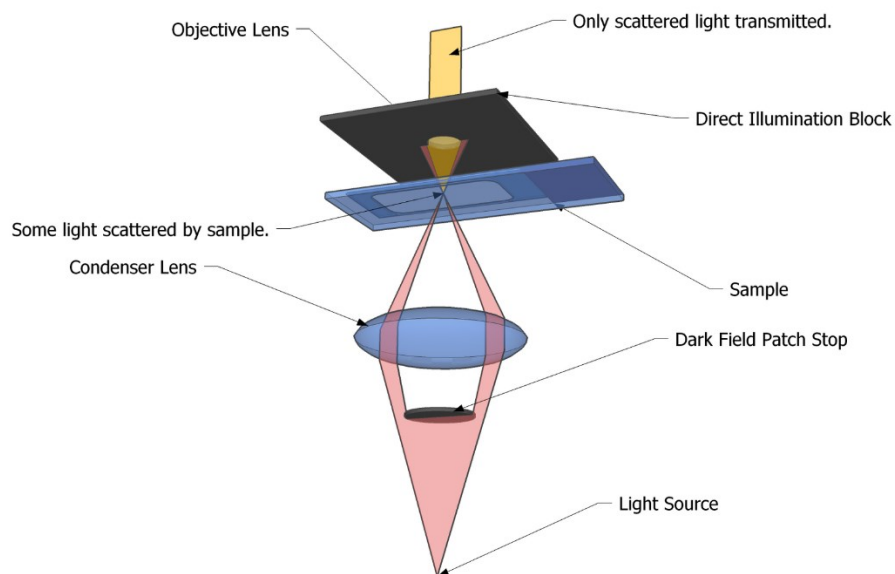


Figura 2.4 Schema che illustra il percorso della luce in un microscopio darkfield.

2.5 UV-Vis-NIR

La raccolta di spettri nel range di lunghezze d'onda che va dall'UV al vicino IR è stato utilizzato uno spettrofotometro *Agilent Technologies Cary 5000 UV-Vis-NIR*.

In *Figura 2.5* è riportata una rappresentazione schematica dello strumento.

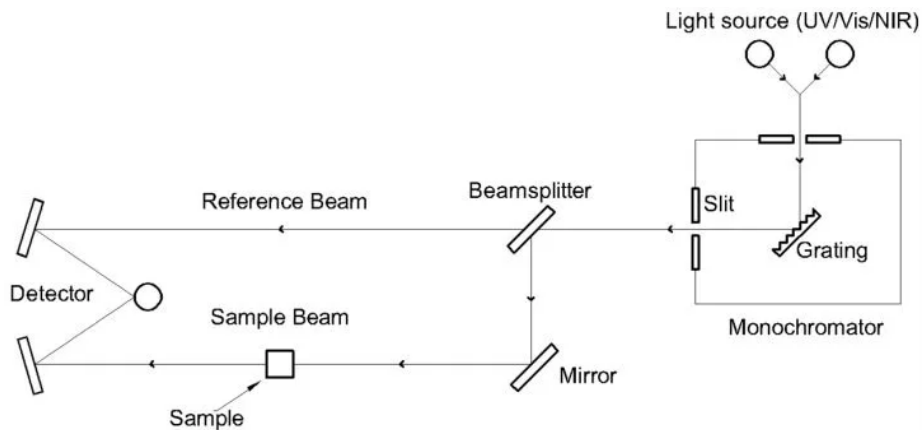


Figura 2.5 Rappresentazione schematica di uno spettrofotometro UV-Vis-NIR.

La radiazione luminosa della sorgente viene indirizzata ad un monocromatore dove viene selezionata una determinata lunghezza d'onda nel range 175-3300 nm. La luce attraversa poi un *beam splitter* dividendosi in due raggi: quello di riferimento e quello che raggiunge il campione. Il raggio di riferimento e la luce trasmessa dal campione sono infine misurate dal rivelatore.

2.6 SEM

Le immagini delle particelle ad elevata risoluzione sono state raccolte utilizzando un microscopio a scansione elettronica (SEM) *JSM Jeol 6490* equipaggiato con un filamento in tungsteno e un rivelatore EDX (*Energy Dispersive X-ray*) *IXRF Systems 500*. La potenza del fascio di elettroni incidente è stata impostata a 20 kV, l'acquisizione dell'immagine è stata effettuata misurando gli elettroni secondari. Uno schema semplificato dello strumento è mostrato in *Figura 2.6*.

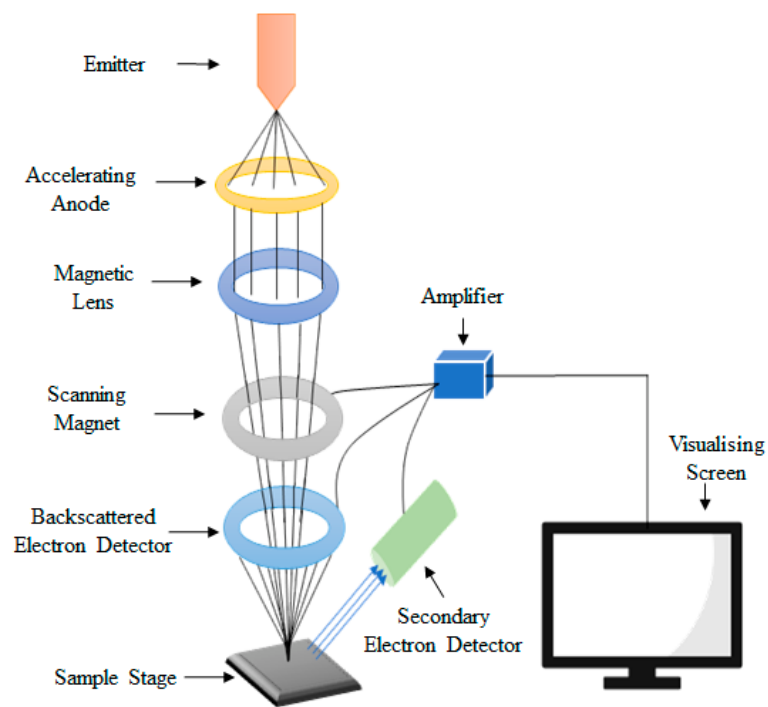


Figura 2.6 Rappresentazione schematica di un microscopio a scansione elettronica (SEM).

3 Materiali e metodi

3.1 Materiali per l'invecchiamento simulato di microplastiche

Tabella 3.1

Sostanza	Sigla	Numero CAS	Densità (g/cm ³)	Quantità (g)
Polietilene a bassa densità	LDPE	9002-88-4	0.91-0.94	0.0500
Polietilene tereftalato	PET	25038-59-9	1.38	0.0613
Poliammide 6	PA6	25038-54-4	1.06-1.16	0.0518
Poliammide 12	PA12	24937-16-4	1.02	0.0497
Politetrafluoroetilene	PTFE	9002-84-0	2.20	0.0507
Sieroalbumina bovina	BSA	90604-29-8	-	0.5000

3.2 Preparazione dei campioni di microplastiche

In un matraccio da 100 mL sono stati sciolti 0.5000 g di sieroalbumina bovina in acqua bidistillata (sol. BSA). All'interno di cinque diverse *vials* da 8 mL sono stati dispersi circa 0.05 g delle diverse microplastiche in 7 mL di sol. BSA e la miscela è stata agitata vigorosamente per far entrare in contatto tutte le particelle con la proteina. Dopo alcune ore, durante le quali la BSA ha formato un film attorno alle microplastiche rendendole meno idrofobiche, esse sono state ri-disperse in circa 7 mL di acqua bidistillata. Si sono così ottenute le soluzioni contenenti le microplastiche di partenza non trattate: LDPE-p, PET-p, PA6-p, PA12-p e PTFE-p. La lettera terminale "-p" a seguito delle sigle dei campioni sta per "*pristine*", ovvero il materiale non trattato.

A partire da queste soluzioni sono state realizzate le soluzioni di microplastiche (MPs) da invecchiare. Per l'invecchiamento tramite sonicazione sono stati diluiti 3 mL di MPs-p con 4 mL di acqua bidistillata all'interno di *vials* da 8 mL, mentre per la fotodegradazione sono stati diluiti 1.5 mL di MPs-p in 1.9 mL di acqua bidistillata in cuvette in quarzo.

3.3 Metodi per l'invecchiamento di microplastiche

Per effettuare l'invecchiamento mediante sonicazione è stato immersa la punta del sonificatore nelle *vials* contenenti le microplastiche diluite fino a circa un centimetro dal fondo, nel caso di microplastiche più dense dell'acqua, e più vicino alla superficie per il LDPE che ha una densità minore.

Il dispositivo è stato impostato a una potenza del circa 30% ed in modo tale da creare ultrasuoni impulsati della durata di 0.5 s con un intervallo tra un impulso e quello successivo di 0.5 s. Ogni tre cicli di sonicazione è stata prelevata una piccola aliquota della miscela, ogni ciclo ha una durata media di 1 ora e 28 minuti. In tutto sono stati effettuati 12 cicli per ottenere 4 diversi stadi di invecchiamento di ciascuna microplastica. Le frazioni sonicate a tempo diversi vengono indicate con il suffisso "-s" seguito dalle lettere "A, B, C e D" secondo lo schema riportato nella seguente tabella.

Tabella 3.2

Campione	Numero cicli di sonicazione	Tempo di trattamento
MPs-sA	3	132 min (circa 2 h)
MPs-sB	6	264 min (circa 4 h)
MPs-sC	9	396 min (circa 7 h)
MPs-sD	12	528 min (circa 9 h)

La fotodegradazione è stata realizzata focalizzando la luce di una lampada allo Xenon in un'area circolare di diametro pari a 1 cm sulla cuvetta in quarzo contenente le microplastiche disperse in acqua, secondo il setup illustrato in *Figura 2.2*. Per evitare che le particelle si depositassero sul fondo o rimanessero sulla superficie evitando la luce della lampada, la cuvetta è stata mantenuta in costante rotazione permettendo il rimescolamento delle particelle.

La lampada è stata impostata a una potenza di 150 W che, secondo misure effettuate con un calorimetro, corrisponde a 0.900 W in corrispondenza del campione, ovvero 1.15 W/cm² tenendo in considerazione l'area in cui la luce è stata focalizzata. Considerando che l'irradianza media del sole sulla superficie terrestre al livello del mare è pari a 0.1

W/cm², un'ora di trattamento utilizzando questo *set-up* corrisponde a 11.5 ore di irraggiamento solare.

Piccole aliquote della soluzione sono state raccolte ogni 24 h fino ad ottenere un totale di 4 diversi stadi di invecchiamento per ciascuna microplastica riportati nella seguente tabella.

Tabella 3.3

Campione	Tempo di irraggiamento
MPs-iA	24 h
MPs-iB	48 h
MPs-iC	72 h
MPs-iD	96 h

3.4 Caratterizzazione delle microplastiche

I campioni sono stati caratterizzati mediante microscopia elettronica (SEM) e spettro-microscopia (micro-Raman). Per le misure al Raman, una piccola aliquota per ciascuna frazione di particelle è stata depositata su vetrini da microscopio accuratamente puliti prima con una soluzione piranha e poi con dell'alcol isopropilico. Sono state poi raccolte delle immagini e degli spettri in corrispondenza delle particelle utilizzando un obiettivo 20x con apertura numerica 0.25. La linea laser che è stata impiegata è quella da 633 nm alla massima potenza (circa 6 mW sul campione) e ciascuno spettro è stato raccolto in modalità estesa con un tempo di acquisizione pari a 10 s, eccezione fatta per alcune particelle particolarmente grosse di PET-i che hanno richiesto una potenza laser inferiore (circa 3 mW sul campione).

In *Tabella 3.4* sono indicati numeri di particelle analizzate per ciascun campione.

Tabella 3.4

Campione	Numero particelle	Campione	Numero particelle
LDPE-p	28		
LDPE-sA	24	LDPE-iA	18
LDPE-sB	24	LDPE-iB	19
LDPE-sC	26	LDPE-iC	43
LDPE-sD	21	LDPE-iD	6
PET-p	13		
PET-sA	93	PET-iA	41
PET-sB	78	PET-iB	60
PET-sC	66	PET-iC	79
PET-sD	194	PET-iD	109
PTFE-p	34		
PTFE-sA	100	PTFE-iA	59
PTFE-sB	76	PTFE-iB	68
PTFE-sC	89	PTFE-iC	76
PTFE-sD	42	PTFE-iD	82
PA6-p	132		
PA6-sA	122	PA6-iA	65
PA6-sB	45	PA6-iB	38
PA6-sC	43	PA6-iC	31
PA6-sD	104	PA6-iD	96
PA12-p	78		
PA12-sA	35	PA12-iA	32
PA12-sB	43	PA12-iB	33
PA12-sC	82	PA12-iC	34
PA12-sD	36	PA12-iD	45

Le immagini al SEM sono state raccolte solamente per i campioni iniziali (-p) e finali (-sD e -iD), la rivelazione è stata effettuata analizzando gli elettroni secondari. Piccole aliquote di ciascuna soluzione sono state depositate su dei vetrini da microscopio ricoperti con un nastro adesivo di alluminio e, per migliorare ulteriormente la qualità

delle immagini, sono stati sottoposti a metallizzazione con oro in seguito alla deposizione delle microplastiche.

3.5 Sintesi delle particelle di SiO₂

3.5.1 Materiali per la sintesi delle particelle di SiO₂

Tabella 3.5

Sostanza	Numero CAS	MM (g/mol)	Densità (g/cm ³)	Quantità (mL)	Moli	Concentrazione (mol/L)
NH ₄ OH	1336-21-6	35.05	0.88	0.450	0.011	1.69
TEOS	78-10-4	208.3	0.934	1.015	0.005	0.77
H ₂ O bidis.	7732-18-5	18.02	0.998	0.070 + 1	0.004 (70 μL)	0.62
EtOH an.	64-17-5	46.1	0.79	5	-	-

3.5.2 Metodo per la sintesi delle particelle di SiO₂

Le particelle di silice sono state sintetizzate utilizzando il metodo di Stöber. In un matraccio posto in bagno a ultrasuoni riempito con acqua riscaldata fino a 42 °C, in modo da mantenere una temperatura superiore ai 35 °C per l'intera durata della sintesi, sono stati aggiunti 5 mL di EtOH anidro prelevato con una siringa precedentemente condizionata con N_{2(g)}, 450 μL (0.011 mol) di NH₄OH e 70 μL (0.004 mol) di H₂O bidistillata. Aggiunti 1.015 mL (0.005 mol) di TEOS la sintesi è iniziata e immediatamente e la soluzione si è intorbidita. La reazione è stata fatta procedere per 2 ore nel bagno a ultrasuoni ed alla fine è stata fermata con l'aggiunta di 1 mL di H₂O bidistillata.

Le particelle sono state purificate effettuando due centrifugazioni a 17500 RCF per 3 minuti e, dopo l'ultima ri-dispersione in acqua bidistillata, la miscela è stata centrifugata per altri 3 minuti a 500 RCF. Sia il surnatante contenente la frazione di particelle più piccole, che il precipitato contenente la frazione di particelle più grandi sono stati conservati. Il primo come tale, mentre il secondo in seguito a una dispersione in H₂O bidistillata.

3.6 Sintesi AuNS-MBA

3.6.1 Materiali per la sintesi di AuNS-MBA

Tabella 3.6

Sostanza	Numero CAS	MM (g/mol)	Densità (g/cm ³)	Quantità	Concentrazione (mol/L)
HAuCl ₄	16903-35-8	339.79	3.9	0.2 mL	0.05
HCl	7647-01-0	36.46	1.187	4.11 mL	1
AgNO ₃	7761-88-8	169.88	-	8.8 mg	0.01
Acido ascorbico	50-81-7	176.13	-	88.1 mg	0.1
MBA	4869-59-4	154.19	-	7.7 mg	0.001
NaOH	1310-73-2	40.00	-	2 mg	0.1
AuNP	-	-	-	-	0.001 [Au]

Tabella 3.7

Sostanza	Concentrazione (mol/L)	Quantità	Moli	Equivalenti
HAuCl ₄ (sol.)	0.050	25 µL	$1.25 \cdot 10^{-6}$	62.5
HCl (sol.)	1	5 µL	$5 \cdot 10^{-6}$	250
AgNO ₃ (sol.)	0.010	25 µL	$2.5 \cdot 10^{-7}$	12.5
Acido ascorbico (sol.)	0.100	25 µL	$2.5 \cdot 10^{-6}$	125
MBA (sol.)	0.001	50 µL	$5 \cdot 10^{-8}$	1
AuNP (sol.)	0.001 [Au]	50 µL	-	-
H ₂ O bidis.	-	5 mL	-	-

3.6.2 Sintesi di AuNS-MBA

Per poter sintetizzare e funzionalizzare le *nanostar* d'oro è necessario prima preparare le soluzioni riportate in *Tabella 3.6*.

- La soluzione di HAuCl₄ 0.05 M è stata preparata diluendone 0.2 mL in un matraccio da 50 mL con acqua bidistillata;
- La soluzione di HCl 1 M è stata preparata diluendo 4.11 mL di una soluzione contenente HCl al 37% in un matraccio da 50 mL con acqua bidistillata;
- La soluzione di AgNO₃ 0.01 M è stata preparata sciogliendo 8.8 mg di composto in un matraccio da 5 mL con acqua bidistillata;

- La soluzione di acido ascorbico 0.1 M è stata preparata sciogliendo 88.1 mg di composto in un matraccio da 5 mL con acqua bidistillata;
- La soluzione di NaOH 0.1 M è stata preparata sciogliendo 2 mg di composto in un matraccio da 50 mL con acqua bidistillata;
- La soluzione di acido *p*-mercaptobenzoico (MBA) 1 mM è stata preparata sciogliendo 7.7 mg di composto in un matraccio da 50 mL con la soluzione di NaOH 0.1 M;
- La soluzione contenente nanoparticelle d'oro (AuNP) con concentrazione 0.001 M è stata preparata per diluizione di una soluzione di nanoparticelle d'oro di dimensioni pari a 14.6 nm ottenute per ablazione laser. La concentrazione è stata determinata dallo spettro UV-Vis utilizzando la legge di Lambert-Beer, il coefficiente di estinzione molare è stato ottenuto seguendo una procedura presente in letteratura.⁴¹

Per una buona riuscita della sintesi successiva è necessario che sia la soluzione di AgNO₃ che quella di acido ascorbico non siano più vecchie di una settimana.

Per la sintesi vera e propria del substrato AuNS-MBA, in una *vial* da 10 mL sono stati aggiunti 5 mL di H₂O bidistillata, 5 µL di HCl 1 M ($5 \cdot 10^{-6}$ mol) e 25 µL di HAuCl₄ 0.05 M ($1.25 \cdot 10^{-6}$ mol). La miscela è stata mescolata velocemente con un'ancoretta magnetica. Successivamente, sono stati aggiunti molto velocemente, e in questo ordine, 50 µL di AuNP (1 mM), 25 µL di AgNO₃ 0.01 M ($2.5 \cdot 10^{-7}$ mol) e 25 µL di acido ascorbico 0.1 M ($2.5 \cdot 10^{-6}$ mol). La soluzione è diventata immediatamente blu. Dopo circa un minuto di attesa sono stati aggiunti 50 µL di MBA 1 mM ($5 \cdot 10^{-8}$ mol) e la reazione è stata lasciata decorrere per un'ora sotto agitazione prima di essere purificata per centrifugazione.

3.7 Incubazione particelle con AuNS-MBA

Le microparticelle di PS e silice sono state incubate con quantità diverse di substrato AuNS-MBA all'interno di provette eppendorf mantenute in agitazione per 24 ore su un vortex.

I volumi aggiunti delle diverse soluzioni sono riportati in *Tabella 3.8*, è stata inoltre aggiunta acqua MilliQ fino a un volume finale di 0.3 mL.

Tabella 3.8.

Particelle di PS/SiO ₂ (0.12 pM)	MBA-AuNS (8.33 pM)	HCl (0.1 M)	Rapporto molare MBA-AuNS/particelle
150 µL	0 µL	2.5 µL	0
150 µL	2 µL	2.5 µL	0.926
150 µL	5 µL	2.5 µL	2.314
150 µL	10 µL	2.5 µL	4.629
150 µL	15 µL	2.5 µL	6.943
150 µL	25 µL	2.5 µL	11.572
150 µL	50 µL	2.5 µL	23.144

3.8 Prove di selettività PS vs SiO₂

Per valutare la selettività del substrato AuNS-MBA nei confronti di PS e SiO₂ sono stati innanzitutto raccolti una serie di spettri delle singole particelle incubate con dosi crescenti di substrato e depositate separatamente su vetrini da microscopio. Gli spettri sono stati raccolti utilizzando la linea laser da 633 nm con potenza pari a 0.1 mW e con un tempo di acquisizione di 3 s e un obiettivo 100x (*Leica Fluotar*) con apertura numerica 0.9 in modalità statica in modo tale che sia il picco del PS (1001 cm⁻¹) che quello dell'MBA (1078 cm⁻¹) rientrassero nella finestra di numeri d'onda. Dopo la correzione della baseline con il software dello strumento, per ciascuno spettro sono state valutate le intensità dei due picchi caratteristici e la correlazione di Pearson con i corrispettivi spettri di riferimento.

In aggiunta, una miscela contenente entrambi i tipi di particelle, in uguale misura ed incubate con AuNS-MBA (rapporto molare 23), sono state depositate su un filtro in ossido di alluminio *ANODISC Anopore Inorganic Membrane* con porosità pari a 0.2 µm e

diametro pari a 47 mm. È stata effettuata una mappa 200 μm x 200 μm con una griglia di 10 μm utilizzando il laser da 785 nm ed un obiettivo 10x con apertura numerica 0.25. Ciascuno spettro è stato raccolto con una potenza laser di 3 mW e un tempo di acquisizione pari a 10 s.

Le porzioni di filtro che hanno rivelato la presenza di MBA sono state scansionate nuovamente utilizzando il laser da 633 nm e un obiettivo 100x *Leica Fluotar* con apertura numerica 0.9. con una griglia di 1 μm .

4 Risultati e discussione

4.1 Invecchiamento simulato

Le microplastiche presenti come contaminanti ambientali solitamente manifestano proprietà chimico-fisiche diverse dalla plastica originale da cui si sono formate. Possono variarne, ad esempio, le dimensioni, il colore, la cristallinità ed il grado di ossidazione. Queste variazioni sono dovute a una serie di processi di degradazione descritti nel capitolo 1.1.1, e la loro entità è proporzionale al tempo trascorso nell'ambiente.

I processi di degradazione della plastica sono stati, e sono tutt'ora, oggetto di studi dedicati allo sviluppo di un metodo efficiente per la loro rimozione, ed evitarne così l'accumulo nei diversi comparti ambientali. Questi sono, inoltre, di fondamentale importanza anche nel campo dello sviluppo di metodi adatti all'analisi di questi contaminanti. Come anche citato in precedenza nei capitoli introduttivi, un grave problema legato all'ampia variabilità delle microplastiche è la difficoltà nel disporre di adeguati materiali standard di riferimento per lo sviluppo e la validazione di metodi di campionamento, trattamento del campione ed analisi. Una volta compreso il meccanismo di degradazione che queste subiscono quando disperse in ambiente, lo si potrebbe riprodurre e si renderebbe possibile disporre di microplastiche prodotte artificialmente e rappresentative della controparte rinvenuta in ambiente.

A questo scopo, in questo lavoro di tesi sono stati riprodotti artificialmente i due meccanismi di degradazione naturale predominanti per microplastiche rinvenute in ambienti acquatici, ovvero stress di tipo meccanico e fotoindotto. Questi sono stati applicati in modo indipendente a cinque diverse tipologie di microplastiche, selezionate come le più rappresentative per le loro varie proprietà meccaniche e di resistenza ad attacchi chimici. Queste sono il polietilene a bassa densità (LDPE), il polietilene tereftalato (PET), il politetrafluoro etilene (PTFE), la poliammide 6 (PA6) e la poliammide 12 (PA12). Gli effetti di queste perturbazioni sono stati monitorati nel tempo attraverso tecniche di microscopia e spettroscopia, al fine di valutare le differenze delle microplastiche invecchiate così prodotte rispetto ai campioni di partenza.

Sono stati scelti per lo scopo un sonificatore a punta per simulare lo stress meccanico ed una lampada allo Xenon per simulare la fotodegradazione, in quanto essa permette di riprodurre artificialmente e in modo fedele la distribuzione spettrale dell'energia solare sulla superficie terrestre nella regione maggiormente energetica tra 290 e 700 nm.⁴²

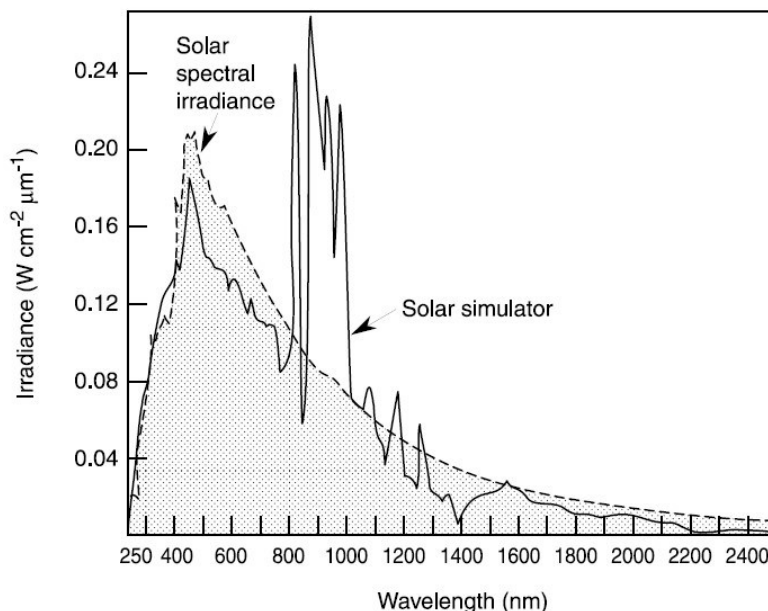


Figura 4.1 Irradianza a confronto di una lampada allo Xenon e della radiazione solare.⁴²

Per ottenere informazioni riguardanti la morfologia, sono state utilizzate sia la microscopia ottica che analisi al SEM, mentre la spettroscopia Raman è stata utilizzata per valutare eventuali perturbazioni chimiche, attraverso l'analisi dei modi vibrazionali associati ai vari polimeri prima e dopo i trattamenti di invecchiamento. In letteratura sono riportati molti esempi di spettri IR di plastiche invecchiate e non, nei quali si notano quasi sempre differenze principalmente dovute all'ossidazione superficiale.⁴³⁻⁴⁵ Scarseggiano, invece, spettri Raman di confronto, i quali sono altrettanto utili come riferimento per l'analisi di microplastiche ambientali.

Per facilitare la dispersione delle microplastiche in acqua, esse sono state trattate con una soluzione concentrata di sieroalbumina bovina (BSA) la quale ha formato un film proteico attorno alle singole particelle migliorandone la disperdibilità in acqua. In questo modo, è anche stato possibile simulare il rivestimento organico che spesso i rifiuti plastici presentano quando dispersi in natura.⁶

4.1.1 Invecchiamento mediante sonicazione

L'impiego di un sonicatore per l'invecchiamento di microplastiche è già stato studiato in precedenza: Von Der Esch *et al.* hanno degradato con successo diversi tipi di plastiche in soluzione acquosa sfruttando un bagno ad ultrasuoni.⁴⁶ Questo metodo, tuttavia, come precisato dagli stessi autori, si è rivelato poco riproducibile a causa della variabilità del campo a ultrasuoni nelle diverse zone del bagno. Per superare questo ostacolo, in questo lavoro è stato impiegato un sonicatore a punta che permette di creare un campo a ultrasuoni maggiormente omogeneo ed in aggiunta più intenso.⁴⁷

I campioni di microplastiche da invecchiare sono stati ottenuti per diluizione da quelli trattati con BSA in modo tale da avere una quantità sufficiente di microplastiche non trattate sia come riferimento che per l'altro processo di invecchiamento. Il trattamento è stato effettuato immergendo la punta del sonicatore all'interno di *vials* da 8 mL contenenti le microplastiche disperse in acqua. Tale volume ha permesso di disporre di una quantità sufficiente di microplastiche con cui portare avanti gli esperimenti anche dopo il prelievo di piccole aliquote contenenti particelle progressivamente più invecchiate. La profondità di immersione è stata scelta in modo tale da applicare il campo ad ultrasuoni il più vicino possibile alle microplastiche, per questo motivo la punta è stata immersa fino a circa un centimetro dal fondo per le microplastiche più dense dell'acqua (PET, PTFE, PA6 e PA12) ed a circa un centimetro dalla superficie per il LDPE che ha una densità inferiore.

In mancanza di riferimenti procedurali, i parametri strumentali e i tempi sono stati scelti in modo arbitrario per il trattamento di un primo tipo di plastica e poi applicati analogamente anche agli altri campioni.

I parametri morfologici e geometrici utilizzati per valutare l'effetto del trattamento sono il diametro equivalente (*Eq. Diameter*) e l'*aspect ratio* (AR). Il diametro equivalente è il diametro di una particella tonda di area uguale a quella della particella misurata dalle immagini acquisite al microscopio ottico. Questo parametro permette di semplificare la discussione riguardante le dimensioni. L'AR è un parametro adimensionale che corrisponde al rapporto tra il massimo diametro Feret e il minimo diametro Feret. Il

diametro Feret è una misura spesso utilizzata in microscopia ed applicata alle proiezioni bidimensionali di oggetti tridimensionali. In questo caso, esso è definito come la distanza tra due linee parallele tangenti alle microplastiche. Tramite l'AR si possono osservare cambiamenti circa la forma delle particelle: ad un AR unitario corrisponde una particella che proietta un cerchio perfetto nell'immagine presa al microscopio, mentre ad un AR elevato corrisponde una particella maggiormente elongata.

Entrambi questi parametri sono rappresentati utilizzando diagrammi di tipo *boxplot* per ciascuna delle frazioni di microplastiche: -p corrisponde al campione non trattato, mentre -sA, -sB, -sC e -sD corrispondono a step di invecchiamento sempre maggiore (*Tabella 3.2*).

Nei diagrammi *boxplot* il riquadro blu racchiude tutti i valori compresi nel secondo e terzo quartile (ovvero tra il 25-esimo e 75-esimo percentile) e, al suo interno, con una linea rossa è rappresentata la mediana. I tratteggi che partono dalla zona centrale portano ai valori di massimo e minimo indicati con un segmento nero. Tutti i dati che l'algoritmo di costruzione del diagramma ritiene anomali vengono esclusi e segnati con un + rosso, essi sono i cosiddetti *outliers*.

La variazione delle dimensioni in termini di diametro equivalente è riportata in *Figura 4.2*.

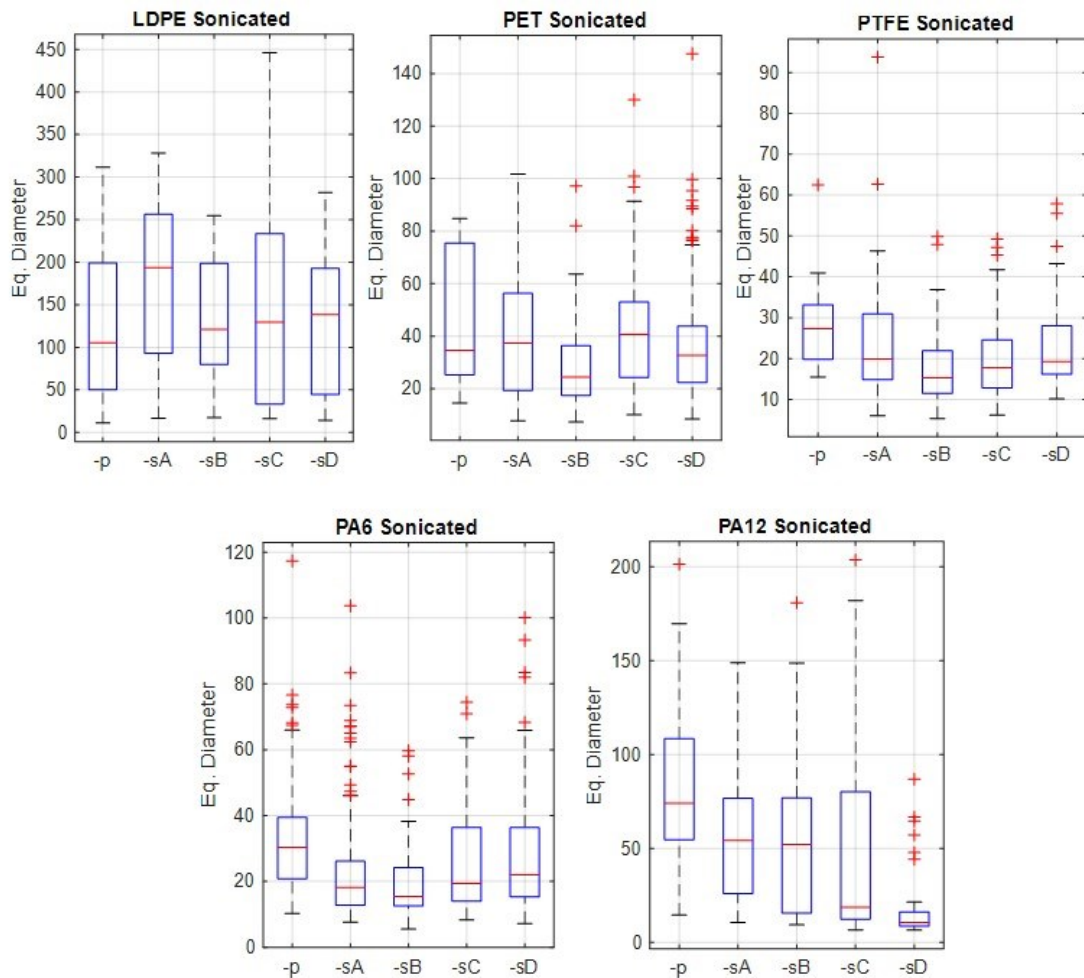


Figura 4.2 Dimensioni delle microparticelle di plastica ai vari step di trattamento mediante sonicazione espresse in diametro equivalente.

Osservando la figura si nota, innanzitutto, che le dimensioni delle microplastiche di partenza variano in base al tipo di polimero e che i campioni forniti dai produttori sono abbastanza polidispersi. In particolare, LDPE e PA12 hanno una distribuzione iniziale con mediana intorno ai 100 e 70 µm rispettivamente, mentre PA6, PET e PTFE intorno a 30 µm. A seguito del trattamento, i campioni le cui dimensioni hanno risentito maggiormente sono PA12 e PA6, per le quali si osserva sia la diminuzione del valore della mediana che uno spostamento a valori minori dei box per il 25-esimo e 75-esimo percentile, rispetto al campione contenente le particelle non trattate. Le particelle di PTFE hanno anch'esse subito una variazione nella loro distribuzione dimensionale, sebbene in maniera molto meno marcata delle precedenti. Per PTFE, i box del 25-esimo e 75-esimo percentile non si ampliano significativamente lungo la serie e la mediana si assesta vicino a 20 µm già dopo circa due ore di trattamento. Nel caso di LDPE e PET,

invece, anche la frazione più invecchiata mantiene una distribuzione dimensionale simile al campione originale, così come l'estensione dei box per il 25-esimo e 75-esimo percentile.

Come si osserva in *Figura 4.3*, dove i valori di AR sono riportati utilizzando diagrammi *boxplot* per le diverse frazioni, la sonicazione non ha portato in nessun caso ad evidenti cambiamenti della forma delle particelle.

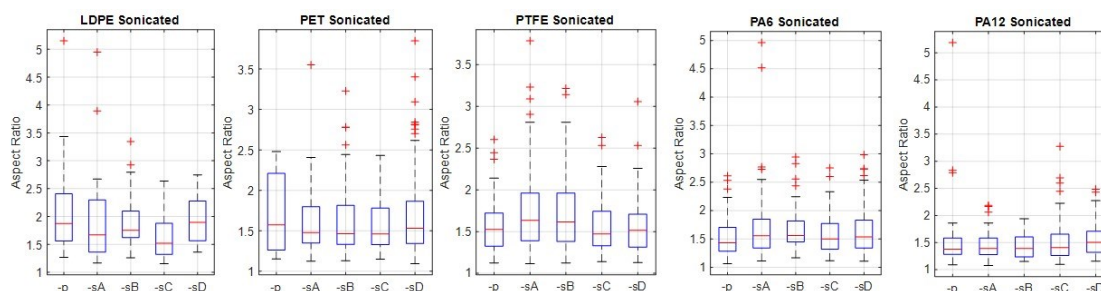


Figura 4.3 Aspect ratio delle microparticelle di plastica ai vari step di trattamento mediante sonicazione.

Ulteriori informazioni riguardanti la morfologia delle particelle sono ricavabili dalle immagini raccolte al SEM per i campioni iniziali (-p) e per quelli di fine trattamento (-sD), riportate in *Figura 4.4-4.12*.

In accordo con quanto osservato dai diagrammi *boxplot*, PA12 è il campione di microplastiche che ha subito un maggiore impatto dal trattamento (*Figura 4.4*). Le microplastiche di partenza (*Figura 4.4A-D*) non sono particolarmente lisce e presentano in diverse zone delle crepe che potrebbero aver velocizzato il processo di degradazione. Come si osserva in *Figura 4.4F*, alcune particelle di PA12-sD sono spezzate, indicato dal fatto che la superficie nella zona di rottura è molto più liscia rispetto alla parte esterna, sottoposta ad uno stress maggiore.

Un altro aspetto particolare è la presenza di un numero elevato di fibre rispetto al campione di partenza, alcune foto del network sono riportate in *Figura 4.5*. L'analisi della composizione elementare delle fibre riportata in *Figura 4.6*, una volta esclusi i contributi del substrato (Al) e dell'oro (Au) usato per metallizzare il campione, conferma la presenza di solo carbonio (C) ed ossigeno (O). Malgrado questo non possa confermare che si tratti proprio di PA12, può certamente escludere qualsiasi altro contaminante di tipo inorganico. Le ragioni di uno sviluppo tanto notevole di fibre per il campione PA12

a seguito di sonicazione (*Figura 4.5*) non è stato approfondito e sarà probabilmente oggetto di indagine in un prossimo futuro.

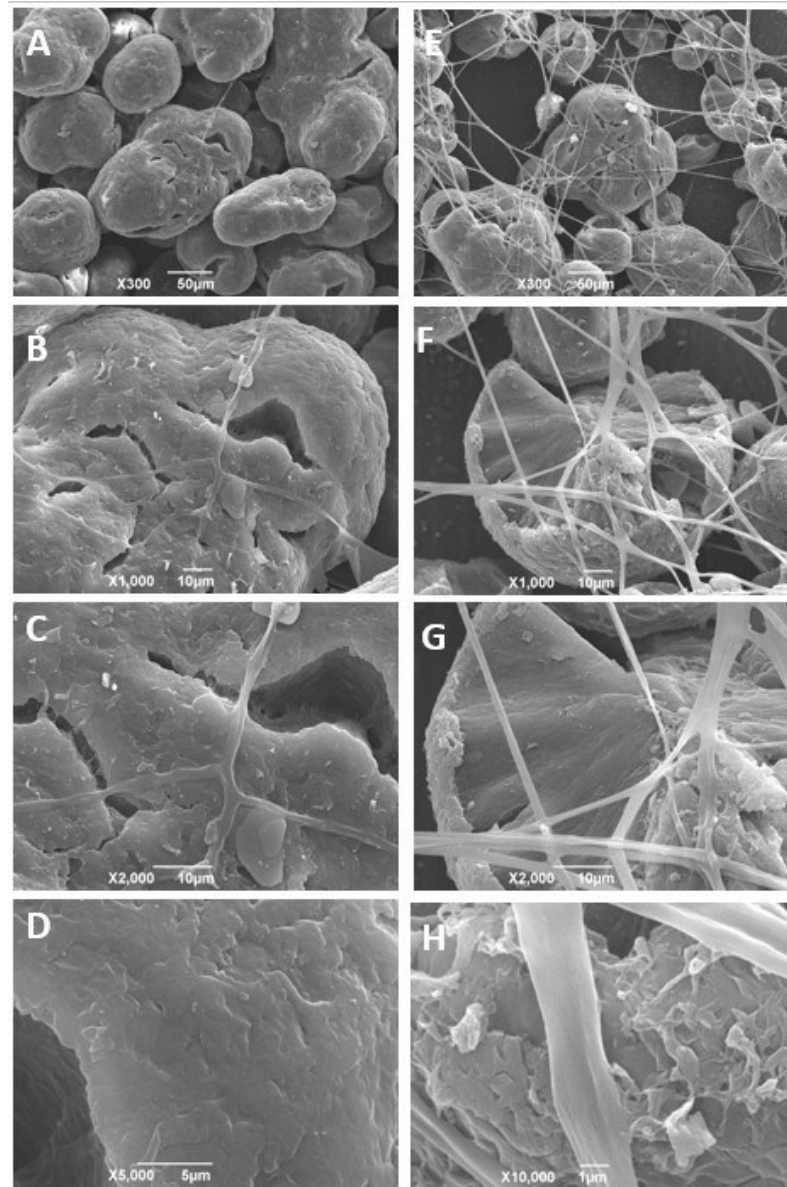


Figura 4.4 Immagini SEM di PA12 a diversi ingrandimenti. A sinistra (**A-D**) PA12-p, a destra (**E-H**) PA12-sD.

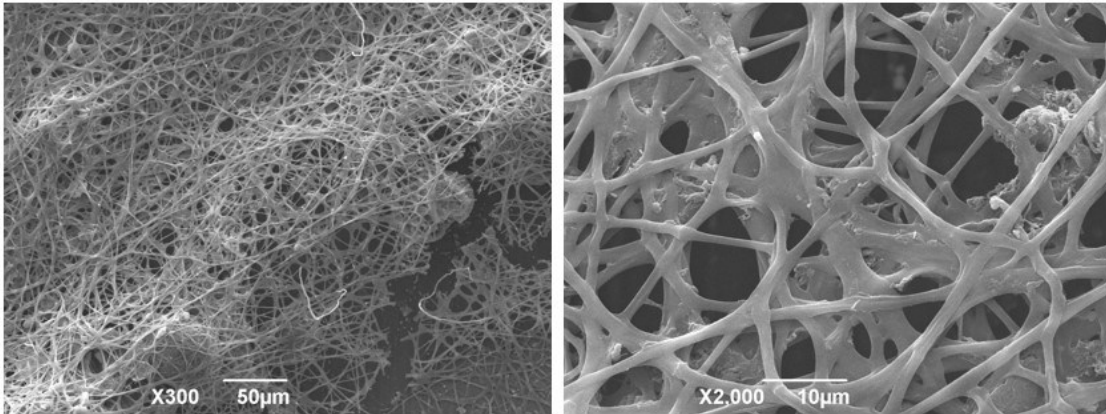


Figura 4.5 Immagini SEM delle fibre di PA12-sD a diversi ingrandimenti.

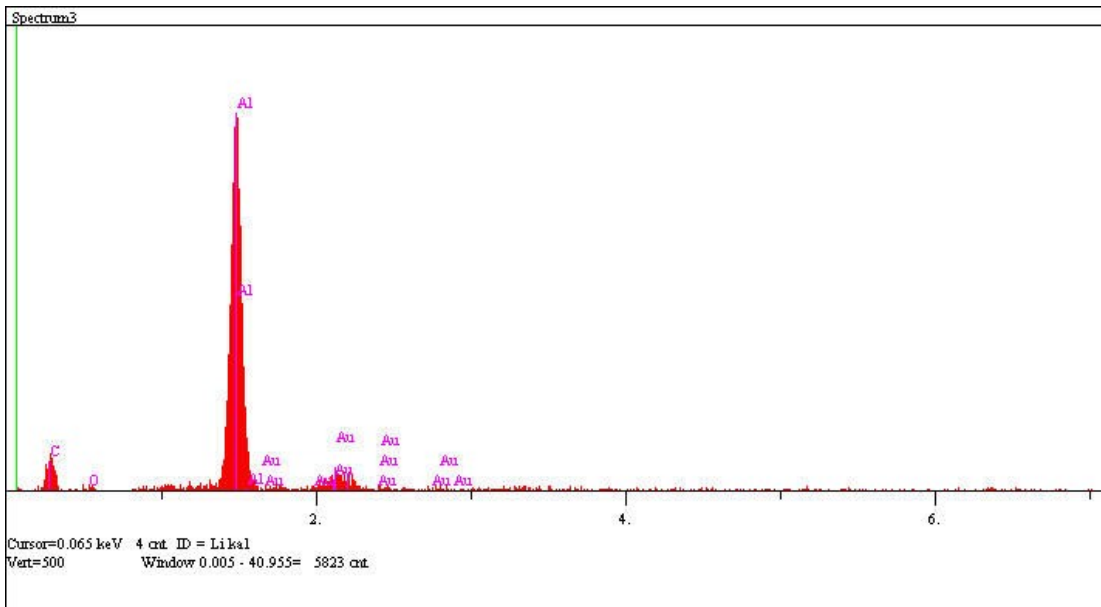


Figura 4.6 Composizione elementare di una fibra di PA12-sD ottenuta con SEM-EDS.

Nel caso delle immagini SEM per PA6 (*Figura 4.7*), nonostante i precedenti grafici suggeriscano un grado di degradazione simile a quello di PA12, non si notano particolari cambiamenti della struttura della superficie. Le particelle di PA6-p hanno però diverse protuberanze che potrebbero essersi facilmente staccate durante il trattamento, originando così i frammenti più piccoli trovati nei campioni invecchiati. Alla luce della analisi SEM, si direbbe che il trattamento per sonicazione abbia uniformato la superficie delle particelle di PA6.

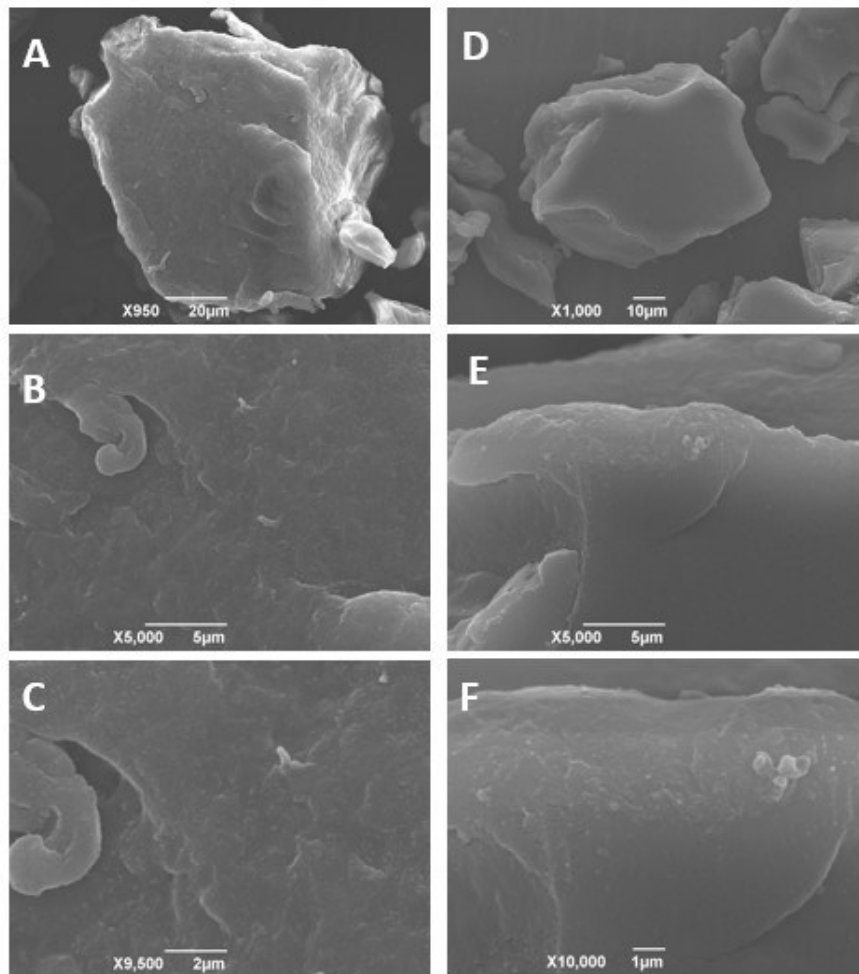


Figura 4.7 Immagini SEM di PA6 a diversi ingrandimenti. A sinistra (**A-C**) PA6-p, a destra (**D-F**) PA6-sD.

In accordo con i diagrammi *boxplot*, LDPE (*Figura 4.8*) non mostra particolari cambiamenti sulla superficie, che sembra non essere stata impattata dal trattamento. L'unica differenza è la presenza di piccoli cristalli (ben visibili in *Figura 4.8H*). È possibile che essi siano dovuti ad una concentrazione maggiore di BSA nella soluzione rispetto agli altri campioni di microplastiche. Una quantità maggiore di BSA è giustificata dal fatto che, considerata la bassa densità dell'LDPE, la rimozione della soluzione di BSA, prima della dispersione delle particelle in acqua, è stata fatta con maggiore cautela rispetto agli altri campioni in modo da mantenere un quantitativo più alto possibile di microplastiche all'interno della *vial*.

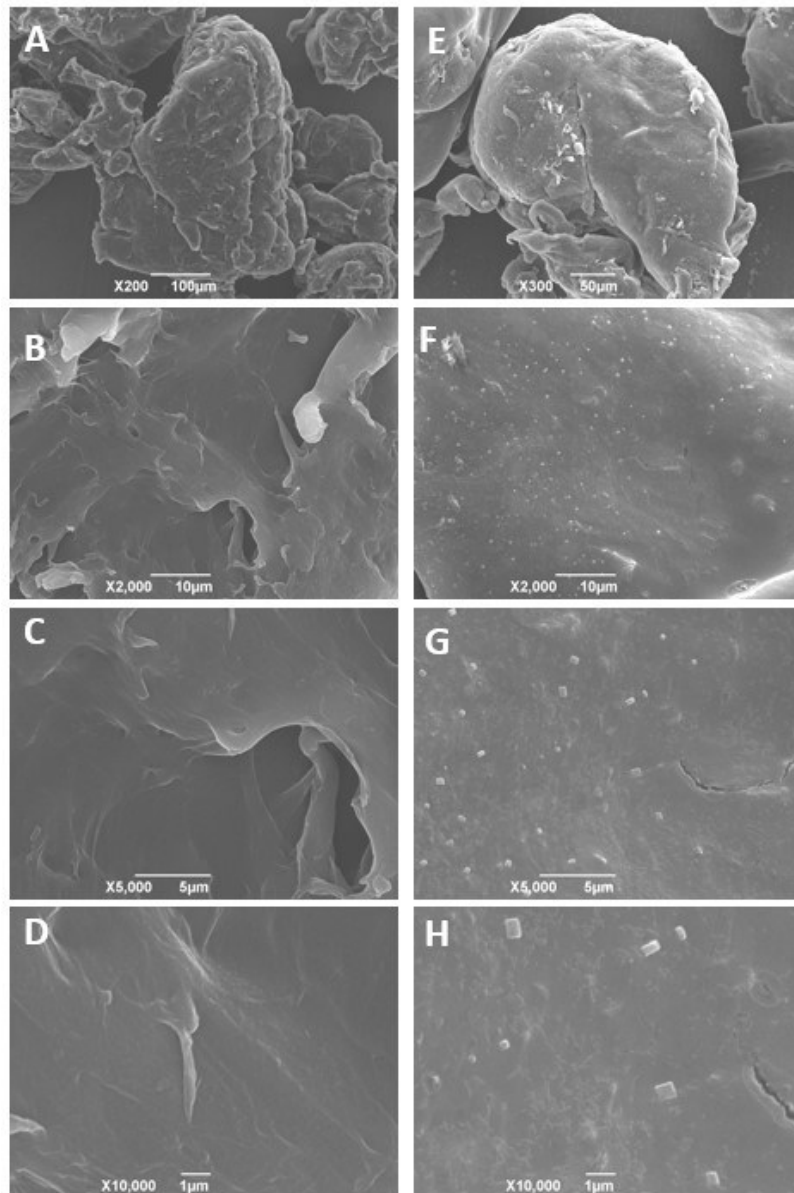


Figura 4.8 Immagini SEM di LDPE a diversi ingrandimenti. A sinistra (**A-D**) LDPE-p, a destra (**E-H**) LDPE-sD.

Anche per il PET non si osservano cambiamenti troppo evidenti se non per la comparsa in alcune zone di irregolarità superficiali che si riescono a notare solamente ad elevati ingrandimenti. In *Figura 4.9H* si vedono sulla superficie piccoli rilievi ed avvallamenti, tali da indurre a concludere che il trattamento per sonicazione abbia solamente introdotto una maggiore rugosità superficiale. Si potrebbe altresì ipotizzare che queste asperità indotte possano costituire una chiara fonte di nanoplastiche, nel momento in cui vengano a distaccarsi dalla microparticella “madre”.

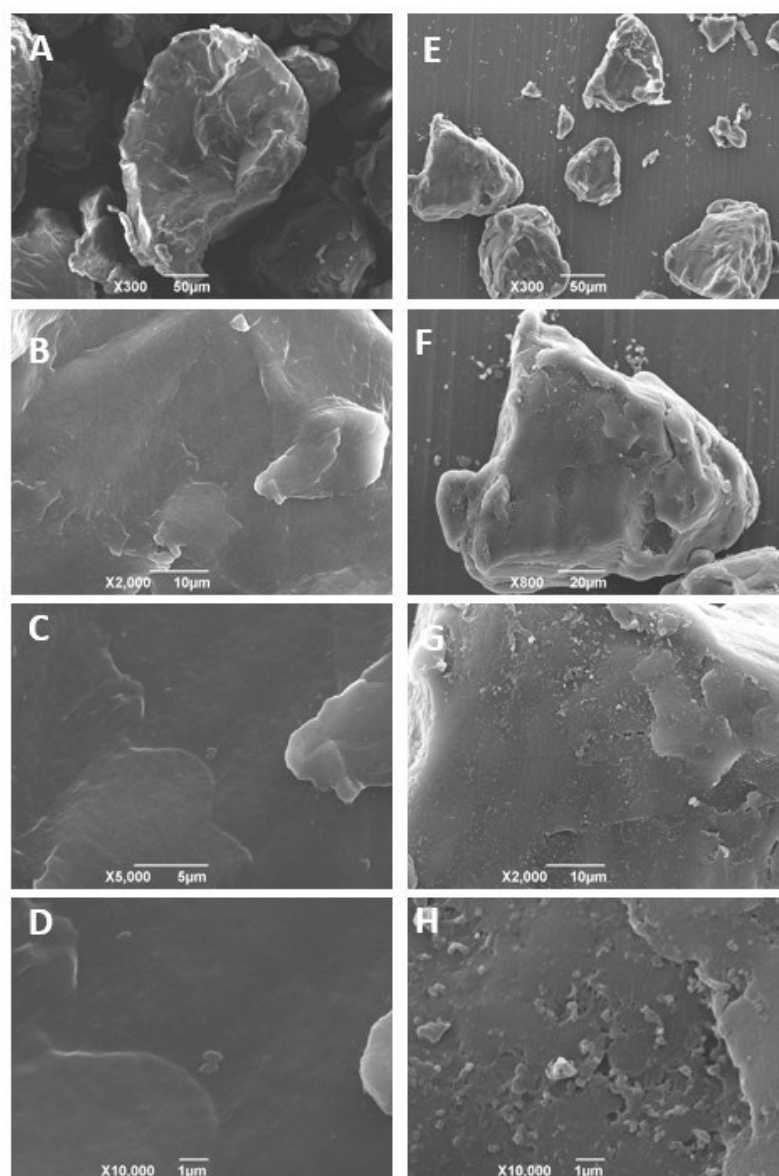


Figura 4.9 Immagini SEM di PET a diversi ingrandimenti. A sinistra (A-D) PET-p, a destra (E-H) PET-sD.

La plastica che ha dato risultati più inaspettati al SEM, rispetto a quanto visto nei grafici *boxplot*, è il PTFE. Nonostante le dimensioni delle microparticelle non sembrano cambiate di molto, anche in questo caso, così come per la PA12, in seguito alla sonicazione si è formata una fitta rete di fibre riportata sia in *Figura 4.10E-F* che in *Figura 4.11*. L'analisi della composizione elementare delle fibre riportata in *Figura 4.12* conferma che sono fibre di PTFE in quanto composte da carbonio (C), ossigeno (O) e fluoro (F). È importante sottolineare che, data la tendenza delle particelle di PTFE ad impaccarsi a causa della loro spiccata idrofobicità, è possibile che le dimensioni ricavate dalle foto raccolte al microscopio ottico non siano veritiere. Si nota, infatti, in *Figura 4.10F-G* la tendenza delle particelle, soprattutto quelle più piccole, a formare degli agglomerati impossibili da notare usando un microscopio ottico.

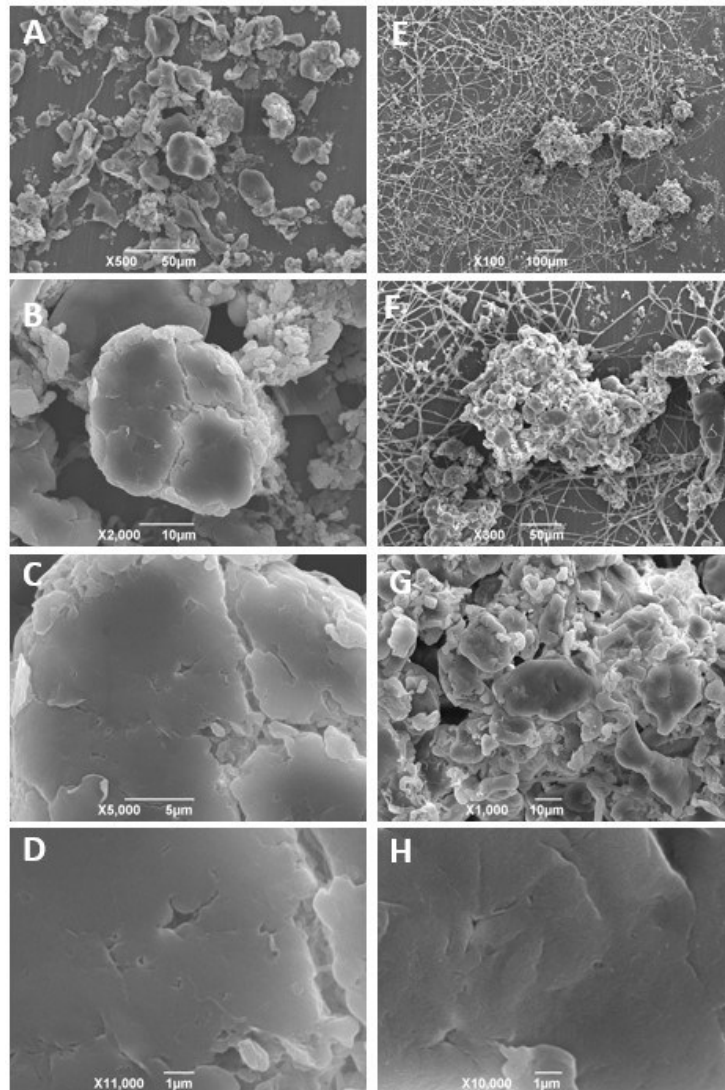


Figura 4.10 Immagini SEM di PTFE a diversi ingrandimenti. A sinistra (A-D) PTFE-p, a destra (E-H) PTFE-sD.

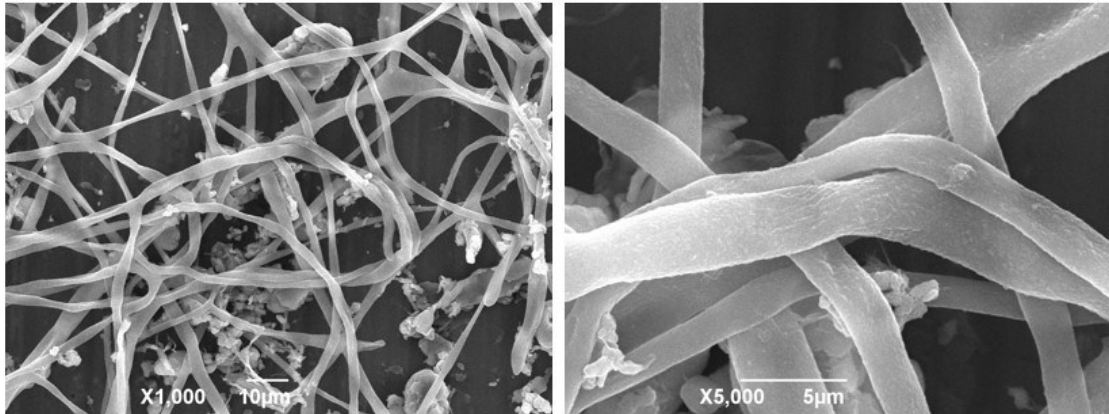


Figura 4.11 Immagini SEM delle fibre di PTFE a diversi ingrandimenti.

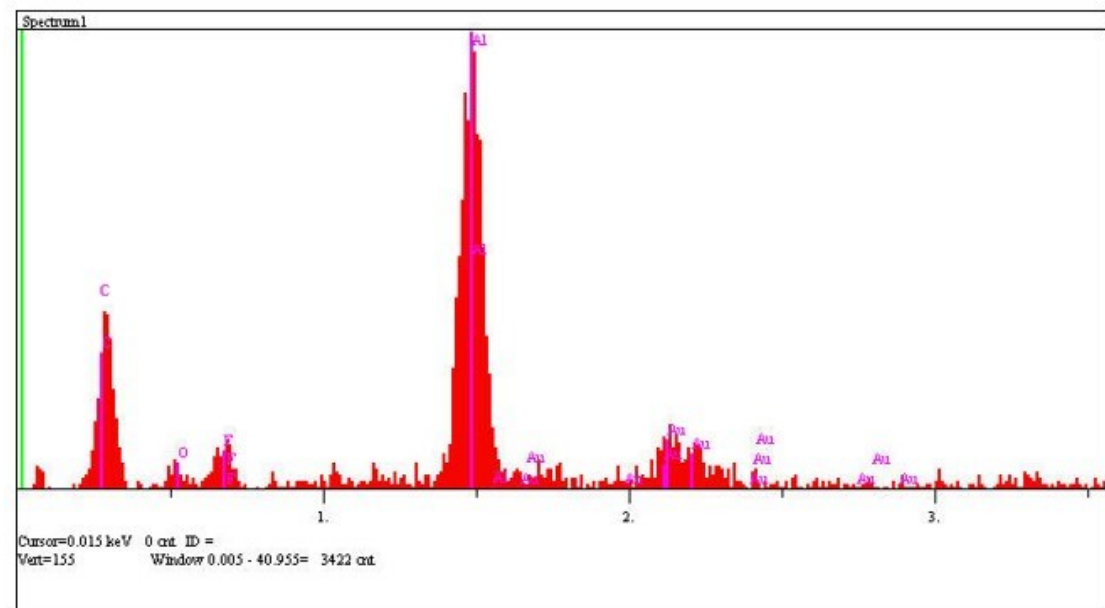


Figura 4.12 Composizione elementare di una fibra di PTFE-sD ottenuta con SEM-EDS.

Come mostrato in *Figura 4.13*, gli spettri Raman raccolti a diversi stadi di invecchiamento per sonicazione rimangono per lo più invariati rispetto alle microplastiche di partenza. Contrariamente a ciò che succede per gli spettri IR, non si osserva né la scomparsa né l'apparizione di picchi.⁴³⁻⁴⁵ Un comportamento simile era già stato osservato in precedenza da Cai *et al.* per polietilene, polipropilene e polistirene.⁴⁸ Per valutare l'entità di eventuali cambiamenti negli spettri Raman, in *Figura 4.13* sono stati plottati per ciascun campione lo spettro medio in nero con la propria deviazione standard in rosso. Quest'ultima permette di evidenziare le porzioni di spettro che sono caratterizzate da una maggiore variabilità all'interno di ciascuna serie. Le principali differenze tra le diverse serie di spettri si osservano nei picchi meno intensi che, soprattutto per particelle piccole, tendono a confondersi con il rumore. In tutti i casi, le porzioni di spettro maggiormente soggette a variabilità sono quelle vicino a 1200 cm^{-1} e a *Raman shift* superiori a 2000 cm^{-1} .

È importante notare che in tutti i casi la maggior parte dei picchi rimane ben visibile anche per la frazione di microplastiche maggiormente invecchiate, questo sta a significare che utilizzando la spettroscopia Raman è teoricamente possibile riconoscere facilmente le microplastiche ambientali, soprattutto se ci si concentra sui picchi che dimostrano minor variabilità, ovvero quelli con una deviazione standard minore in *Figura 4.13*.

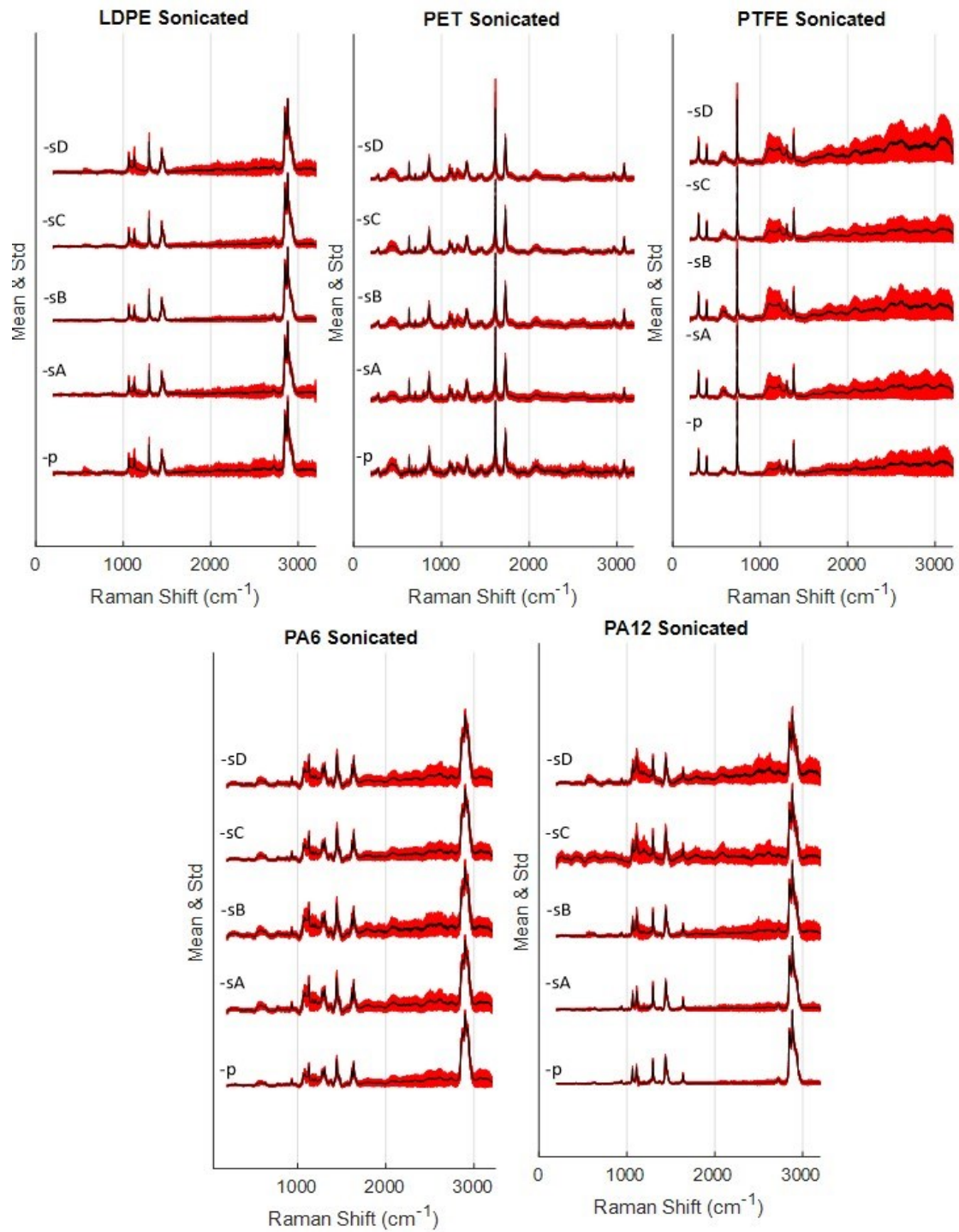


Figura 4.13 Spettri medi con deviazione standard dei diversi campioni di microplastica sonicati.

I principali picchi per i diversi tipi di microplastica, ovvero quelli che sono ben visibili in tutti gli stadi di invecchiamento, sono riportati nelle *Tabelle 4.1-4.5*. In particolare, si evidenziano quelli che possono essere meglio utilizzati per il riconoscimento anche di plastiche invecchiate.

Tabella 4.1 Assegnazione picchi Raman PA12.

Raman shift (cm ⁻¹)	Legame coinvolto	Tipo di vibrazione	Intensità	Riferimento
2883	C-H ₂	Stretching simmetrico	Alta	49
2848	C-H ₂	Stretching simmetrico	Alta	49
1635	-CONH-	Ammide I (C=O + deformazione N-H)	Media	49,50
1437	C-H ₂	Bending	Media	49,50
1372	C-H ₂	Wagging	Bassa	49
1296	C-H ₂	Twisting	Media	49
1109	C-C	Stretching simmetrico	Media	49
1064	C-C	Stretching	Media	49
938	C-CO	Stretching	Bassa	49

Tabella 4.2 Assegnazione picchi Raman PA6.

Raman shift (cm ⁻¹)	Legame coinvolto	Tipo di vibrazione	Intensità	Riferimento
2927	C-H ₂	Stretching asimmetrico	Alta	49
2901	C-H ₂	Stretching simmetrico	Alta	49
2876	C-H ₂	Stretching simmetrico	Alta	49
1635	-CONH-	Ammide I (C=O stretching + deformazione N-H)	Media	49,50
1614	C=O	Stretching	Media	
1445	C-H ₂	Bending	Media	49,50
1308	C-H ₂	Twisting	Media	49
1279	-CONH-	Ammide III (C-N stretching + C=O bending nel piano)	Media	49
1126	C-C	Stretching all-trans	Media	49
1080	C-C	Stretching gauche	Media	49
1063	C-C	Stretching all-trans	Media	49
931	C-CO	Stretching	Bassa	49

Il picco a 1614 cm⁻¹ viene costantemente rinvenuto nei campioni di PA6, malgrado non sia stata riscontrata nessuna corrispondenza dall'analisi di letteratura. È noto che in quella zona siano generalmente presenti i segnali ascrivibili agli stretching del carbonile, ma rimane incerto se questi siano a carico del polimero PA6 o di eventuali additivi.

Tabella 4.3 Assegnazione picchi Raman LDPE.

Raman shift (cm ⁻¹)	Legame coinvolto	Tipo di vibrazione	Intensità	Riferimento
2882	C-H ₂	Stretching asimmetrico	Alta	50
2848	C-H ₂	Stretching simmetrico	Alta	50
1459	C-H ₂	Scissoring	Media	50,51
1439	C-H ₂	Scissoring	Media	50,51
1417	C-H ₂	Wagging	Bassa	50,51
1296	C-H ₂	Twisting	Alta	50,51
1128	C-C	Stretching	Media	50,51
1062	C-C	Stretching	Media	50,51

Tabella 4.4 Assegnazione picchi Raman PET.

Raman shift (cm ⁻¹)	Legame coinvolto	Tipo di vibrazione	Intensità	Riferimento
3086	C-H _(Ar)	Stretching	Bassa	50,52,53
1726	C=O	Stretching*	Media	52,53
1615	C ₆ H ₆	Stretching simmetrico	Alta	50,52,53
1450	C-H ₂ in -OCH ₂ CH ₂ O-	Bending	Bassa	53
1289	C(O)-O	Stretching	Media	50,53
1181	C-H _(Ar) e C-C _(Ar)	Stretching	Bassa	50,53
1098	C(O)-O	Stretching	Media	50,53
854	C-H ₂ in -OCH ₂ CH ₂ O-	Stretching	Media	50
632	<i>p</i> -C ₆ H ₆	Stretching	Media	50

*alla banda contribuiscono 3 picchi: 1721+1735 (PET amorfo) e 1726 (PET cristallino).

Tabella 4.5 Assegnazione picchi Raman PTFE.

Raman shift (cm ⁻¹)	Legame coinvolto	Tipo di vibrazione	Intensità	Riferimento
1383	C-C	Stretching	Media	54
1306	C-C	Stretching	Bassa	54
1219	C-F ₂	Stretching asimmetrico	Bassa	54
736	C-F ₂	Stretching simmetrico	Alta	54
388	C-F ₂	Bending	Media	54
293	C-F ₂	Wagging	Media	54

Un modello ampiamente utilizzato per valutare la corrispondenza tra uno spettro incognito ed uno di riferimento è la correlazione di Pearson. Questa è un'analisi multivariata che si basa sul valutare la correlazione lineare tra due vettori, assegnando infine un punteggio da -1 per una perfetta anti-correlazione, 0 in caso di nessuna correlazione e +1 in caso di perfetta correlazione lineare.

Quindi, la somiglianza di ciascuno spettro ottenuto dai campioni di microplastiche variamente invecchiate, con lo spettro di riferimento della relativa microplastica non invecchiata, può essere valutata utilizzando la correlazione di Pearson dove l'indice R è pari a 1 per spettri identici ed ha un valore progressivamente tendente a 0 per spettri sempre meno somiglianti a quello di riferimento.

In *Figura 4.14* si osserva che i valori di R sono generalmente superiori a 0.8 per tutti i campioni. Ciò sta ad indicare una buona correlazione ed il fatto che i polimeri non vengono interessati in modo esteso dal trattamento, a conferma di quanto si nota in *Figura 4.13* e dalle precedenti considerazioni morfologiche. Per i polimeri PA6, LDPE e PET si possono altresì apprezzare alcuni casi in cui i valori di R sono particolarmente bassi, tanto che l'algoritmo per il calcolo dei *boxplot* li identifica come *outliers* (*Figura 4.14*).

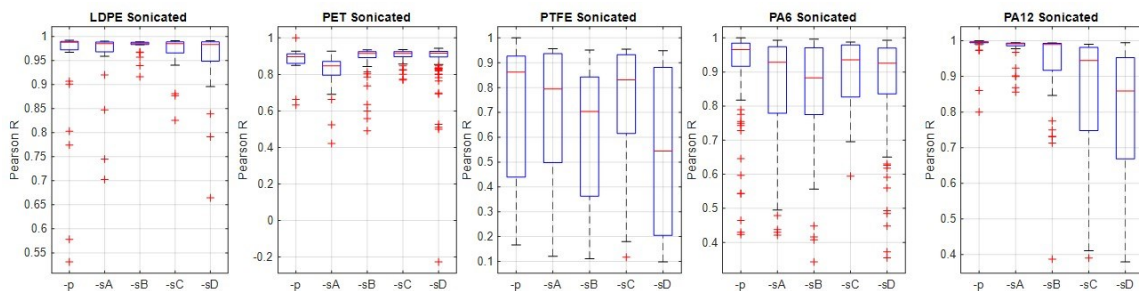


Figura 4.14 Boxplot dei valori degli indici R di correlazione di Pearson delle microplastiche ai vari step di trattamento mediante sonicazione.

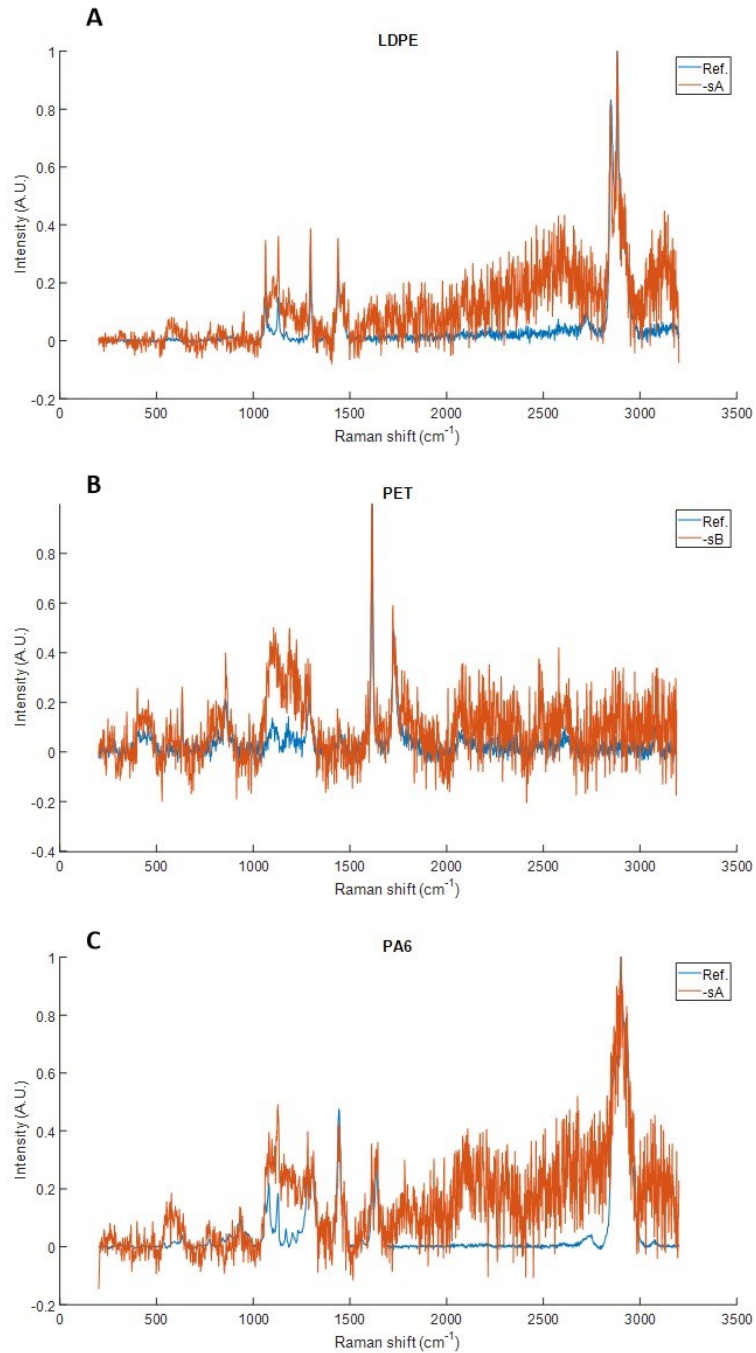


Figura 4.15 Spettri Raman normalizzati di outliers (Figura 4.14) di LPDE (A), PET (B) e PA6 (C) a confronto con i rispettivi spettri di riferimento.

In Figura 4.15 vengono presentati alcuni di questi a titolo di esempio, la loro classificazione come *outliers* deriva da una imprecisa linea di base, che induce a confondere i segnali del polimero con quelli causati dal rumore. È importante far presente, inoltre, che le particelle da cui derivano gli spettri riportati in Figura 4.15 sono tra le più piccole analizzate di ciascun campione, ed è quindi la minor quantità di materia

su cui è stata effettuata la misura la causa del loro spettro con un peggior rapporto segnale/rumore.

Tra tutte le microplastiche, il PTFE è quello che in qualsiasi frazione di invecchiamento correla in modo peggiore con lo spettro di riferimento. Questo comportamento è probabilmente dovuto all'elevata variabilità della linea di base a *Raman shift* superiori a 2000 cm^{-1} (Figura 4.13). Alla lunghezza d'onda utilizzate per l'analisi Raman, 633 nm, il PTFE mostra una certa emissione in fluorescenza, come si può apprezzare dall'elevato background in Figura 4.16, il che rende meno riproducibile il calcolo e la sottrazione della linea di base.

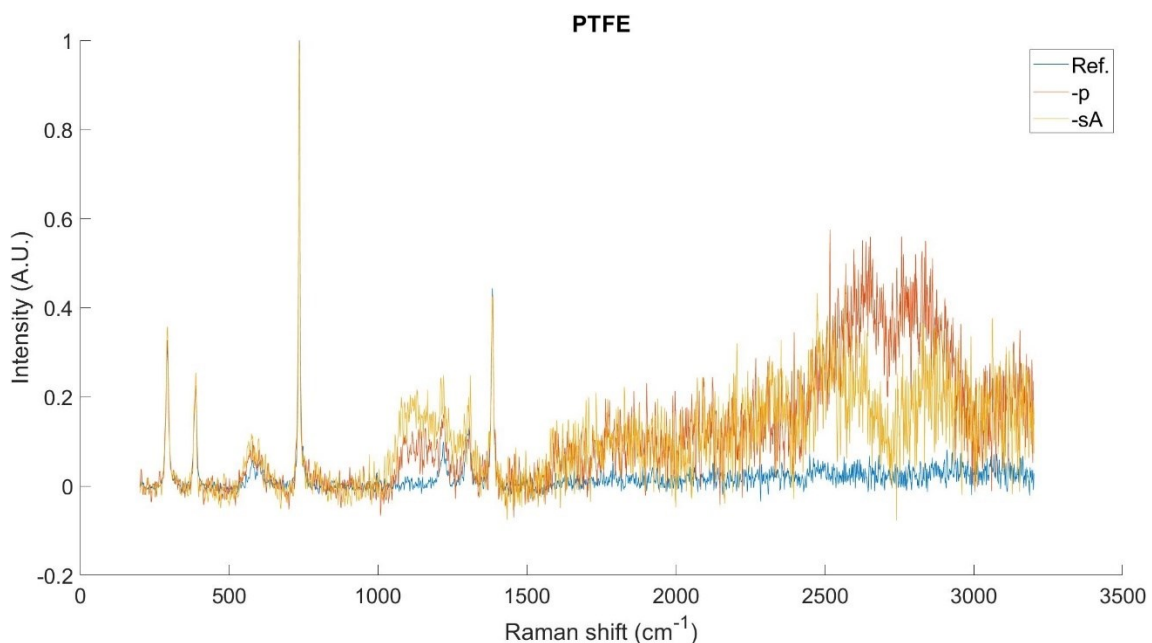


Figura 4.16 Spettri Raman normalizzati di alcune microparticelle di PTFE a confronto con il riferimento.

In aggiunta, è possibile notare dalla Figura 4.17 che i valori di R più bassi si osservano generalmente per particelle più piccole, che danno segnali meno intensi e quindi caratterizzati da un peggior rapporto segnale/rumore, come era già stato fatto notare in precedenza (Figura 4.15).

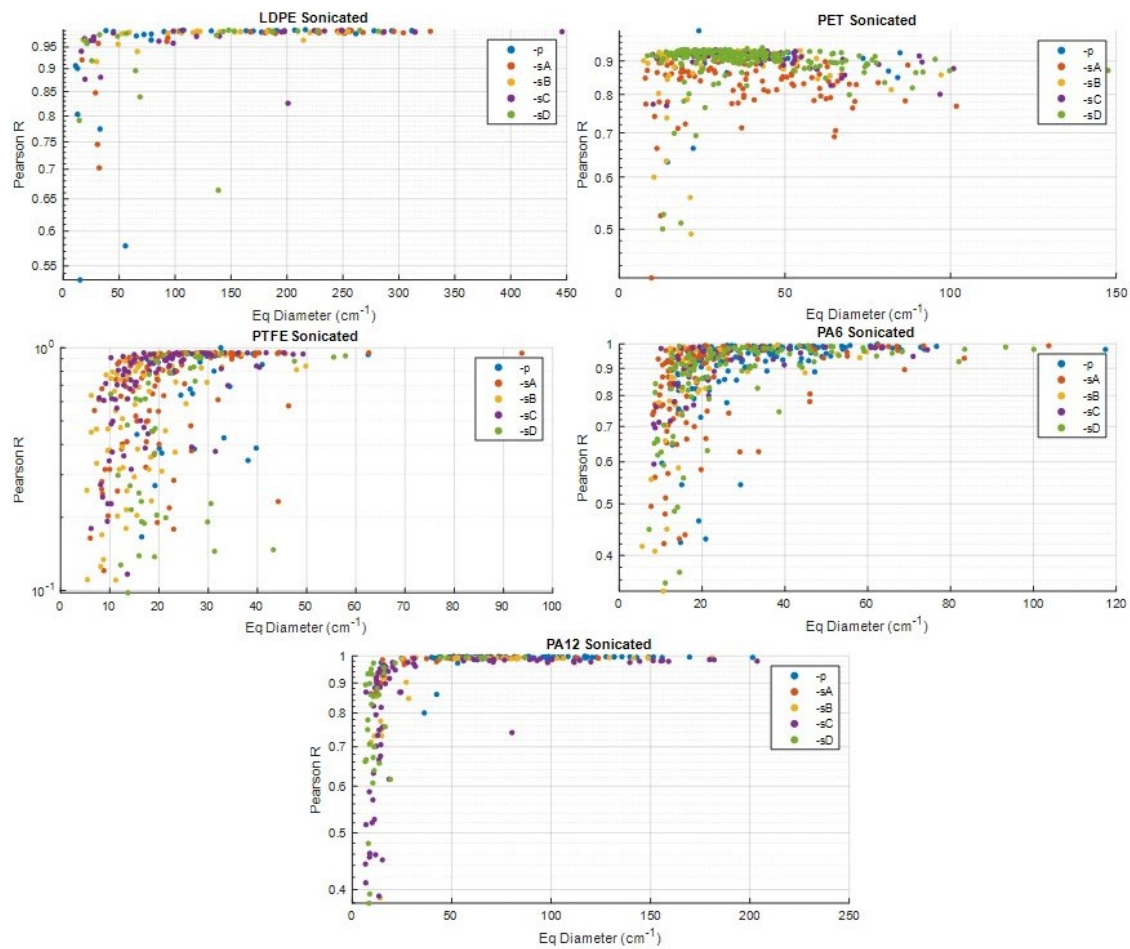


Figura 4.17 Scatter dei valori degli indici R di correlazione di Pearson delle microplastiche ai vari step di trattamento mediante sonicazione.

4.1.2 Fotodegradazione

Gli studi finora effettuati sull'invecchiamento delle plastiche riportati in letteratura hanno portato alla conclusione che la loro degradazione avvenga principalmente attraverso cambiamenti indotti dalla radiazione UV: fotoni di energia elevata permettono la formazione di specie radicaliche che vanno ad attaccare la struttura del polimero, avviandone la degradazione.^{6,55-57} Le regioni UV-C (100-280 nm) e buona parte di quella UV-B (280-315 nm) della radiazione emessa dal sole, tuttavia, non sono in grado di raggiungere la superficie terrestre perché assorbite da diversi composti atmosferici (Figura 4.18).⁴² Di conseguenza, solamente una piccola frazione di radiazione UV, la meno energetica, è responsabile dell'invecchiamento delle microplastiche disperse nell'ambiente.

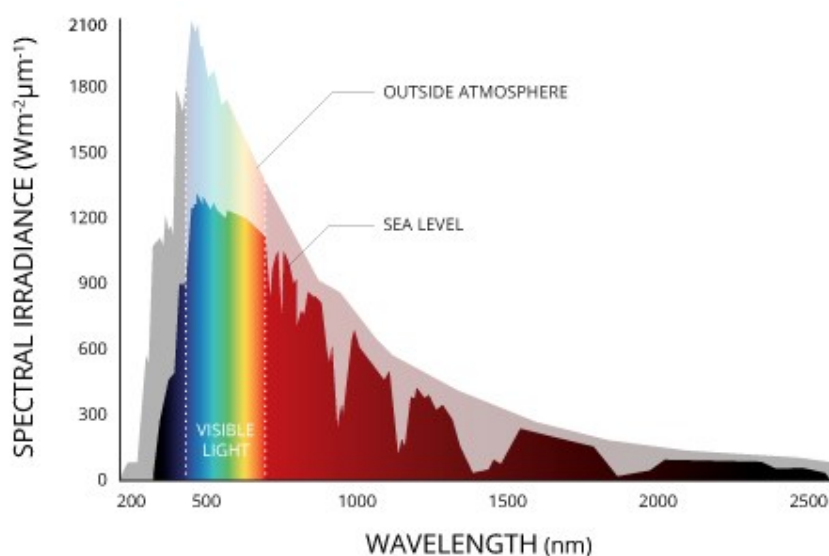
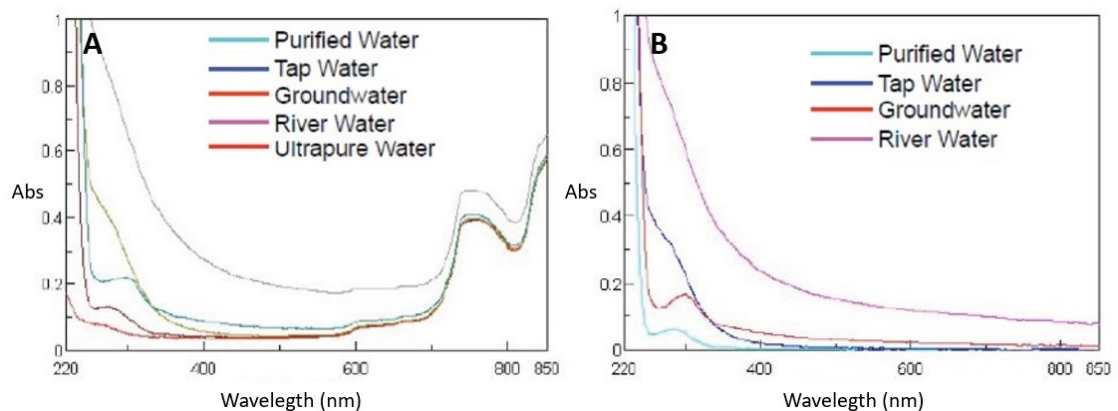


Figura 4.18 Confronto tra l'Irradianza solare all'esterno dell'atmosfera terrestre e sul livello del mare.

In letteratura si trovano numerosi esempi di degradazione accelerate di plastiche che sfruttano lampade con emissione altamente energetica nella zona UV-C, e sostanze capaci di dissociare in un gran numero di specie radicaliche altamente ossidanti. Alcuni esempi sono H_2O_2 nel trattamento Fenton, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e KHSO_5 .⁵⁸⁻⁶¹ I risultati ottenuti in questo modo sono sempre ottimi in termini di degradazione delle plastiche trattate, ma sfruttano delle condizioni molto diverse da quelle in cui avviene la degradazione in natura.

Per simulare in modo quanto più fedele possibile i processi che avvengono nell'ambiente, in questo lavoro di tesi è stata impiegata una lampada allo Xenon, che mima la frazione dello spettro solare che riesce a raggiungere la superficie terrestre. La potenza della lampada è stata impostata come equivalente a circa dieci volte l'irradianza solare, in modo da simulare in breve tempo l'effetto che il sole causerebbe in un periodo molto più lungo. 24 ore di trattamento nelle condizioni utilizzate qui in seguito è stato calcolato equivalere a circa 276 ore di irraggiamento solare a livello della superficie terrestre. Il dettaglio su come è stata calcolata la fluenza di irraggiamento del campione viene riportato nella sezione dei Metodi, al capitolo 3.2.1. Il setup sperimentale viene presentato nel capitolo 2.2 in *Figura 2.2*. La lampada allo Xenon viene focalizzata mediante lenti sulla superficie di una cuvetta di quarzo sorretta da un supporto prodotto per stampa 3D e posta in rotazione continua. Questo garantisce un mescolamento del campione ed un irraggiamento omogeneo di tutte le microplastiche contenute nella cuvetta, malgrado la superficie irraggiata corrisponda ad un'area circolare di diametro pari a 1 cm. Inoltre, essendo lo scopo valutare l'invecchiamento delle microplastiche in ambiente acquoso, l'utilizzo della lente in vetro garantisce un effetto di filtro della radiazione inferiore ai 330 nm, simulando quanto accadrebbe per microplastiche a varia profondità in una colonna d'acqua, come si può osservare dagli spettri UV-Vis riportati in *Figura 4.19*.⁶²



*Figura 4.19 Spettri UV-Vis di diversi tipi di acqua (A) e spettri UV-Vis di diversi tipi di acqua corretti sottraendo lo spettro dell'acqua ultrapura (B).*⁶²

Come per la sonicazione, anche in seguito a questo trattamento sono stati valutati cambiamenti morfologici e spettrali aliquotando i campioni a tempi di irraggiamento via via crescenti. Le informazioni morfologiche sono riportate in *Figura 4.20-4.26*, mentre quelle spettrali in *Figura 4.27-4.29*.

Le microplastiche le cui dimensioni sono diminuite in modo più evidente sono, anche in questo caso, la PA12 e la PA6. PET e PTFE mantengono costanti le mediane dei loro diametri equivalenti, mentre il LDPE ha un andamento discordante. In quest'ultimo caso i valori anomali degli ultimi due step di invecchiamento sono molto probabilmente dovuti a un quantitativo troppo esiguo di microplastiche analizzate (43 unità per la frazione -iC e 6 per la frazione -iD). Questo è dovuto al fatto che, essendo le particelle di LDPE in media più grosse, e di conseguenza pesanti, a parità di massa pesata nella soluzione iniziale sono state disperse molte meno particelle rispetto agli altri campioni, rendendone più difficile il ritrovamento.

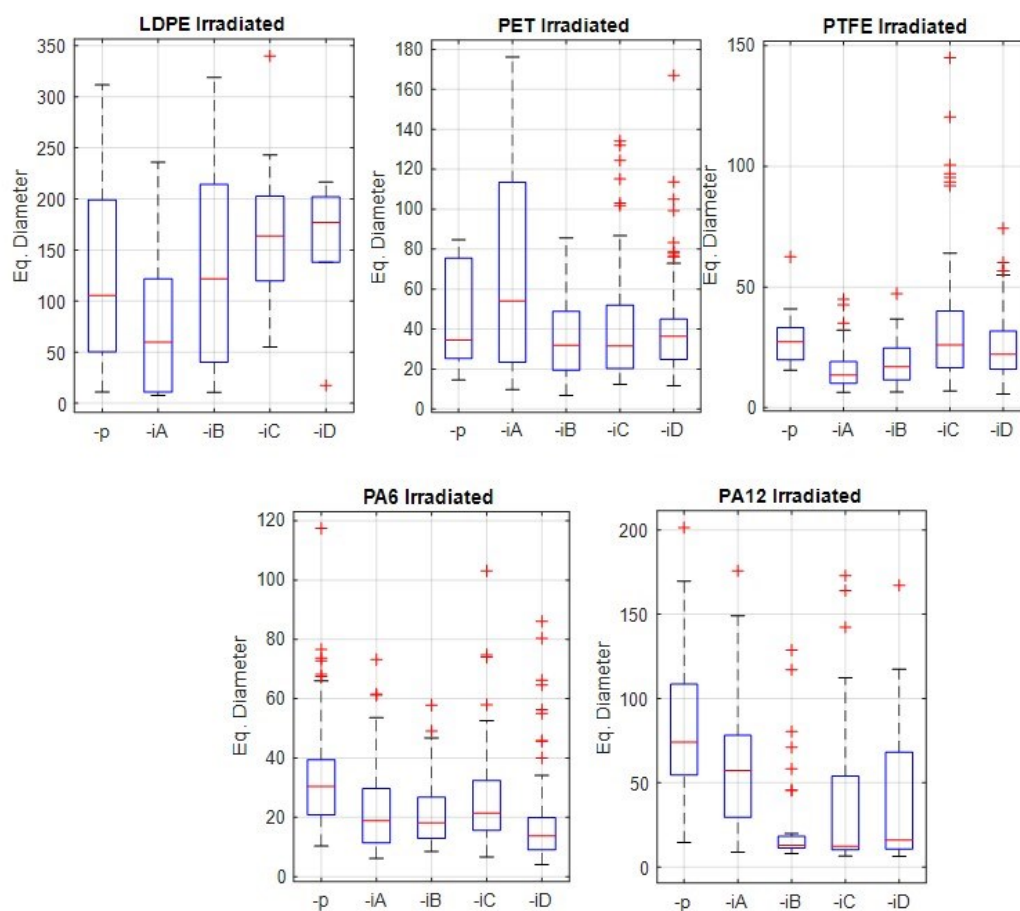


Figura 4.20 Dimensioni delle microparticelle di plastica ai vari step di trattamento mediante irraggiamento espresse in diametro equivalente.

L'aspect ratio (Figura 4.21) è abbastanza costante per tutti i campioni, escludendo l'ultima frazione di LDPE. L'unica microplastica che mostra una leggera variazione è la PA6, la cui mediana per l'AR aumenta col progredire dell'irraggiamento. Malgrado ciò, i box per il 25-esimo e 75-esimo percentile si attestano sempre nella medesima zona, ponendo dei dubbi sulla significatività dell'andamento delle mediane.

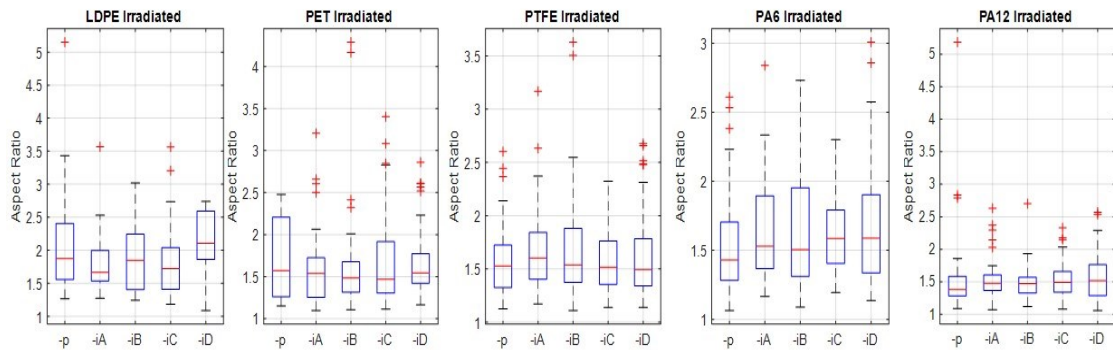


Figura 4.21 Aspect ratio delle microparticelle di plastica ai vari step di trattamento mediante irraggiamento.

Le immagini raccolte al SEM per la PA12 hanno confermato quanto già discusso per la variazione dei diametri equivalenti. Quelle che inizialmente erano delle crepe e fessure abbastanza moderate, nell'ultimo campione sono diventate delle estese cavità, come si può notare in *Figura 4.22*. Contrariamente alla sonicazione, in questo caso non si è verificata la formazione di fibre e ciò dimostra come i due diversi trattamenti agiscano in modo differente sulle microplastiche.

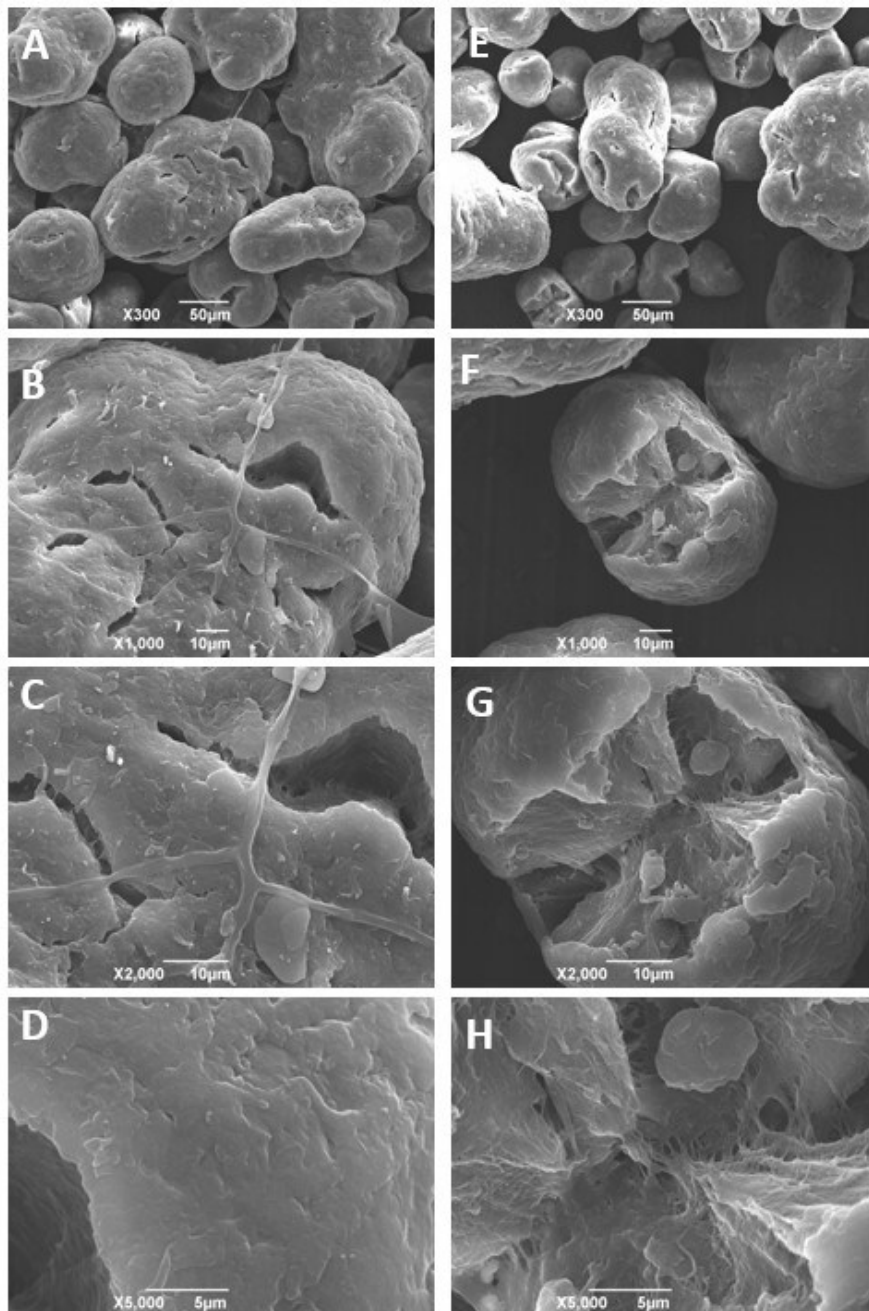


Figura 4.22 Immagini SEM di PA12 a diversi ingrandimenti. A sinistra (A-D) PA12-p, a destra (E-H) PA12-iD.

Le immagini della PA6 hanno evidenziato delle modifiche superficiali delle particelle che appaiono più rugose e irregolari, in questo caso pare che la fotodegradazione abbia avuto un impatto maggiore rispetto alla sonicazione su questo tipo di microplastica. Infatti, si possono notare notevoli cambiamenti superficiali già dall'ingrandimento X5000 (Figura 4.23E) al quale nel caso precedente le particelle risultavano ancora perfettamente lisce (Figura 4.7E).

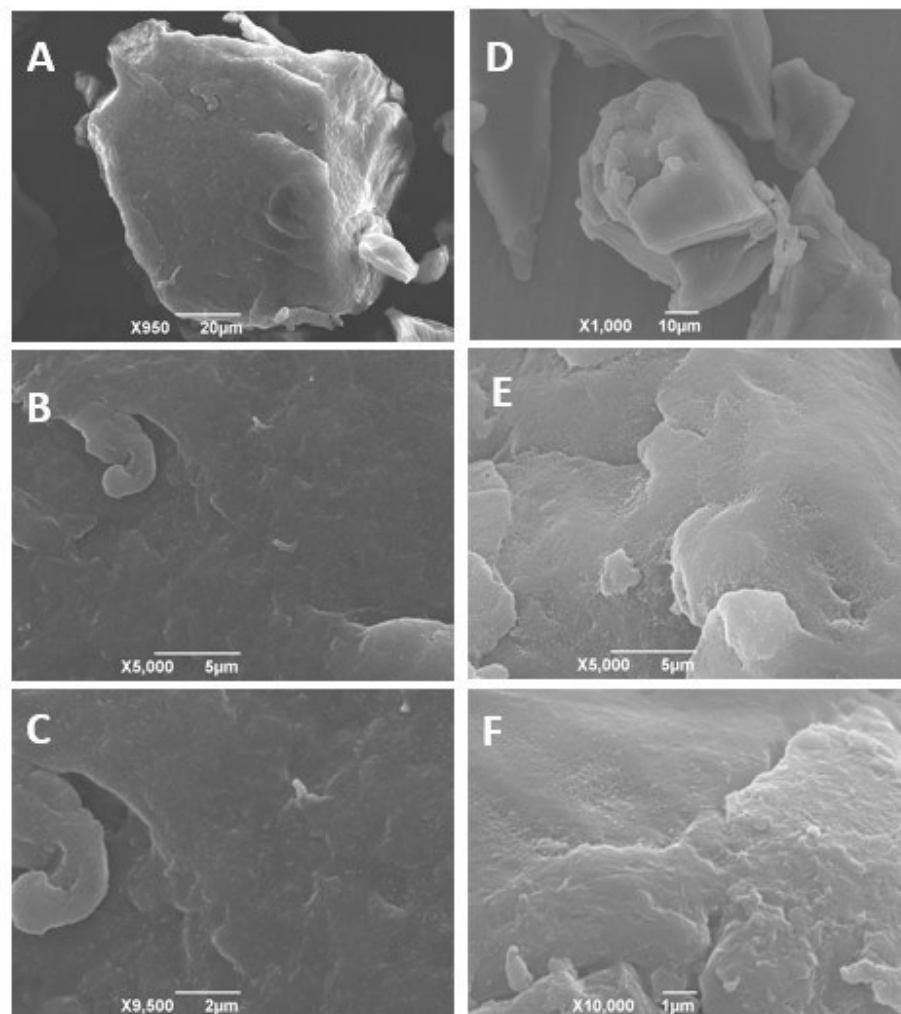


Figura 4.23 Immagini SEM di PA6 a diversi ingrandimenti. A sinistra (A-C) PA6-p, a destra (D-F) PA6-iD.

Le microparticelle di LDPE, anche in questo caso, non sembrano essere state impattate dal trattamento. Così come osservato per la sonicazione, la loro superficie è rimasta abbastanza liscia. Anche in questo caso, come nella precedente *Figura 4.8*, si osservano dei piccoli cristalli depositati sulla superficie.

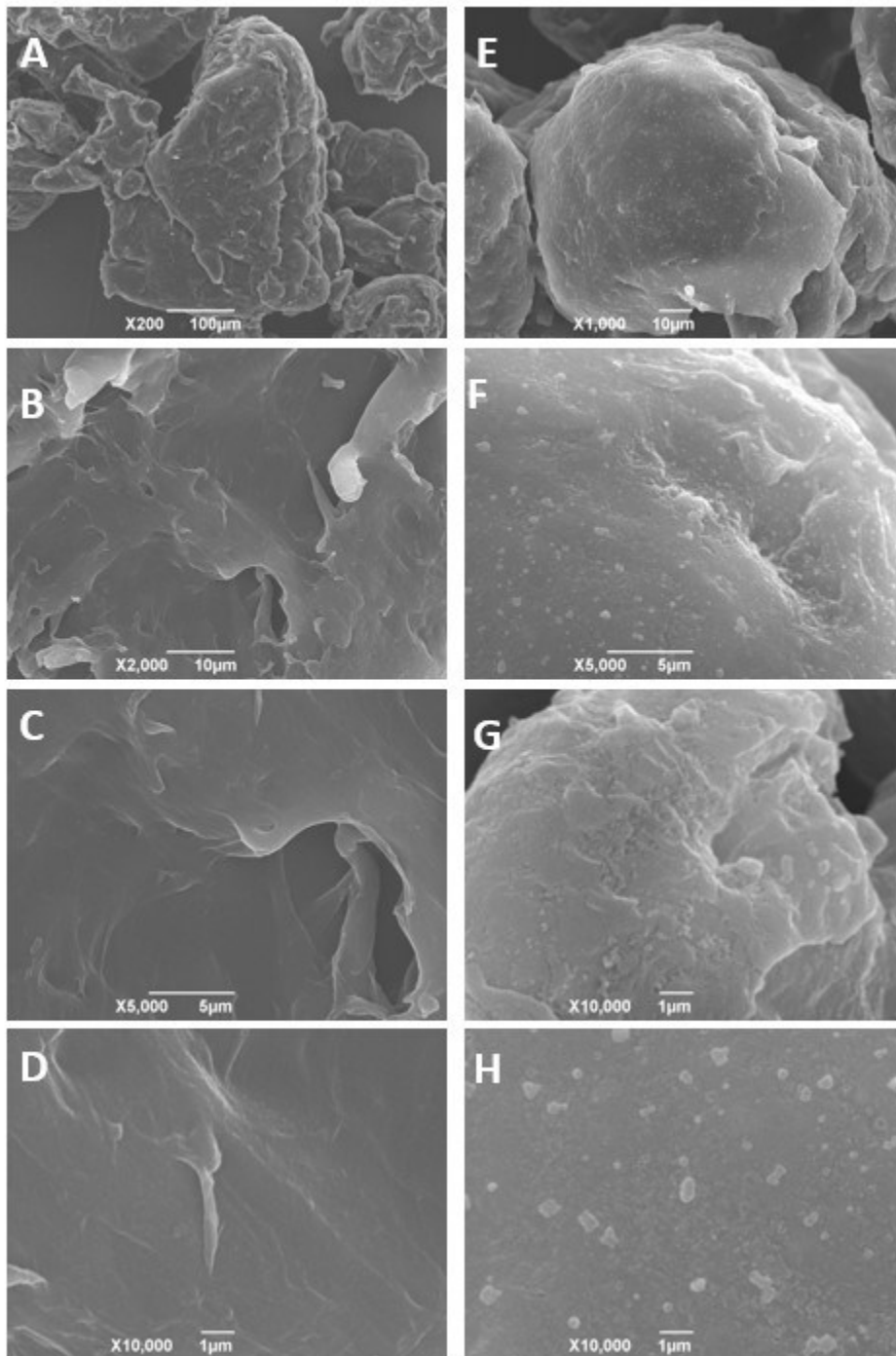


Figura 4.24 Immagini SEM di LDPE a diversi ingrandimenti. A sinistra (A-D) LDPE-p, a destra (E-H) LDPE-iD.

La superficie delle particelle di PET è risultata notevolmente modificata in seguito all'invecchiamento per irraggiamento. Si notano infatti numerose irregolarità superficiali che non sono presenti nella plastica non degradata. Come nel caso del PET trattato col sonificatore, si vedono piccoli fori e rilievi che suggeriscono il possibile sviluppo di nanoplastiche in soluzione. Confrontando *Figura 4.9 e 4.25*, la fotodegradazione sembra sia il trattamento che ha avuto un maggiore impatto su questo tipo di plastica.

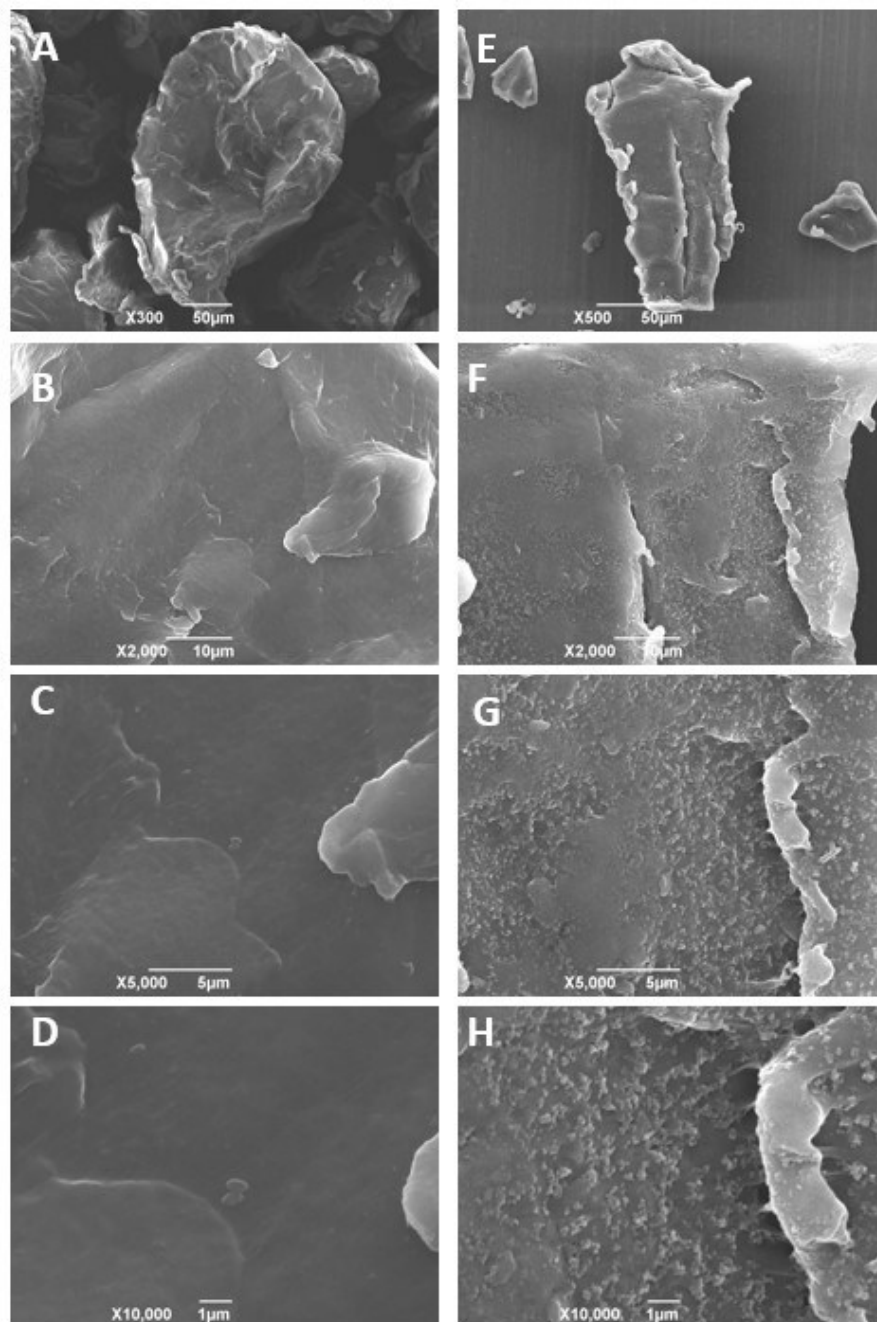


Figura 4.25 Immagini SEM di PET a diversi ingrandimenti. A sinistra (A-D) PET-p, a destra (E-H) PET-iD.

Dalle immagini SEM per il PTFE si osserva che, anche in questo caso, il trattamento non ha causato variazioni morfologiche evidenti. La superficie è leggermente più rugosa sia rispetto alla plastica di partenza, sia rispetto alla plastica degradata col sonificatore, si può quindi supporre che questo trattamento abbia avuto un impatto maggiore, rispetto alla sonicazione, su questo tipo di plastica, per quanto limitato. Tuttavia, così come per la PA12, anche in questo caso non si è verificata la formazione delle fibre notate nei campioni sonicati.

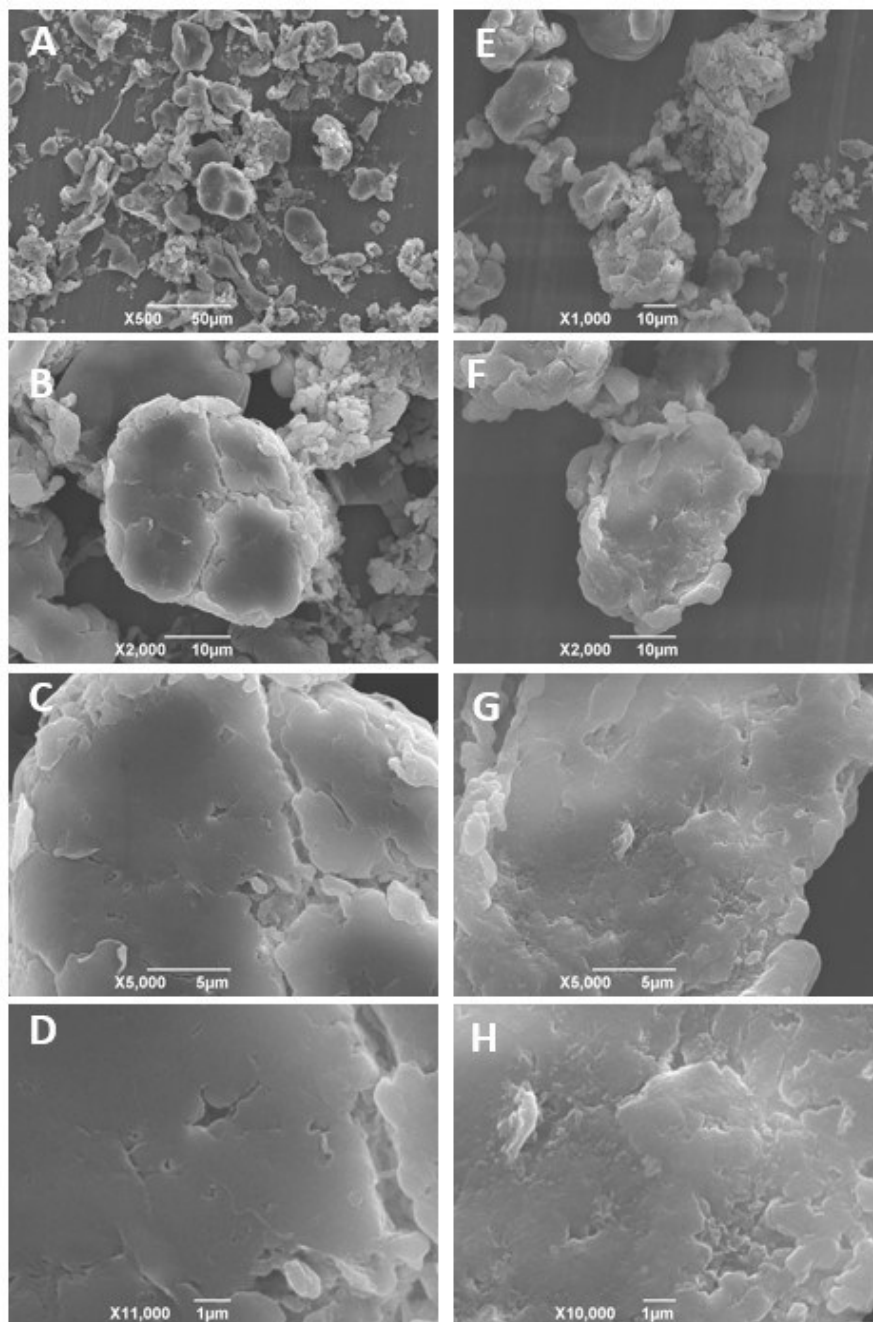


Figura 4.26 Immagini SEM di PTFE a diversi ingrandimenti. A sinistra (A-D) PTFE-p, a destra (E-H) PTFE-iD.

In *Figura 4.27* sono riportati gli spettri medi con la loro deviazione standard dei vari campioni di microplastiche, le condizioni sperimentali con cui sono stati acquisiti gli spettri sono le medesime del capitolo precedente, fatta eccezione per alcune delle particelle più grosse di PET per le quali la potenza del laser è stata dimezzata a causa della loro tendenza ad emettere fluorescenza e saturare il rivelatore. Anche in questo caso, così come per la sonicazione, gli spettri sono rimasti per lo più invariati, sebbene alcune porzioni di spettro siano caratterizzate da una maggiore deviazione standard, soprattutto attorno a 1200 cm^{-1} e a RS superiori a 2000 cm^{-1} . Non essendo questi spettri diversi da quelli descritti in precedenza, per l'attribuzione dei picchi e le considerazioni su quelli più affidabili per l'analisi Raman delle microplastiche si può fare riferimento al capitolo precedente e alle *Tabelle 4.1-4.5*.

Gli indici R (*Figura 4.28*), generalmente inferiori rispetto a quelli per la sonicazione, rispecchiano la maggiore deviazione standard degli spettri delle microplastiche irraggiate. Il campione che si conferma essere stato in minor modo influenzato è il LDPE, a seguire il PET è la seconda plastica che mantiene dei valori di R abbastanza elevati. La correlazione per PA12 è diminuita in accordo con le osservazioni fatte sulle immagini SEM, lo stesso per i campioni PA6-i che in aggiunta mostrano valori di R inferiori rispetto a quelli di PA6-s, confermando l'ipotesi che la fotodegradazione abbia avuto un impatto maggiore. I valori di R per il PTFE-i sono generalmente bassi così come per il PTFE-s, le cause sono con buona probabilità le stesse, ovvero la variabilità della linea di base a RS elevati. Anche per questi campioni, come mostrato in *Figura 4.29*, i valori di R sono tendenzialmente inferiori per particelle piccole. Contrariamente a PTFE-s, PTFE-i mostra un andamento in accordo con le altre plastiche, eccezione fatta per il PET i cui spettri di alcune particelle più grosse hanno correlazioni mediocri con il riferimento. La causa di ciò risiede nel fatto che alcuni spettri sono stati raccolti utilizzando il laser a una potenza inferiore risultando così in picchi meno evidenti e più confusi con il rumore.

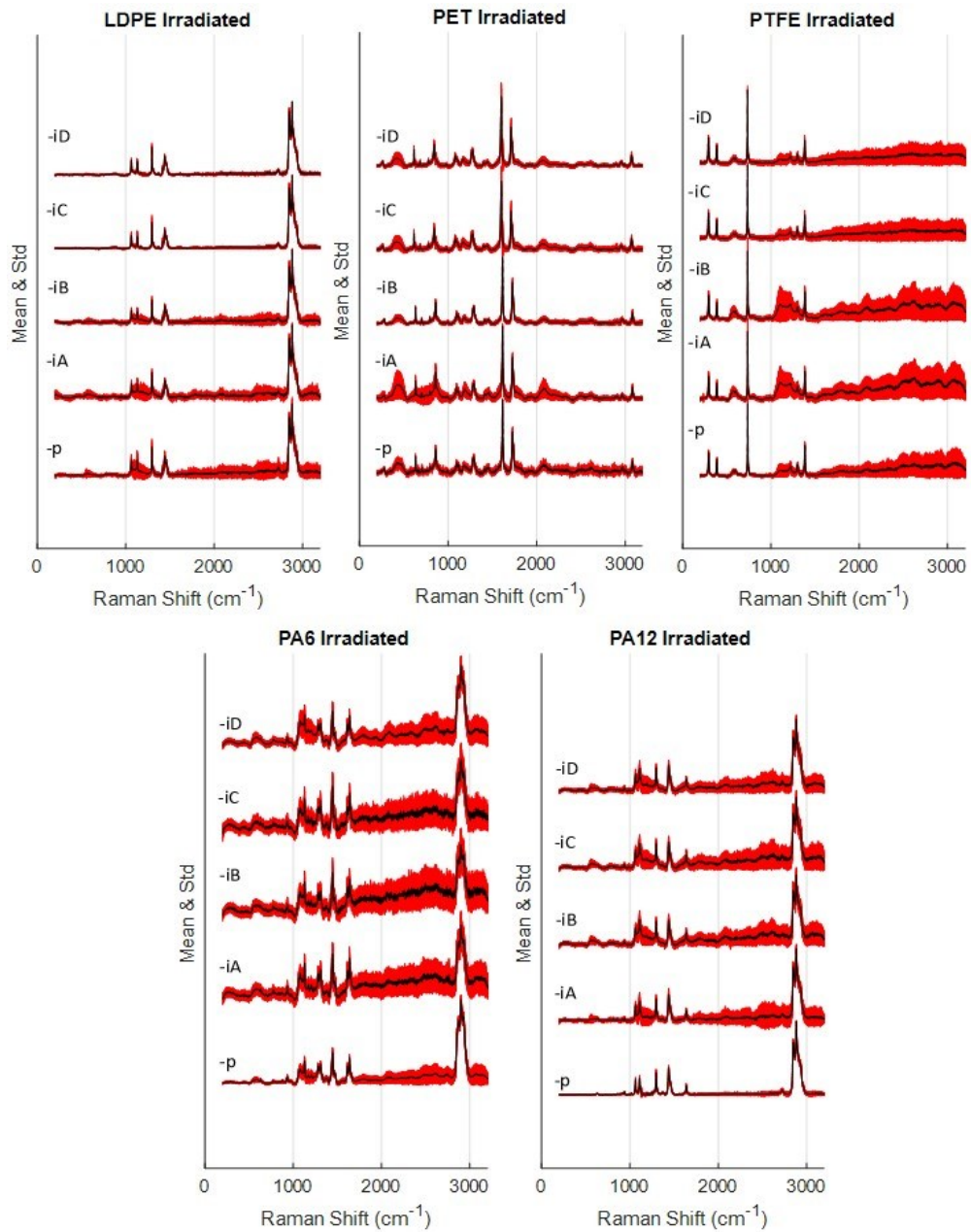


Figura 4.27. Spettri medi con deviazione standard dei diversi campioni di microplastica irraggiati.

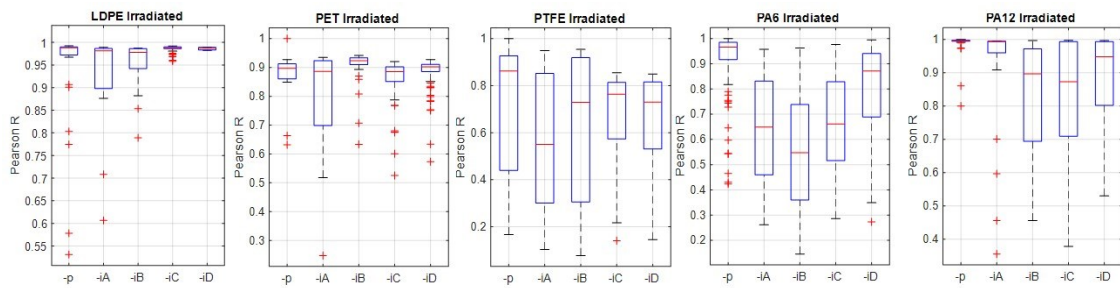


Figura 4.28 Boxplot dei valori degli indici R di correlazione di Pearson delle microplastiche ai vari step di trattamento mediante irraggiamento.

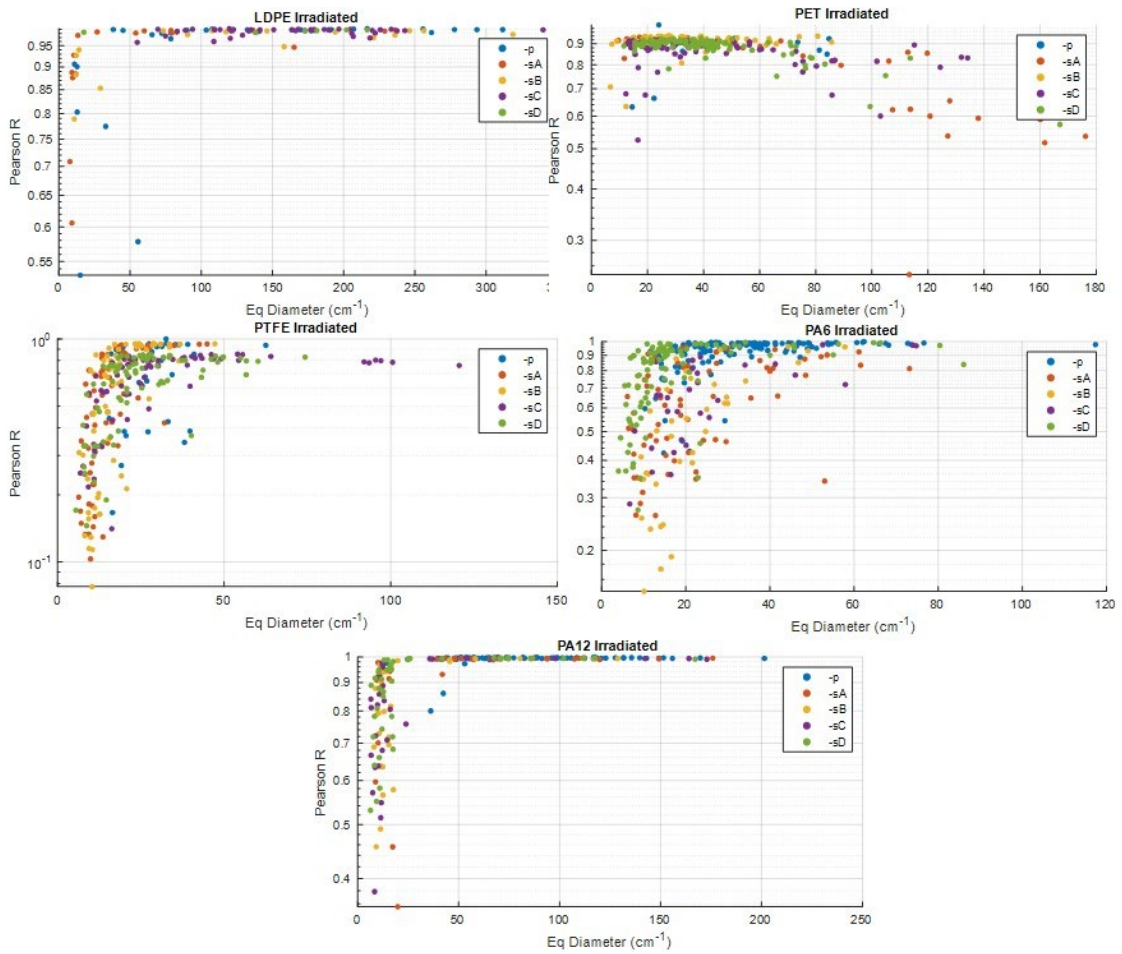


Figura 4.29 Scatter dei valori degli indici R di correlazione di Pearson delle microplastiche ai vari step di trattamento mediante irraggiamento.

4.2 Labeling per rivelazione SERS

Una delle difficoltà principali che si incontrano nell'utilizzo della spettroscopia Raman per l'analisi di routine delle microplastiche è, come già accennato in precedenza, il tempo elevato richiesto per raccogliere gli spettri. Se si volesse, ad esempio, scansionare l'intera superficie di un filtro di diametro pari a 3.7 cm con una risoluzione tale da poter distinguere particelle di diametro $\geq 1 \mu\text{m}$ sarebbe necessario raccogliere ben 10^9 spettri che, se ottenuti in modalità estesa, richiedono circa 1 minuto ciascuno e corrispondono a 17^6 ore di analisi. Un'analisi di questo tipo è infattibile e anche una porzione più piccola di filtro non è sostenibile sia per questioni di tempo, che di denaro, dai laboratori di analisi. D'altro canto, le tecniche di *computer vision* che assistono gli operatori selezionando per loro le particelle da analizzare sulla superficie del filtro, sono poco efficaci quando si vogliono indagare le cosiddette *small microplastics* o le nanoplastiche. Il motivo sta nella risoluzione di un microscopio ottico, che non è spesso sufficiente a distinguere particelle così piccole rispetto alle rugosità del filtro stesso.

La tecnica SERS sta recentemente prendendo piede nel campo dell'analisi delle microplastiche in quanto si è rivelata molto efficace sia per l'analisi della loro frazione più piccola che per quella delle nanoplastiche. In letteratura si possono trovare alcuni esempi di substrati SERS impiegati per lo scopo, essi sono particolarmente costosi ed elaborati e sono quindi difficili da adattare ad analisi di routine e su larga scala.^{38,39}

Di seguito, viene descritto un approccio innovativo per l'analisi di micro- e nanoplastiche tramite SERS, che prevede l'impiego di *nanostar* d'oro (AuNS) funzionalizzate con molecole di acido *p*-mercaptobenzoico (MBA). Questo sistema è stato già precedentemente applicato per il *labeling* di nanoparticelle di polistirene, in una tesi precedente alla presente ma presso il medesimo gruppo.⁶³ Le *nanostar* d'oro sono il substrato SERS che permette di aumentare notevolmente il segnale Raman dei picchi dell'MBA. Sfruttando gli intensi segnali SERS dell'MBA, è possibile velocizzare notevolmente l'analisi di micro- e nanoplastiche di ciascun filtro in quanto la loro presenza viene rivelata, appunto, dai segnali SERS di AuNS-MBA in contatto con la superficie di una particella di microplastica.

Il protocollo di sintesi della AuNS-MBA, e loro incubazione con nanosfere di polistirene (PS) di diametro pari a 800 nm, è stato sviluppato in un precedente lavoro di tesi presso questo medesimo laboratorio, l'obiettivo principale di questo lavoro è invece la valutazione della selettività di interazione del nanosistema AuNS-MBA nei confronti del polistirene rispetto alla silice, un composto inorganico che tipicamente è possibile trovare nei campioni ambientali e che potrebbe quindi essere uno tra i più importanti interferenti nel processo.⁶³

4.2.1 Sintesi e caratterizzazione delle particelle di SiO₂ e PS

Le micro- e nanoparticelle di silice sono state sintetizzate in laboratorio e caratterizzate mediante microscopia ottica in modalità *bright-* e *darkfield* e con SEM. La caratterizzazione morfologica ha altresì permesso di calcolarne una concentrazione in unità di particelle su volume, al fine di poter correttamente calibrare il dosaggio delle AuNS-MBA nei successivi studi di *labeling*. Lo stesso metodo è stato applicato anche alle nanoparticelle di polistirene, essendo in questo caso possibile effettuare un confronto dei risultati ottenuti con i valori forniti dal produttore.

La sintesi di un campione, dapprima polidisperso, poi frazionato e purificato, di particelle di SiO₂ è avvenuta mediante reazione sol-gel di Stöber. Questo metodo, richiamato in dettaglio nella sezione Metodi al capitolo 3.3.2, permette di sintetizzare soluzioni colloidali di silice a partire da ortosilicato tetraetile (TEOS), in presenza di acqua e di un alcol a corta catena come l'etanolo (EtOH), mediante una serie di reazioni di idrolisi (catalizzata da idrossido di ammonio, NH₄OH) e policondensazione. Il meccanismo di reazione è riportato in *Figura 4.30*.



Figura 4.30 Meccanismo di reazione della sintesi sol-gel di Stöber per particelle di silice.

Nella sintesi di Stöber è possibile controllare la grandezza delle particelle prodotte e la loro polidispersione variando la concentrazione di NH_4OH .⁶⁴ Come mostrato in *Figura 4.31*, per poter sintetizzare particelle di dimensioni sufficientemente grandi è necessario operare a concentrazioni elevate di base, queste condizioni sono inoltre favorevoli per la sintesi di particelle con una bassa polidispersione. Per questo motivo, nella sintesi è stata adoperata una concentrazione di NH_4OH pari a 1.69 M.

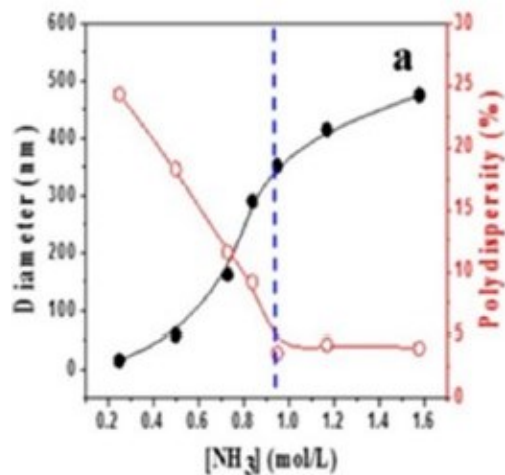


Figura 4.31 Effetto della concentrazione di NH_3 sulle dimensioni e la polidispersione delle particelle di silice.⁶⁴

Malgrado ciò, e come accennato in precedenza, la sintesi ha prodotto un campione piuttosto polidisperso di particelle di SiO_2 , che è stato quindi frazionato per centrifugazione. Dalla centrifugazione a 500 RCF della soluzione contenente le particelle di silice sono state ottenute due frazioni che, dopo una preliminare analisi visiva al microscopio ottico, si sono dimostrate molto diverse in forma e dimensioni. La silice contenuta nel precipitato (*Figura 4.32*) è sotto forma di agglomerati irregolari e di dimensioni relativamente grandi rispetto a quella contenuta nel liquido surnatante (*Figura 4.33*) che ha dimensioni comparabili a quelle delle microparticelle di PS (*Figura 4.34*) e nella quale le particelle sono per lo più separate le une dalle altre. Per questi motivi solamente la frazione di silice più leggera è stata conservata e utilizzata per gli esperimenti successivi.

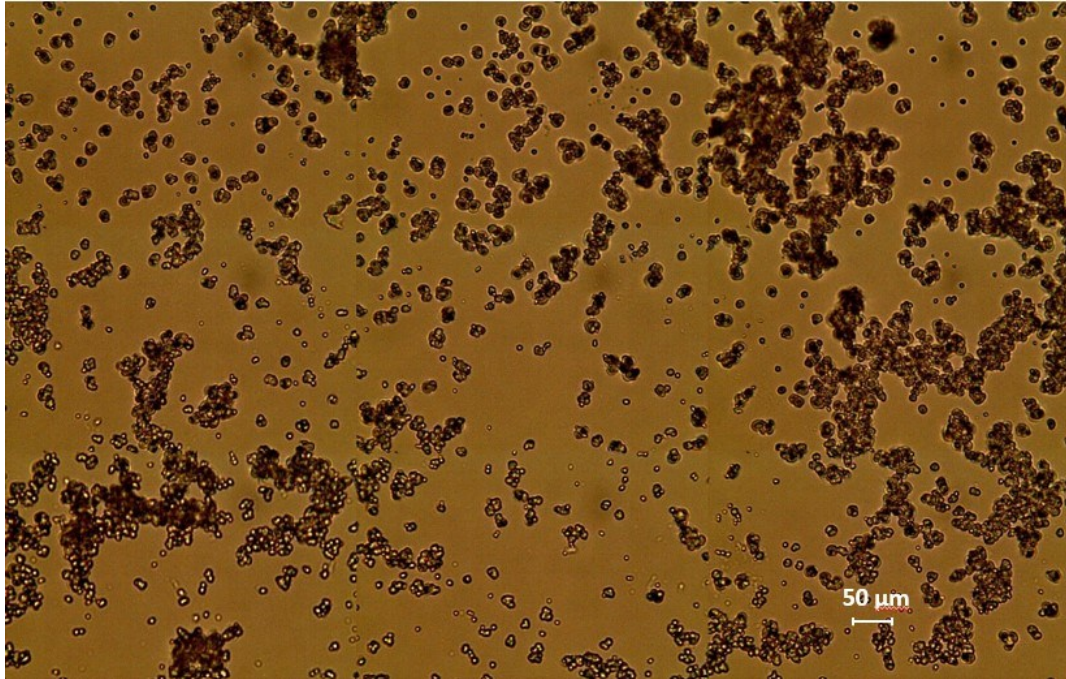


Figura 4.32 Particelle di silice contenute nel precipitato, immagine al microscopio ottico in brightfield con ingrandimento 100x (Leica Fluotar).



Figura 4.33 Particelle di silice contenute nel surnatante, immagine al microscopio ottico in brightfield con ingrandimento 100x (Leica Fluotar).

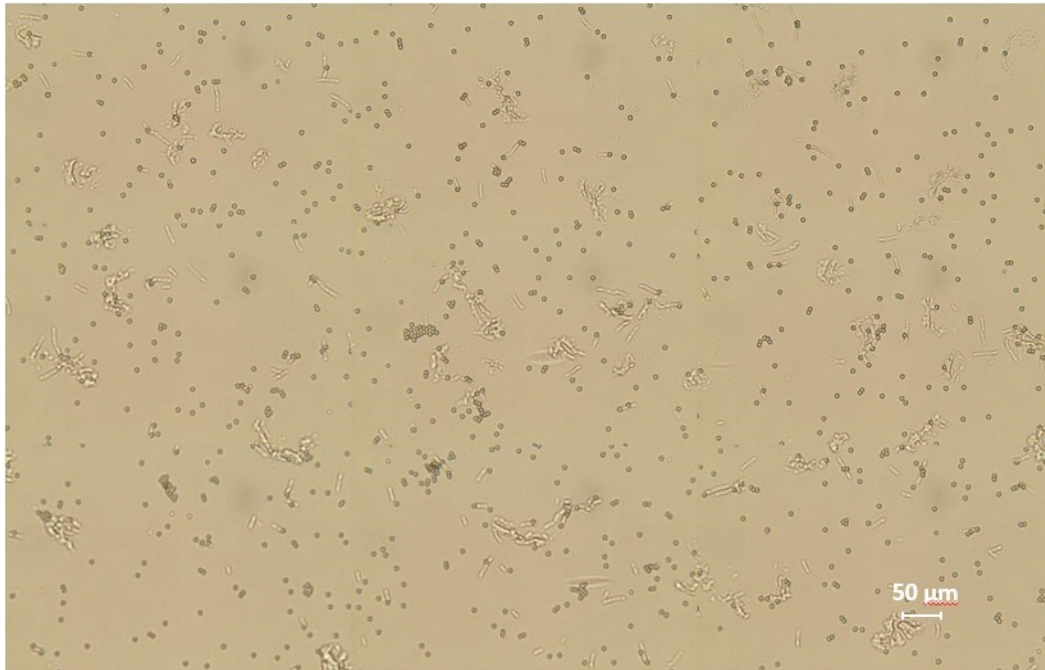


Figura 4.34 Particelle di PS, immagine al microscopio ottico in brightfield con ingrandimento 100x (Leica Fluotar).

La valutazione delle dimensioni delle particelle è stata effettuata utilizzando il software *ImageJ*. Per le immagini raccolte al SEM è stato possibile sfruttare il sistema di ricerca automatica delle particelle integrato nel software, in quanto nelle immagini SEM le particelle sono acquisite a risoluzione sufficiente da permetterne il riconoscimento automatico dallo sfondo. Diversamente, nelle immagini raccolte ai due microscopi ottici (*brightfield* e *darkfield*) le particelle sono state misurate tracciando manualmente il diametro. I risultati ottenuti sia per silice che polistirene sono riportati in *Figura 4.35*.

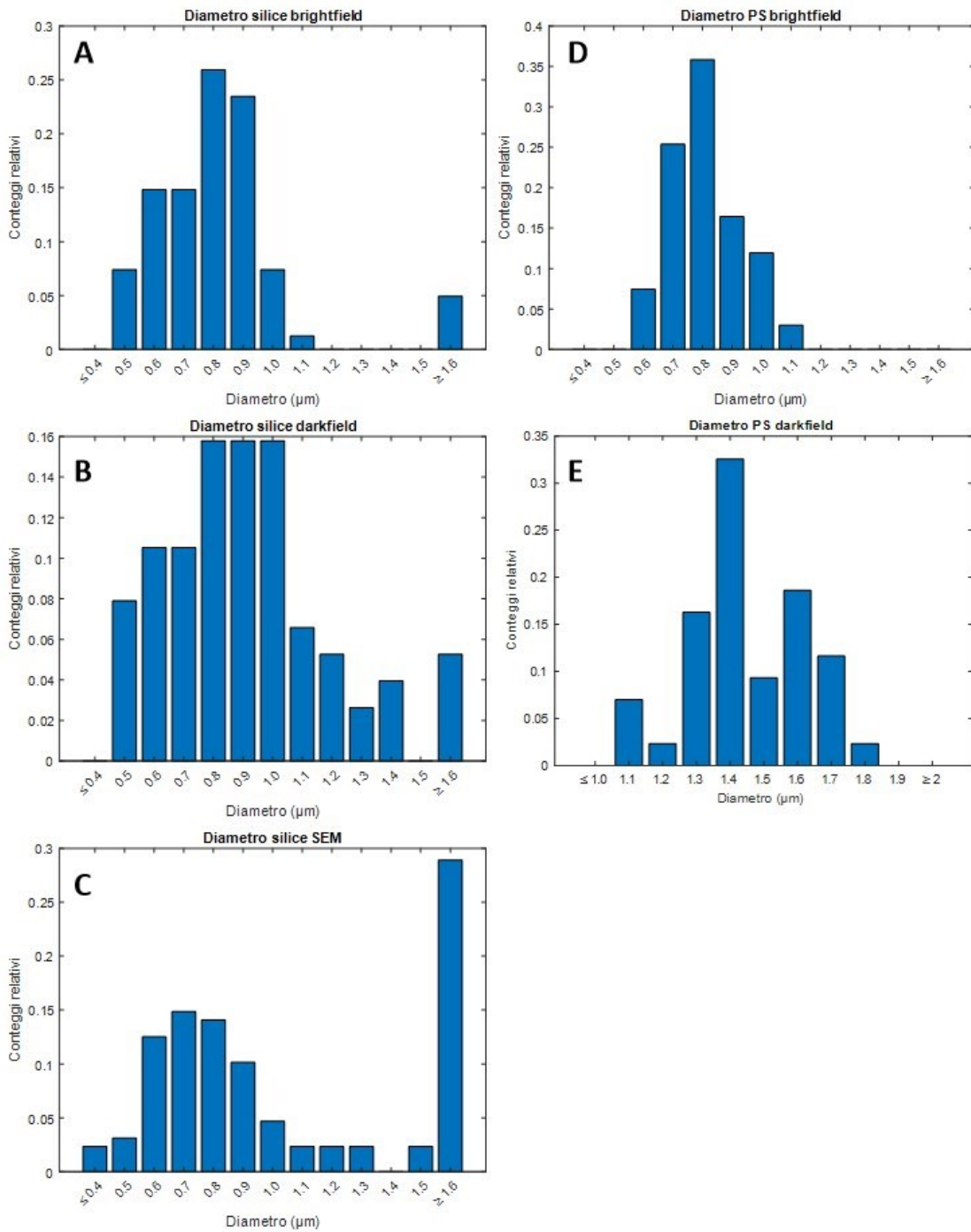


Figura 4.35 Diametro delle particelle di silice determinato da immagini raccolte al microscopio in brightfield (A), in darkfield (B) e al SEM (C) e diametro delle particelle di PS determinato da immagini raccolte al microscopio in brightfield (D) e in darkfield (E).

Osservando gli istogrammi relativi sia al PS che alla SiO_2 , si può notare che i diametri ottenuti in *brightfield* sono minori di quelli *darkfield*. La distribuzione ottenuta da immagini SEM della SiO_2 , d'altra parte, conferma quella ottenuta per *brightfield*, così come le indicazioni del produttore delle biglie di PS. Per questo motivo si è ritenuto che

le dimensioni ottenute da immagini *darkfield* siano soggette ad errore e sono stati quindi utilizzati i dati ottenuti in *brightfield*. In *Figura 4.36* è riportato un esempio di immagine raccolta in *darkfield*: le particelle sono molto luminose ed attorno ad esse c'è un alone che con molta probabilità causa la sovrastima delle dimensioni.

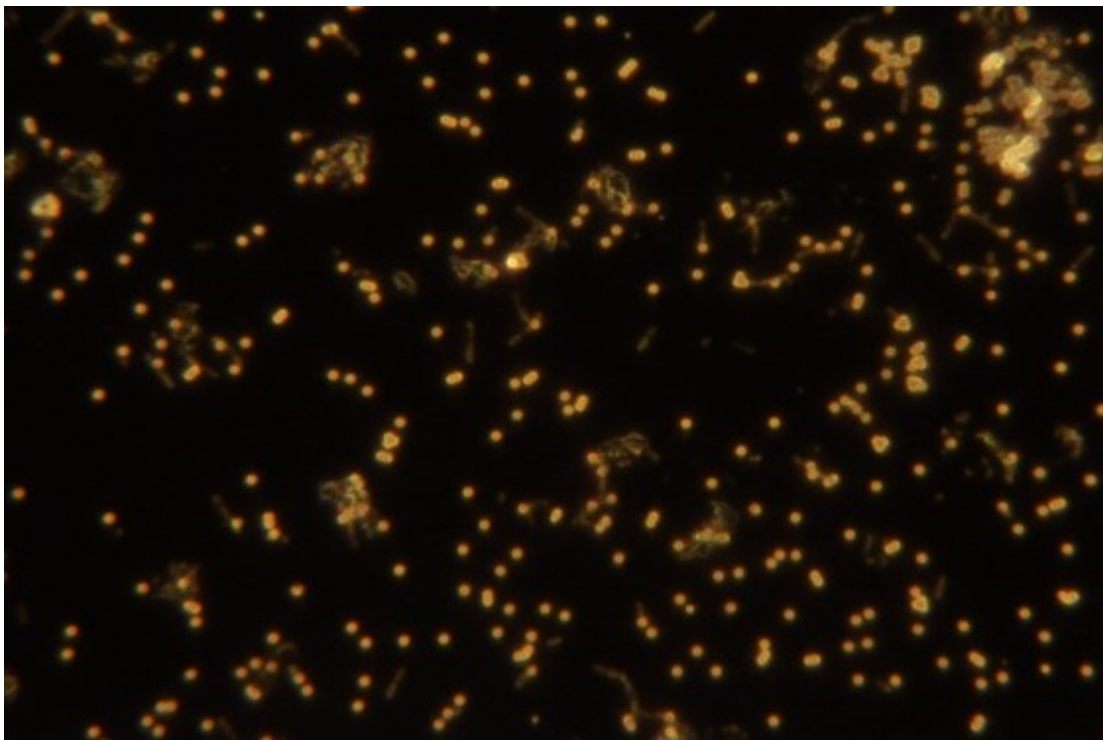


Figura 4.36. Particelle di PS in darkfield.

Nella distribuzione SEM di *Figura 4.35C* sono tuttavia presenti molte particelle con diametro superiore a $1.6\ \mu\text{m}$, probabilmente dovute ad un errore del software di analisi automatica delle particelle. Risulta infatti frequente che l'algoritmo non riesca a distinguere le diverse particelle quando queste si trovano molto vicine tra loro, considerando quindi l'agglomerato come una unica particella di grandi dimensioni. Facendo fede ai risultati ottenuti dalle immagini del microscopio ottico in *brightfield* (*Figura 4.35A, D*) si può concludere che i due campioni abbiano dimensioni comparabili e che quindi le particelle di silice, essendo dimensionalmente molto simili a quelle di PS, siano adatte per i confronti successivi.

4.2.2 Calcolo della concentrazione delle soluzioni di particelle di SiO₂ e PS

La concentrazione delle soluzioni di nanoparticelle di SiO₂ e PS è stata valutata con due metodi indipendenti: mediante una conta microscopica di particelle depositate su un vetrino e per confronto di spettri UV-Vis acquisiti sperimentalmente con spettri calcolati utilizzando il *Boundary Element Method*.⁶⁵

La conta microscopica è stata effettuata depositando su un vetrino da microscopio, accuratamente pulito, 10 µL della soluzione contenente le particelle. Il bordo della goccia è stato tracciato con un pennarello in modo da poterne determinare l'area. Sono state raccolte al microscopio sia le immagini delle gocce intere che delle particelle in esse contenute, in quest'ultimo caso utilizzando un ingrandimento maggiore. Il numero delle particelle contenute nella goccia è stato stimato contando le particelle contenute in piccole aree di circa 46 000 µm² (ovvero circa 215 µm x 215 µm) in punti diversi della goccia e rapportandole all'area totale. In *Tabella 4.6* sono riportati i risultati della conta e la stima delle concentrazioni.

I valori di area in µm² sono stati ottenuti utilizzando il software *ImageJ*.

Tabella 4.6 Risultati conta particelle per PS e silice.

Particella	Densità media particelle/µm ²	Area goccia	Stima particelle totali	Particelle / litro	Concentrazione (M)
PS	0.0233	34 606 420.9 µm ²	806 329	8.1 · 10 ¹⁰	1.3 · 10 ⁻¹³
Silice	0.0192	43 450 131.89 µm ²	833 373	8.3 · 10 ¹⁰	1.4 · 10 ⁻¹³

Per confermare le concentrazioni calcolate con la conta microscopica è stato messo a confronto lo spettro UV-Vis di PS raccolto sperimentalmente (*Figura 4.37B*) con diversi spettri simulati di particelle sferiche delle stesse specie con diametro variabile tra 0.7 µm e 1.3 µm utilizzando il *Boundary Element Method* (BEM). Il BEM è una simulazione agli elementi finiti che, dividendo il volume per interfacce, permette di effettuare calcoli semplificati riguardanti gli oggetti in esame, in questo caso delle nanoparticelle sferiche.

Impostando la lunghezza d'onda, la polarizzazione, la propagazione e l'intensità di una radiazione incidente a una particella, con indice di rifrazione definito sia nella sua parte reale che immaginaria, viene effettuato il calcolo della sua estinzione molare.

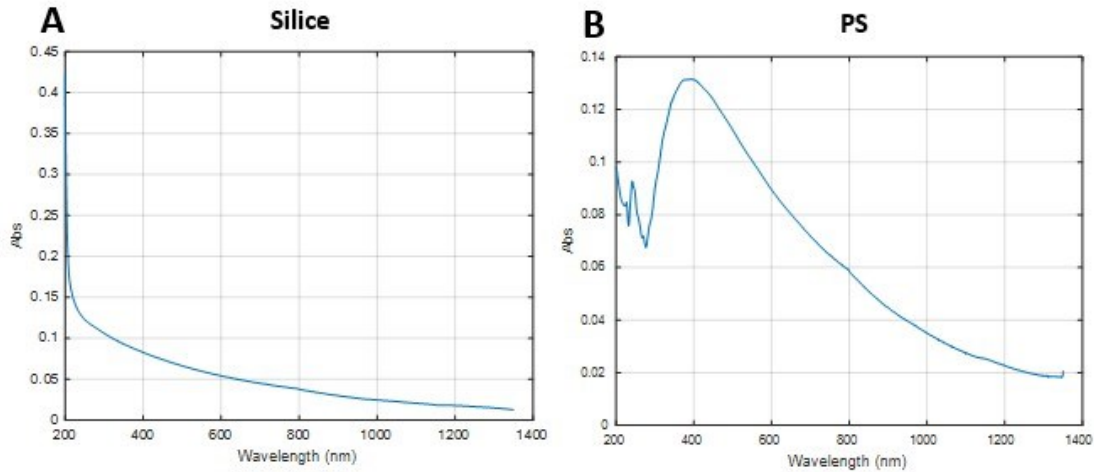


Figura 4.37 Spettri UV-Vis delle soluzioni contenenti particelle di silice (A) e di PS (B).

Come si può apprezzare da *Figura 4.37A*, lo spettro della silice non presenta picchi o bande significative nel range di lunghezze d'onda considerato e per questo motivo non è stato possibile confrontarlo con gli spettri calcolati. Diversamente, la sovrapposizione dello spettro di assorbimento del PS con quelli calcolati (*Figura 4.38*) ha permesso di fare alcune considerazioni.

Tutti gli spettri del PS sono stati normalizzati sul valore di assorbanza a 410 nm. Questo valore di ascissa è stato scelto perché vicino sia a quello del massimo nello spettro sperimentale che a quello del massimo degli spettri simulati. Si osserva che l'andamento dello spettro sperimentale coincide con quello calcolato per le particelle di PS di dimensioni pari a 0.9 μm vicino al massimo, per poi seguire l'andamento di quello delle particelle con dimensioni pari a 1 μm . Gli spettri non sono completamente sovrapponibili probabilmente a causa della polidispersione del campione reale, che è giustificabile dai diametri mostrati in *Figura 4.35D*.

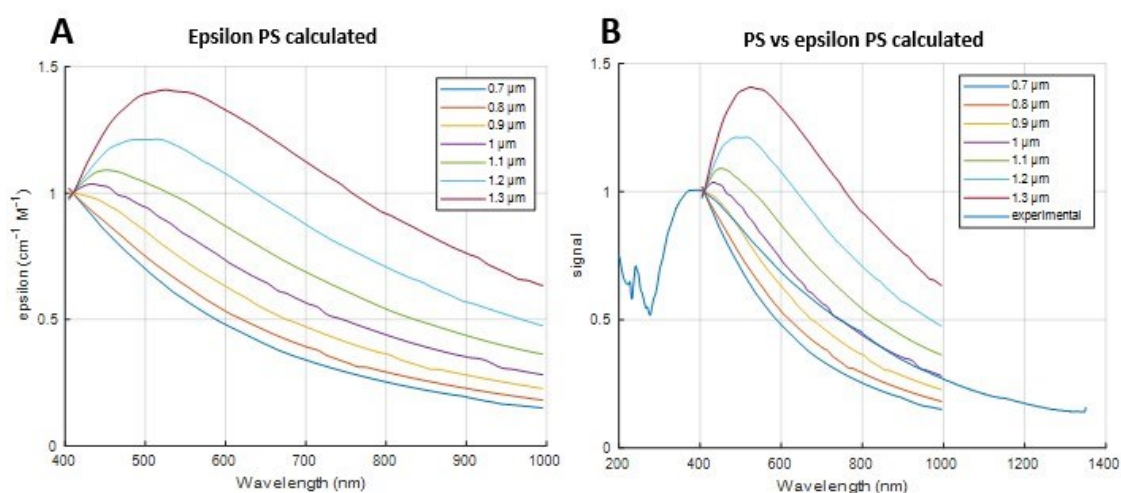


Figura 4.38 Epsilon calcolate per particelle di PS di diverse dimensioni (A) e confronto dello spettro UV-Vis del PS con le epsilon del PS, entrambi normalizzati (B).

Prendendo il coefficiente di estinzione molare ϵ della curva gialla (0.9 μm) ed utilizzando la legge di Lambert-Beer riportata in Eq. 4.1 è possibile determinare la concentrazione C della specie in soluzione.

$$A = \epsilon b C \quad \text{Eq. 4.1}$$

Il valore di ϵ per la curva gialla a 405 nm è pari a $6.348 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, il cammino ottico della cuvetta b è 0.2 cm, mentre il valore A di assorbanza a 405 nm è 0.1259. Risolvendo l'equazione, la concentrazione risulta pari a $0.99 \cdot 10^{-13} \text{ M}$. Rifacendo il calcolo utilizzando invece il coefficiente di estinzione molare della curva relativa alle particelle con diametro pari a 0.8 μm ($5.0085 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) si ottiene una concentrazione di $1.26 \cdot 10^{-13} \text{ M}$ che è ancora più vicina a quella calcolata con il metodo della conta.

Considerando che entrambi i metodi, i quali sono del tutto indipendenti tra loro, producono lo stesso risultato in termini di ordine di grandezza, è possibile confermare la buona riuscita degli esperimenti e di conseguenza considerare attendibile anche il valore di concentrazione di silice determinato con la conta microscopica.

Confermata la somiglianza dimensionale tra le particelle di silice e di PS, ed appurato che la concentrazione delle stesse nelle rispettive soluzioni sia simile, è possibile proseguire nel valutare la selettività del *label* SERS AuNS-MBA nei confronti dei due tipi di particelle.

4.2.3 Prove di selettività PS vs SiO₂

Durante lo sviluppo della tecnica di *labeling* basata sul substrato SERS AuNS-MBA, ne è stata valutata in modo preliminare l'efficacia nel riconoscimento di nanoparticelle di PS di dimensioni pari a 800 nm disperse in acqua bidistillata.⁶³ Tuttavia, non bisogna escludere la possibilità che il substrato SERS si sia adsorbito sulle particelle di PS solamente perché esse erano l'unica specie disponibile in soluzione, e che quindi in campioni reali di acqua, in cui generalmente è presente una maggiore quantità e variabilità di particelle disperse, il *labeling* del PS non avvenga perché sfavorito rispetto a quello di altre specie maggiormente affini all'MBA. Quanto descritto poc'anzi si può definire come lo studio della selettività dell'interazione del sistema *label* AuNS-MBA con il PS rispetto ad altre specie interferenti.

In questo lavoro è stata scelta la silice (SiO₂) come particella inorganica modello, in quanto essa è una specie abbondantemente presente in natura e che potrebbe quindi rivelarsi un interferente importante nel processo di riconoscimento del PS. Le dimensioni e le concentrazioni delle particelle sono state discusse nei capitoli 4.2.1 e 4.2.2 rispettivamente. In breve, sia le dimensioni che le concentrazioni di entrambe le particelle sono comparabili e ciò permette di effettuare un confronto equo dei due tipi di nanoparticelle.

Il *label* AuNS-MBA si è rivelato stabile nel tempo se conservato in ambiente basico in modo che l'acido carbossilico dell'MBA sia deprotonato ed eviti che le nanoparticelle si aggregino grazie alla repulsione tra cariche negative. Il processo di *labeling* deve essere effettuato prima della filtrazione e prevede l'incubazione delle particelle di plastica in ambiente leggermente acido (pH 6) con il substrato per 24 ore. In questo caso, il pH acido è fondamentale in quanto, in base alle informazioni disponibili dal produttore, la superficie delle nanoparticelle di PS presenta una carica negativa a causa della presenza di gruppi solfato. Questi ultimi, come si vede da *Figura 4.39*, se l'incubazione viene effettuata in ambiente basico impediscono al substrato carico negativamente di avvicinarsi alle particelle in quanto le interazioni di tipo elettrostatico prevalgono sulle forze di Van der Waals.

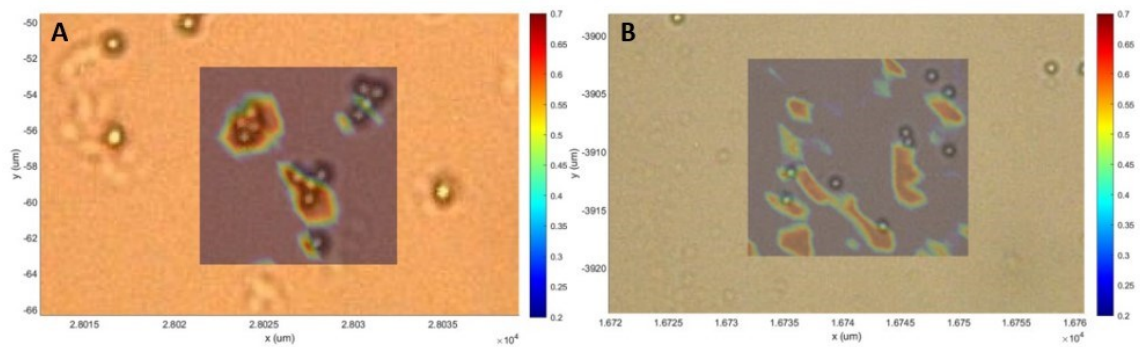


Figura 4.39 Mappe Raman ottenute con laser da 633 nm attorno a delle particelle di PS in seguito alla loro incubazione con AuNS-MBA a pH acido (A) e a pH basico (B). La colorazione è attribuita in base al coefficiente di correlazione R dei vari spettri con quello dell'MBA.⁶³

Questo approccio è stato al momento valutato solamente utilizzando nanosfere di polistirene di diametro pari a 800 nm. Si ritiene che, quando neutralizzata la repulsione elettrostatica, l'anello benzenico dell'MBA effettui un π - π *stacking* con quelli del polimero, permettendone quindi l'adsorbimento sulla superficie delle nanoplastiche.

Nello specifico, lo studio della selettività di *labeling* è stato effettuato sottoponendo una quantità costante di particelle di SiO₂, oppure PS, a quantità variabili di AuNS-MBA. In seguito all'incubazione, i diversi campioni sono stati quindi depositati su dei vetrini da microscopio prima dell'analisi al micro-Raman. In Figura 4.40 sono riportate due mappe Raman di nanoparticelle incubate con AuNS-MBA con un rapporto molare AuNS-MBA /particelle pari a 23. In alto troviamo le particelle di PS che, come si deduce dalla scala di colori basata sull'intensità del picco Raman dell'MBA a 1078 cm⁻¹ e dallo spettro riportato a destra, sono state riconosciute con successo dal *label*. In basso, la mappa Raman di una porzione del vetrino su cui sono state depositate le particelle di silice rivela solo deboli segnali di MBA. Un altro dettaglio importante, sempre apprezzabile da Figura 4.40A, è il fatto che i segnali delle AuNS-MBA vengono trovati solo in corrispondenza delle biglie di PS, mentre il vetrino rimane pulito.

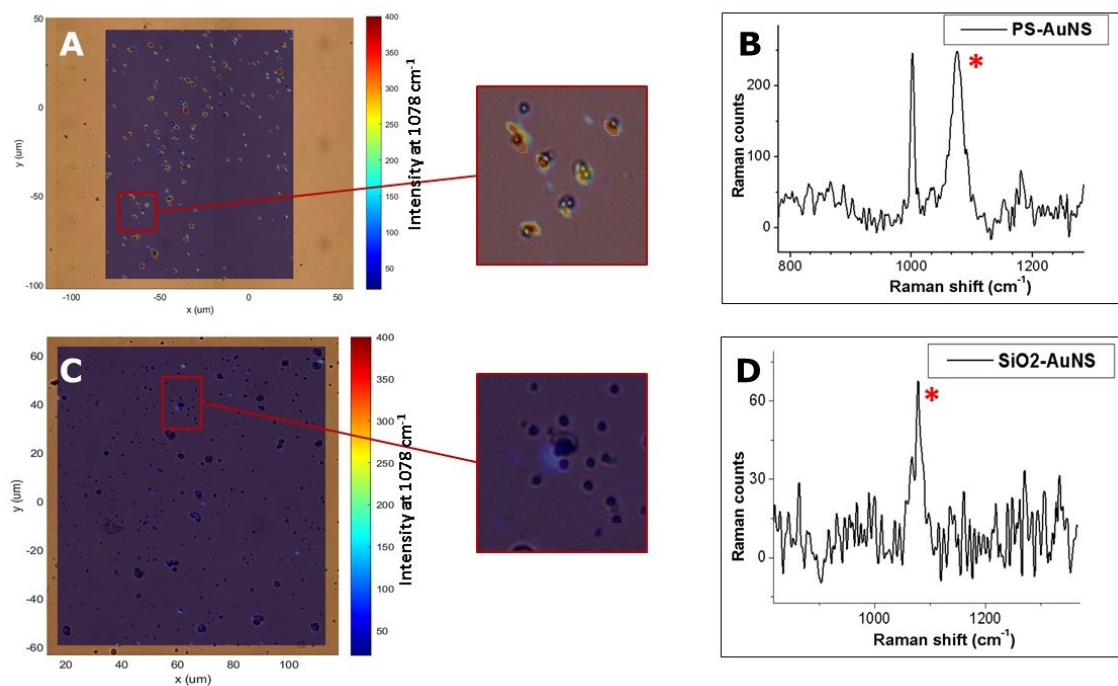


Figura 4.40 A sinistra, mappe Raman ottenute con laser da 633 nm e obiettivo 100x (Leica Fluotar) di una porzione di area per nanoparticelle di PS (A) e silice (C) incubate con AuNS-MBA e depositate su vetrini da microscopio. A destra esempi di spettri di PS (B) e silice (D) tra quelli raccolti nelle mappe, con un asterisco rosso (*) è segnato il picco caratteristico dell'MBA a 1078 cm^{-1} .

Al fine di ottenere una adeguata valutazione statistica, e dopo aver appurato che i segnali SERS vengono riscontrati solo in corrispondenza delle nanoparticelle di PS o di SiO_2 e non sul vetrino, in Figura 4.41 sono raffigurati i risultati relativi a serie di misure micro-Raman raccolte su un ampio numero di particelle depositate. Diversamente da Figura 4.39 e 4.40, nelle misure di Figura 4.41 si è quindi indirizzata la misura Raman esclusivamente in corrispondenza delle singole particelle. Nei grafici viene mostrato in ascissa il valore di R (correlazione di Pearson) che valuta l'accordo tra lo spettro in esame e lo spettro di riferimento dell'MBA, mentre in ordinata è riportata l'intensità dei segnali Raman a 1078 cm^{-1} . In ciascun grafico sono riportati i valori relativi agli spettri Raman delle particelle incubate con un determinato rapporto molare (M.R.), in rosso è rappresentato il PS e in blu la silice.

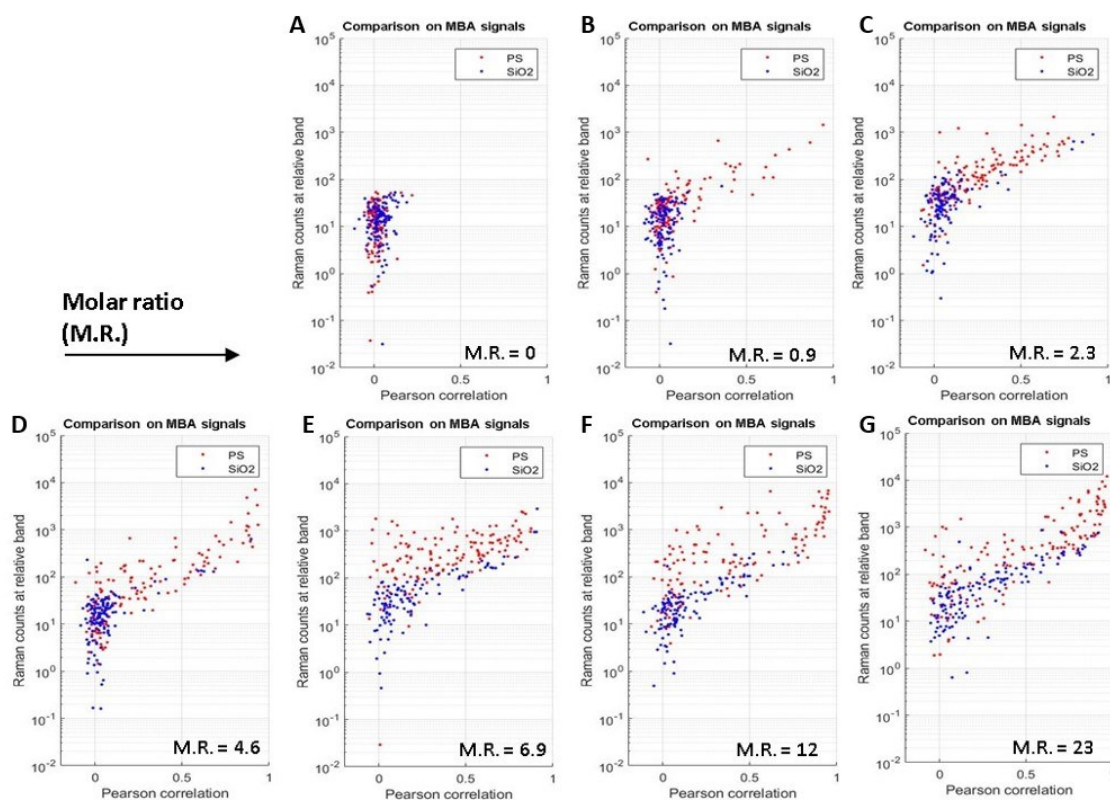


Figura 4.41. Plot dell'indice di correlazione R di Pearson e dell'intensità Raman in corrispondenza del picco dell'MBA (1078 cm^{-1}) misurato su particelle di PS (rosso) e silice (blu) con diversi rapporti molari AuNS-MBA/particelle.

Nel primo grafico (A), relativo al rapporto molare nullo dove le particelle sono depositate senza lo step di incubazione con il *label*, i segnali sono centrati a valori di $R = 0$ e ciò permette di affermare che non vi siano contributi esterni all'MBA al segnale Raman a 1078 cm^{-1} . Allo stesso tempo, questo esperimento permette di apprezzare il rumore di fondo associato al monitoraggio dell'intensità del picco Raman dell'MBA. Per rapporti molari crescenti (B \rightarrow G) si osserva come la correlazione di Pearson tenda ad aumentare, sia per silice che per PS. Tuttavia, la correlazione per il PS è sempre migliore rispetto a quella della silice. Osservando i valori di R è importante tenere in considerazione che gli spettri del PS su cui è adsorbito l'MBA non potranno mai avere correlazioni perfette con il riferimento in quanto sono presenti anche segnali dovuti al polimero stesso, che tendono quindi a peggiorare la correlazione ponendo il PS in una condizione di svantaggio rispetto alla silice, che non ha segnali propri nella finestra di numeri d'onda indagata. In aggiunta, l'intensità del segnale a 1078 cm^{-1} è sempre mediamente maggiore per le particelle di PS rispetto a quelle di silice.

I valori medi di intensità in termini di *Raman counts* ricavati dai medesimi dati sono riportati in modo schematico in *Figura 4.42*. Qui sono riportate anche le intensità medie a RS corrispondenti al tipico picco Raman del PS (1001 cm^{-1}), non è stato possibile fare lo stesso per la silice che non ha picchi Raman caratteristici nel range di numeri d'onda indagato. Per il PS si nota che l'intensità media del suo picco caratteristico rimane invariata nei diversi campioni, mentre quella dell'MBA sale all'aumentare del rapporto molare. Ciò suggerisce che, via via che la concentrazione di *label* in soluzione aumenta, più nanoparticelle si avvicinano alla superficie del polimero dando origine a segnali sempre più intensi. Per la silice, invece, si nota un leggero aumento dell'intensità media a 1078 cm^{-1} che rimane però molto vicina allo 0: a rapporti molari maggiori è statisticamente più probabile che alcune nanoparticelle possano adsorbirsi sulla silice anche senza delle vere e proprie interazioni favorevoli.

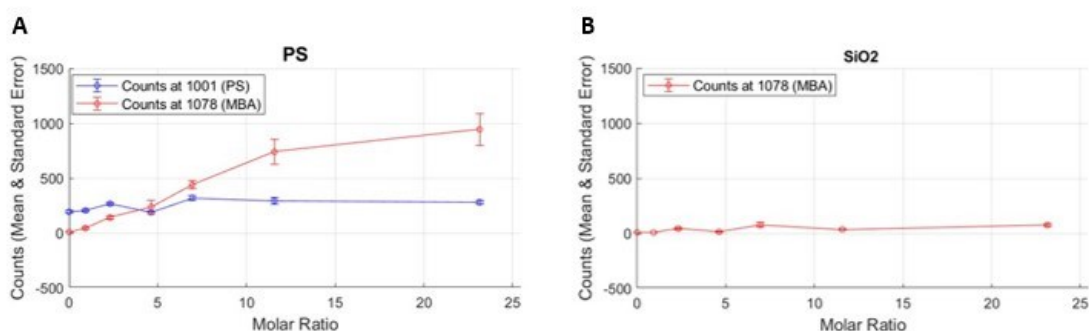


Figura 4.42 Valori medi di intensità con deviazione standard a Raman shifts corrispondenti ai picchi caratteristici del PS (1001 cm^{-1}) e dell'MBA (1078 cm^{-1}) degli spettri misurati sulle sfere di PS (**A**) e silice (**B**) a diversi rapporti molari.

Per valutare se avviene un effettivo riconoscimento selettivo da parte del substrato SERS delle particelle di PS in presenza di silice, una miscela della due particelle in uguale proporzione, e con rapporto molare AuNS-MBA/particelle pari a 23, è stata incubata per 24 ore e poi filtrata su un filtro in ossido di alluminio. In una porzione di filtro è stata prima eseguita una scansione veloce utilizzando un obiettivo 10x ed un laser a 785 nm che, come mostrato in *Figura 4.43C*, ha permesso di riconoscere le porzioni di filtro in cui è presente l'MBA. *Figura 4.43B* mostra invece come questo tipo di misura (10x, 785 nm) non sia in grado di rilevare alcun segnale ascrivibile al PS.

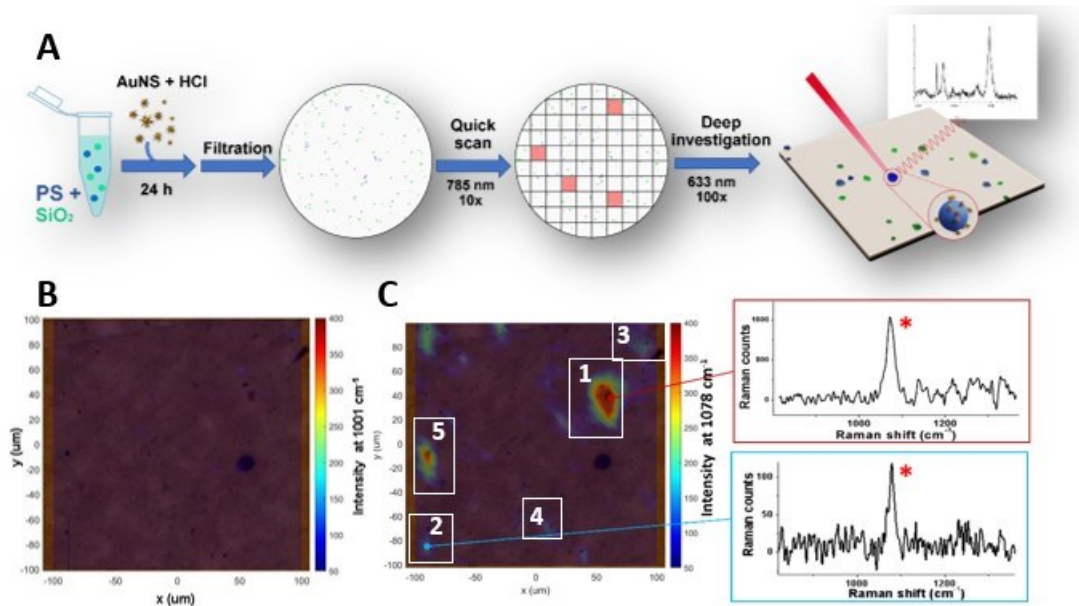


Figura 4.43 Rappresentazione schematica del processo di labeling e analisi delle nanoparticelle mediante Raman SERS (A); scansione veloce di una porzione di filtro utilizzando un laser da 785 nm e un obiettivo 10x: a sinistra (B) è evidenziata l'intensità dei segnali Raman a 1001 cm^{-1} (RS del picco di PS) e al centro (C) è evidenziata l'intensità dei segnali a 1078 cm^{-1} (RS del picco di MBA), a destra due esempi di spettri raccolti in cui si nota il picco dell'MBA.

Nelle zone 1-5 di Figura 4.43C, è stata poi condotta un'indagine più approfondita utilizzando un obiettivo 100x ed un laser da 633 nm, che hanno permesso di misurare, in aggiunta ai segnali dell'MBA, anche i segnali del PS (Figura 4.44). Si nota che solamente gli spettri 1-4 rivelano la presenza di PS, mentre lo spettro 5 presenta solamente il segnale dell'MBA: si tratta molto probabilmente di una particella di silice e quindi di un caso di falso positivo. Grazie a questo sistema di doppio controllo, basato sia sull'osservazione del picco caratteristico dell'MBA che di quello del polimero PS, è possibile riconoscere ed escludere casi di questo tipo. In aggiunta a questo, va fatto notare come sia stato di fatto possibile riconoscere singole particelle di PS da 800 nm ad un ingrandimento 10x, grazie agli alti segnali SERS derivanti dal *labeling* con AuNS-MBA.

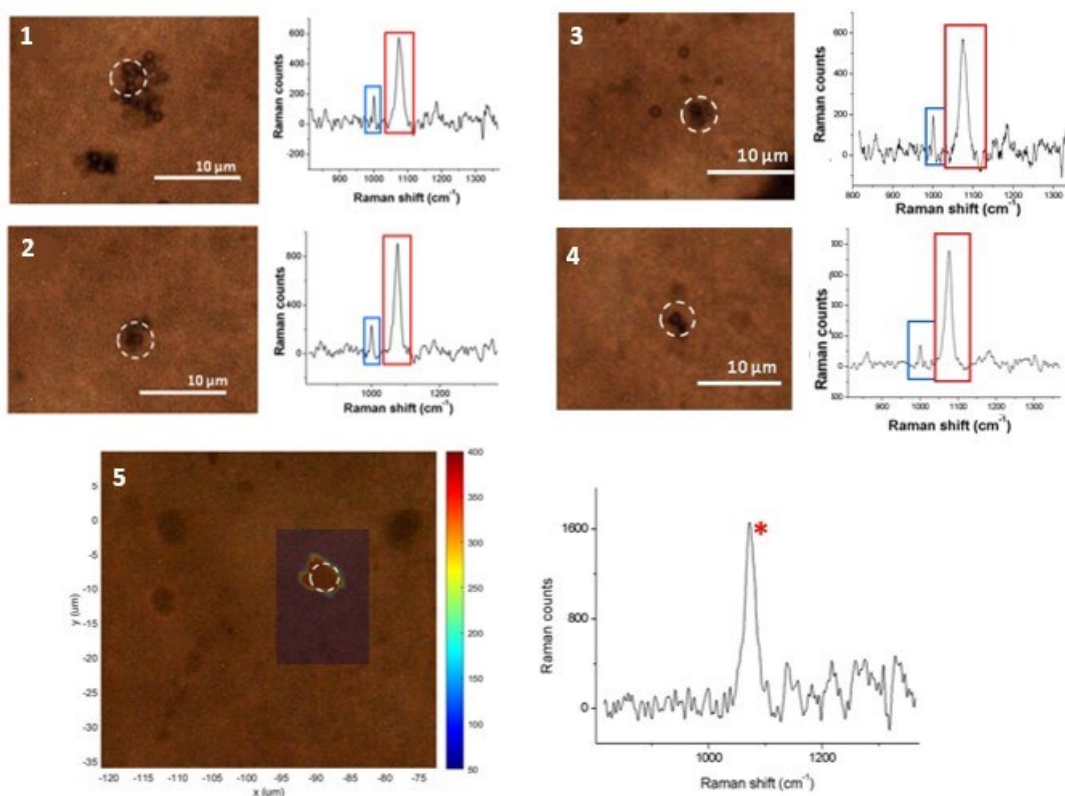


Figura 4.44 Scansione approfondita delle zone 1-5 del filtro (Figura 4.43C) utilizzando un laser da 633 nm e un obiettivo 100x. A sinistra le immagini scattate con il microscopio ottico e a destra il corrispondente spettro con il segnale dell'MBA in rosso e quello del PS in blu.

Utilizzando questo approccio è quindi possibile rivelare la presenza di particelle di plastica anche con un modesto ingrandimento (es. 10x), che permette di scansionare il filtro in tempi molto ridotti, basandosi semplicemente sui segnali dell'MBA che ha interazioni favorevoli con le particelle di PS. La preliminare scansione a basso ingrandimento non fornisce alcuna informazione sul tipo di particelle di plastica in quanto i segnali dei polimeri di dimensioni troppo piccole non sono abbastanza intensi da emergere. Ciononostante, è possibile effettuare poi una scansione ad ingrandimento maggiore sulle zone di filtro in cui sono emersi i segnali dell'MBA, per poter così raccogliere degli spettri chiari delle singole particelle in cui siano visibili i picchi necessari al riconoscimento del polimero.

5 Conclusioni

In questo elaborato di tesi sono state affrontate due differenti tematiche entrambe legate alle nano- e microplastiche in quanto contaminanti ambientali. Al giorno d'oggi, non sono ancora disponibili metodi ufficiali per l'analisi della nano- e microplastiche ambientali a causa della grande variabilità delle specie racchiuse in questa categoria. In questo lavoro sono presentati due metodi indipendenti per la produzione di microplastiche invecchiate artificialmente e un metodo per l'analisi di nanoplastiche mediante Raman SERS.

L'invecchiamento di cinque diverse tipologie di microplastiche sia mediante ultrasonificazione che mediante irraggiamento, pensato per mimare nel modo più fedele possibile gli stress più ricorrenti ai quali le microplastiche vanno incontro in ambiente naturale acquoso, ha portato principalmente a cambiamenti morfologici. In alcuni casi questi sono stati particolarmente evidenti (es. PA12), mentre in altri casi meno (es. LDPE). Non sono state osservate particolari modifiche dei rispettivi spettri Raman e ciò permette di affermare che la spettroscopia Raman sia particolarmente adatta per il riconoscimento di microplastiche in campioni ambientali poiché, malgrado i vari processi di degradazione che queste ultime possano aver subito, l'attribuzione può avvenire direttamente tramite confronto con riferimenti di plastiche commerciali.

In futuro, sarebbero utili ulteriori analisi dei diversi campioni mediante micro-FTIR in modo da confermarne ulteriormente l'invecchiamento e valutarne il grado di ossidazione per poi effettuare confronti con plastiche ambientali.

Questi esperimenti di invecchiamento artificiale hanno permesso di aprire la strada allo sviluppo di un modello di invecchiamento di differenti polimeri di dimensioni micrometriche, da impiegare come standard nell'analisi delle microplastiche ambientali.

Gli studi sulla selettività del substrato AuNS-MBA rispetto all'interazione su nanoplastiche di PS e nanoparticelle di SiO₂, hanno confermato che questo sistema di *labeling*, avviato in una tesi precedente, è in grado di riconoscere in modo selettivo nanoparticelle di polistirene in presenza di particelle analoghe di silice.

Il metodo basato su una doppia scansione di un filtro su cui sono state depositate le microplastiche, la prima ad ingrandimento inferiore (10x) e la seconda ad ingrandimento maggiore (100x), inoltre, si è rivelato efficace nell'individuazione di particelle sub-micrometriche di polistirene in tempi estremamente brevi. Grazie a questa tecnica SERS è possibile velocizzare di circa due ordini di grandezza le analisi mediante microspettroscopia Raman, rendendo la tecnica competitiva con quella μ FTIR. Studi futuri sono tuttavia necessari per poter individuare un substrato adatto anche ad altre tipologie di polimeri e valutare l'affinità del substrato con altri possibili interferenti.

Un ringraziamento alla Dott.ssa Fabiana Corami e alla Dott.ssa Beatrice Rosso dell'Università Ca' Foscari di Venezia per la collaborazione e per aver fornito i campioni di microplastiche da trattare.

Bibliografia

1. European Chemicals Agency. Annex XV Restriction Report, proposal for a restriction. Substance name: intentionally added microplastics. **2019**.
2. International Organization for Standardization (ISO/TR 21960:2020)
<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:21960:ed-1:v1:en> (accessed Aug 2, 2022).
3. F. Corami, B. Rosso, B. Bravo, A. Gambaro, C. Barbante. A novel method for purification, quantitative analysis and characterization of microplastic fibers using Micro-FTIR. *Chemosphere* **2020**, 238, 124564.
4. A.L. Andrady. *Plastics and the environment*; John Wiley & Sons Inc., **2003**.
5. OECD. *Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options*; OECD Publishing, Paris, **2022**.
6. P.L. Corcoran. Degradation of Microplastics in the Environment. *Handb. Microplastics Environ.* **2022**, 531–542.
7. Z. Yuan, R. Nag, E. Cummins. Human health concerns regarding microplastics in the aquatic environment - From marine to food systems. *Sci. Total Environ.* **2022**, 823, 153730.
8. A.B. Silva, A.S. Bastos, C.I.L. Justino, et al. Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review. *Anal. Chim. Acta* **2018**, 1017, 1–19.
9. T. Braun, L. Ehrlich, W. Henrich, et al. Detection of microplastic in human placenta and meconium in a clinical setting. *Pharmaceutics* **2021**, 13 (7), 1–12.
10. A. Ragusa, A. Svelato, C. Santacroce, et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environ. Int.* **2021**, 146, 106274.
11. International Organization for Standardization Principles for the analysis of plastics and microplastics present in the environment (ISO/DIS 24187:2021). 2021.
12. R. Becker, K. Altmann, T. Sommerfeld, U. Braun. Quantification of microplastics in a freshwater suspended organic matter using different thermoanalytical methods – outcome of an interlaboratory comparison. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2020**, 148 (December

- 2019), 104829.
13. E. Dümichen, P. Eisentraut, C.G. Bannick, et al. Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere* **2017**, 174, 572–584.
 14. V.C. Shruti, F. Pérez-Guevara, P.D. Roy, G. Kuttralam-Muniasamy. Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects. *J. Hazard. Mater.* **2022**, 423 (August 2021).
 15. T. Stanton, M. Johnson, P. Nathanail, et al. Exploring the Efficacy of Nile Red in Microplastic Quantification: A Costaining Approach. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2019**, 6 (10), 606–611.
 16. S. Liu, E. Shang, J. Liu, et al. What have we known so far for fluorescence staining and quantification of microplastics: A tutorial review. *Front. Environ. Sci. Eng.* **2022**, 16 (1), 1–14.
 17. Legge 27 dicembre 2017, n. 205, “Bilancio di previsione dello Stato per l’anno finanziario 2018 e bilancio pluriennale per il triennio 2018-2020” (Pubblicata in G.U. 29 dicembre 2017, n. 302) www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2017/12/29/17G00222/sg (accessed Aug 2, 2022).
 18. European Chemicals Agency. Committee for Risk Assessment (RAC) Committee for Socio-economic Analysis (SEAC) Annex to Background document. **2020**.
 19. European Chemicals Agency. Committee for Risk Assessment (RAC) Committee for Socio-economic Analysis (SEAC) Background document. **2020**.
 20. Commissione europea - Inquinamento da microplastiche, misure per ridurre l’impatto sull’ambiente https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/12823-Inquinamento-da-microplastiche-misure-per-ridurre-limpatto-sullambiente_it (accessed Aug 2, 2022).
 21. ECHA - Microplastics <https://echa.europa.eu/it/hot-topics/microplastics> (accessed Aug 2, 2022).
 22. Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile <https://www.agenziacoazione.gov.it/comunicazione/agenda-2030-per-lo-sviluppo->

- sostenibile/ (accessed Aug 2, 2022).
23. Decreto Legislativo 8 novembre 2021, n. 196, “Attuazione della direttiva (UE) 2019/904, del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 giugno 2019 sulla riduzione dell’incidenza di determinati prodotti di plastica sull’ambiente” (Pubblicato in G.U. 30 novem www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2021/11/30/21G00210/sg (accessed Aug 2, 2022).
 24. Direttiva del parlamento europeo e del Consiglio 16 dicembre 2020 (UE) 2020/2184 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184> (accessed Aug 2, 2022).
 25. L. Martellone, L. Lucentini, D. Mattei, et al. Rapporto ISTISAN 21|2 - Strategie di campionamento di microplastiche negli ambienti acquatici e metodi di pretrattamento. **2021**.
 26. D.A. Long. The Raman effect; John Wiley & Sons Inc., **2002**.
 27. J.R. Ferraro, K. Nakamoto, C.B. Brown. Introductory Raman spectroscopy; **2003**; Vol. 4.
 28. D. Kourouski, A. Dazzi, R. Zenobi, A. Centrone. Infrared and Raman chemical imaging and spectroscopy at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49 (11), 3315–3347.
 29. Z. Sobhani, X. Zhang, C. Gibson, et al. Identification and visualisation of microplastics/nanoplastics by Raman imaging (i): Down to 100 nm. *Water Res.* **2020**, 174.
 30. B.E. Oßmann, G. Sarau, H. Holtmannspötter, et al. Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Res.* **2018**, 141, 307–316.
 31. V.B.N. Kumar, L.A. Löschel, H.K. Imhof, M.G.J. Löder, C. Laforsch. Analysis of microplastics of a broad size range in commercially important mussels by combining FTIR and Raman spectroscopy approaches. *Environ. Pollut.* **2021**, 269.
 32. X. Guo, H. Lin, S. Xu, L. He. Recent Advances in Spectroscopic Techniques for the Analysis of Microplastics in Food. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, 70 (5), 1410–1422.
 33. M.D. Fernández Severini, N.S. Buzzi, A.D. Forero López, et al. Chemical composition and abundance of microplastics in the muscle of commercial shrimp *Pleoticus muelleri* at an impacted coastal environment (Southwestern Atlantic). *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, 161 (July), 111700.

34. F. Corami, B. Rosso, E. Morabito, et al. Small microplastics (<100 μm), plasticizers and additives in seawater and sediments: Oleo-extraction, purification, quantification, and polymer characterization using Micro-FTIR. *Sci. Total Environ.* **2021**, 797, 148937.
35. A. Kelly, D. Lannuzel, T. Rodemann, K.M. Meiners, H.J. Auman. Microplastic contamination in east Antarctic sea ice. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, 154 (January), 111130.
36. A. de J.N. Velasco, L. Rard, W. Blois, et al. Microplastic and fibre contamination in a remote Mountain lake in Switzerland. *Water (Switzerland)* **2020**, 12 (9), 1–16.
37. E. Le Ru, P. Etchegoin. Principles of surface enhanced Raman spectroscopy; Elsevier, **2009**; Vol. 7.
38. Q.T. Lê, N.H. Ly, M.K. Kim, et al. Nanostructured Raman substrates for the sensitive detection of submicrometer-sized plastic pollutants in water. *J. Hazard. Mater.* **2021**, 402.
39. G. Xu, H. Cheng, R. Jones, et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Facilitates the Detection of Microplastics <1 μm in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, 54 (24), 15594–15603.
40. S.E. Lam, S.N. Mat Nawi, S.F. Abdul Sani, M.U. Khandaker, D.A. Bradley. Raman and photoluminescence spectroscopy analysis of gamma irradiated human hair. *Sci. Rep.* **2021**, 11 (1).
41. L. Litti, M. Meneghetti. Predictions on the SERS enhancement factor of gold nanosphere aggregate samples. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, 21 (28), 15515–15522.
42. B.J. Finlayson-Pitts, J.N. Pitts. CHAPTER 16 - Applications of Atmospheric Chemistry: Air Pollution Control Strategies and Risk Assessments for Tropospheric Ozone and Associated Photochemical Oxidants, Acids, Particles, and Hazardous Air Pollutants. In *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere*; **2000**; pp 871–942.
43. J. Andrade, V. Fernández-González, P. López-Mahía, S. Muniategui. A low-cost system to simulate environmental microplastic weathering. *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, 149 (July), 110663.
44. J.P. Da Costa, A.R. Nunes, P.S.M. Santos, et al. Degradation of polyethylene microplastics in seawater: Insights into the environmental degradation of polymers. *J.*

- Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **2018**, 53 (9), 866–875.
45. V. Fernández-González, J.M. Andrade-Garda, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo. Impact of weathering on the chemical identification of microplastics from usual packaging polymers in the marine environment. *Anal. Chim. Acta* **2021**, 1142, 179–188.
46. E. von der Esch, M. Lanzinger, A.J. Kohles, et al. Simple Generation of Suspensible Secondary Microplastic Reference Particles via Ultrasound Treatment. *Front. Chem.* **2020**, 8 (March), 1–15.
47. N.P. Dhanalakshmi, R. Nagarajan. Ultrasonic Intensification of the Chemical Degradation of Methyl Violet: An experimental Study. *Int. J. Chem. Mol. Nucl. Mater. Metall. Eng.* **2011**, 5 (11), 1019–1024.
48. L. Cai, J. Wang, J. Peng, Z. Wu, X. Tan. Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments. *Sci. Total Environ.* **2018**, 628–629, 740–747.
49. C. Menchaca, A. Álvarez-Castillo, G. Martínez-Barrera, et al. Mechanisms for the modification of nylon 6,12 by gamma irradiation. *Int. J. Mater. Prod. Technol.* **2003**, 19 (6), 521–529.
50. K. Nishikida, J. Coates. Infrared And Raman Analysis Of Polymers (Handbook of plastics analysis); Lobo, H., Bonilla, J. V., Eds.; **2003**.
51. T. Furukawa, H. Sato, Y. Kita, et al. Molecular structure, crystallinity and morphology of polyethylene/ polypropylene blends studied by Raman mapping, scanning electron microscopy, wide angle X-ray diffraction, and differential scanning calorimetry. *Polym. J.* **2006**, 38 (11), 1127–1136.
52. V.F. Alexiou, G.N. Mathioudakis, K.S. Andrikopoulos, A.S. Beobide, G.A. Voyiatzis. Poly(Ethylene terephthalate) carbon-based nanocomposites: A crystallization and molecular orientation study. *Polymers (Basel)*. **2020**, 12 (11), 1–14.
53. E. Rebollar, S. Pérez, M. Hernández, et al. Physicochemical modifications accompanying UV laser induced surface structures on poly(ethylene terephthalate) and their effect on adhesion of mesenchymal cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16 (33), 17551–17559.
54. E. Schmäzlin, B. Moralejo, M. Rutowska, et al. Raman imaging with a fiber-coupled

- multichannel spectrograph. *Sensors (Switzerland)* **2014**, 14 (11), 21968–21980.
55. B. Gewert, M.M. Plassmann, M. Macleod. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2015**, 17 (9), 1513–1521.
 56. F. Cheng, T. Zhang, Y. Liu, Y. Zhang, J. Qu. Non-Negligible Effects of UV Irradiation on Transformation and Environmental Risks of Microplastics in the Water Environment. *J. Xenobiotics* **2021**, 12 (1), 1–12.
 57. A. Sarno, K. Olafsen, S. Kubowicz, et al. Accelerated Hydrolysis Method for Producing Partially Degraded Polyester Microplastic Fiber Reference Materials. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2021**, 6–11.
 58. P. Liu, L. Qian, H. Wang, et al. New Insights into the Aging Behavior of Microplastics Accelerated by Advanced Oxidation Processes. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, 53 (7), 3579–3588.
 59. B. Liu, Q. Jiang, Z. Qiu, et al. Process analysis of microplastic degradation using activated PMS and Fenton reagents. *Chemosphere* **2022**, 298 (February), 134220.
 60. J. Lin, D. Yan, J. Fu, Y. Chen, H. Ou. Ultraviolet-C and vacuum ultraviolet inducing surface degradation of microplastics. *Water Res.* **2020**, 186, 116360.
 61. M.N. Miranda, M.J. Sampaio, P.B. Tavares, A.M.T. Silva, M.F.R. Pereira. Aging assessment of microplastics (LDPE, PET and uPVC) under urban environment stressors. *Sci. Total Environ.* **2021**, 796, 148914.
 62. T. Uchiyama. Water Analysis using a 30 cm cell - Application note UV-0005 JASCO.
 63. A. Mercedi. TESI DI LAUREA MAGISTRALE Sviluppo di metodi per l'analisi di microplastiche in matrici ambientali tramite tecniche Raman e SERS, Università di Padova, **2021**.
 64. P.P. Ghimire, M. Jaroniec. Renaissance of Stöber method for synthesis of colloidal particles: New developments and opportunities. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, 584, 838–865.
 65. U. Hohenester. Making simulations with the MNPBEM toolbox big: Hierarchical matrices and iterative solvers. *Comput. Phys. Commun.* **2018**, 222, 209–228.