



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei"

Corso di Laurea Triennale in Fisica

Tesi di Laurea

## Environmental sensing di nanoaggregati metallici in soluzioni acquose

Relatore

**Prof.ssa Cinzia Sada**

Correlatore

**Dr. Giovanni Bragato**

Laureando

**Sara Ginami**

**2000398**

**Anno Accademico 2022/2023**

## Sommario

Recentemente, il rilascio nell'ambiente di microplastiche (MPs), nanoplastiche (NPs) e di aggregati metallici di taglia sub-micrometrica ha destato crescente preoccupazione all'interno della comunità scientifica. La contaminazione di ecosistemi sia terrestri che acquatici è ampiamente documentata, in particolare per quanto riguarda l'inquinamento da microplastiche, con studi recenti che ne riportano la presenza all'interno di alimenti comunemente consumati, inclusa l'acqua potabile. La rilevazione rapida, accurata e sul campo di contaminati acquatici è fondamentale per permettere processi di environmental sensing efficaci e tempestivi. Alcune tecniche sono state proposte per la rilevazione e l'identificazione di MPs e NPs, ad esempio spettroscopia  $\mu$ Raman,  $\mu$ FTIR e SEM imaging, sebbene molte di queste richiedano tempi ingenti e siano sconvenienti dal punto di vista della strumentazione necessaria e dei relativi costi. Tra le varie metodologie, i sensori basati su nanoparticelle d'oro (AuNP) possiedono le potenzialità per rilevare metalli pesanti, tossine e inquinanti organici e inorganici dispersi in acqua in maniera rapida e con adeguata sensibilità. In tale ambito, la microfluidica svolge un ruolo chiave permettendo non solo di utilizzare ridotti volumi di fluido (dal nL al pL) ma anche di garantire ridotta perturbazione del campione di fluido investigato e, in prospettiva, elevate integrabilità e portabilità. Nel presente lavoro, una piattaforma optofluidica integrata in Niobato di Litio è impiegata con lo scopo di verificare la rilevabilità di AuNP quando disperse in gocce di fase dispersa (acqua) in fase continua (esadecano), immiscibile con la prima. Il dispositivo integra sullo stesso substrato uno stadio microfluidico, per la generazione di gocce, e uno stadio ottico, ovvero un array di guide d'onda in configurazione Mach-Zehnder perpendicolari al canale microfluidico principale. L'accoppiamento di luce laser ( $532nm$ ) alla singola guida permette la rilevazione in tempo reale degli oggetti che scorrono all'interno del canale e lo studio della risposta data dall'interazione tra luce confinata e oggetti dispersi nelle singole gocce. Tale attività mira inoltre ad esplorare le potenzialità delle AuNP quando utilizzate in questa configurazione.

# Indice

<b>Indice</b>	<b>ii</b>
<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1 Optofluidica: environmental sensing in una sola piattaforma</b>	<b>4</b>
1.1 Piattaforma opto-fluidica integrata . . . . .	4
1.1.1 Stadio microfluidico . . . . .	5
1.1.2 Stadio ottico . . . . .	5
1.2 Apparato sperimentale . . . . .	6
1.3 Soluzioni di nanosfere d'oro . . . . .	7
<b>2 Risultati e discussioni</b>	<b>8</b>
2.1 Misure preliminari e tecniche di elaborazione dei dati . . . . .	8
2.2 Modello a singola particella . . . . .	10
2.3 Misure a concentrazione fissata . . . . .	12
2.3.1 Misure alla concentrazione C400 . . . . .	12
2.3.2 Misure alla concentrazione C250 . . . . .	15
Misure alla concentrazione C250 . . . . .	15
2.4 Misure a diametro fissato . . . . .	17
2.5 Misure a taglie più piccole . . . . .	19
2.6 Dynamic Light Scattering . . . . .	19
2.6.1 Stima del diametro a parità di concentrazione . . . . .	20
2.6.2 Stima della concentrazione a parità di diametro . . . . .	22
<b>Conclusioni</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>25</b>

# Introduzione

L'inquinamento ambientale rappresenta una delle criticità più urgenti da affrontare dato che incide sia sulla salute umana che sullo sviluppo sostenibile sia della società che dell'economia. In particolare, desta grande preoccupazione la presenza di tossine ambientali, metalli pesanti e inquinanti organici che derivano dai processi industriali e dalle abitudini scorrette della società moderna. È noto, infatti, che l'impatto di malattie e morti derivanti dall'inquinamento globale dell'aria e dell'acqua rappresenta una grande sfida per la salute pubblica, soprattutto nelle regioni e nei paesi sottosviluppati [1]. Ad esempio, negli Stati Uniti più di quattro milioni di decessi legati a malattie gastrointestinali possono essere attribuiti alla contaminazione dell'acqua. Ad oggi la valutazione degli inquinanti viene effettuata in laboratori centralizzati previa raccolta di campioni: l'uso di apparecchiature ingombranti, infatti, non è compatibile con analisi in situ e in tempo reale, ostacolando così un monitoraggio ambientale rapido ed efficiente.

In questo ambito la cosiddetta diagnostica ambientale si è focalizzata sullo sviluppo di nuovi metodi per la rivelazione e analisi delle tossine e, recentemente, è stato messo in evidenza il ruolo strategico svolto dalle nanoparticelle (NP) per analizzare tossine, ioni metallici e inquinanti organici. Le NP sono normalmente definite come aggregati delle dimensioni tra pochi nanometri a circa  $100\text{ nm}$  e mostrano proprietà peculiari grazie alla taglia ridotta e a fenomeni fisici che si innescano proprio per effetti di superficie che divengono comparabili a effetti di volume quando la taglia approda alle scale nanometriche. Come osservato in [2], è stata suggerita una elevata potenzialità delle NP anche in ambito di rilevamento ambientale, ad oggi non ancora adeguatamente investigata. NP metalliche hanno specifiche proprietà ottiche, di fluorescenza e magnetiche legate all'oscillazione collettiva degli elettroni sulle loro superfici, nota come risonanza plasmonica superficiale (SPR). I plasmoni di superficie (SP) sono oscillazioni elettroniche coerenti che vengono eccitate dalla radiazione elettromagnetica (EM) sull'interfaccia metallo-dielettrico. Le caratteristiche di tali interazioni dipendono dalle proprietà del metallo, dall'ambiente dielettrico e dalla frequenza della radiazione EM con cui le NP interagiscono.

Le stesse proprietà ottiche cambiano anche in modo significativo in seguito al legame con determinate molecole e consentono perciò il rilevamento e la quantificazione di analiti in soluzioni ove le NP possono essere disperse. Questo aspetto gioca un ruolo chiave in applicazioni di monitoraggio ambientale dove sta diventando sempre più importante identificare e quantificare i contaminanti tossici e agenti patogeni rilasciati nell'aria, nel suolo e nell'acqua da rifiuti chimici tossici, sversamenti, rifiuti di produzione e persino serbatoi di stoccaggio sotterranei [3]. Una soluzione promettente per affrontare questo inconveniente è lo sviluppo di strumenti analitici miniaturizzati e potenzialmente implementabili sul campo utilizzando tecnologie microfluidiche [4]. Tra queste riveste un ruolo importante il cosiddetto LOC microfluidico ovvero un dispositivo miniaturizzato che integra diverse funzioni di laboratorio in un unico circuito integrato, comunemente chiamato "*chip*". Si tratta di un dispositivo di dimensioni che in genere pos-

sono variare da pochi millimetri quadrati a centimetri quadri che esegue una o più analisi di laboratorio, consentendo così l'automazione e lo screening ad alto rendimento dei campioni. Non è semplicemente una rete di microcanali ma include anche altre funzionalità come funzioni ottiche, elettroniche e fluidiche.

La tecnologia dei chip microfluidici è importante per l'analisi dei campioni in loco grazie al suo elevato rapporto superficie-volume che consente la miniaturizzazione e la portabilità. Può eseguire l'intero protocollo analitico, come la preparazione del campione, l'applicazione dei reagenti, la reazione biologica e il rilevamento automatico, prevenendo o minimizzando così il rischio di contaminazione del campione e garantendo tempi di risposta rapidi a un costo inferiore. Sfruttando le proprietà distintive della microfluidica (vale a dire, rilevamento e identificazione economicamente vantaggiosi su un ampio spettro), la sensibilità del metodo può essere sviluppata per monitorare rapidamente i campioni microbici ambientali. Oltre a ciò, questo strumento offre ragionevole riproducibilità, robustezza e proprietà di facile utilizzo dei dispositivi in loco e in real time.

La possibilità di coniugare perciò le caratteristiche delle NP con le potenzialità della opto-microfluidica rappresenta un notevole avanzamento perché permette di usare piccole quantità di liquido e al tempo stesso l'elevata sensibilità delle NP alla variazione dell'ambiente con cui sono a contatto (ad esempio il liquido in cui sono disperse, eventualmente contenente inquinanti).

Ad oggi non risultano studi su NP in gocce per applicazioni ambientali. Il presente lavoro di tesi si inquadra dunque in un progetto di ricerca che mira a identificare potenziali prospettive di questi sistemi per environmental sensing. Il primo passo di tale progetto è verificare se e in quali condizioni le NP sono rilevabili in gocce microfluidiche e in che termini si può esser sensibili alla loro taglia e alla loro concentrazione. Tale studio è propedeutico al disperdere tali NP in soluzioni con contaminanti dato che, come prima detto, le NP cambiano la loro risposta in contesti dielettrici differenti. È quindi di prioritaria importanza enucleare il ruolo delle NP nella risposta ottica di una goccia contenente tali NP dal ruolo giocato dalla goccia in quanto "involucro" con interfaccia che interagisce quindi con la radiazione EM.

Il presente lavoro di tesi costituisce uno studio preliminare delle possibilità di rilevazione di nanoaggregati metallici da parte di una piattaforma opto-fluidica integrata già utilizzata per la creazione e caratterizzazione di gocce d'acqua pura [5] [6] [7] e per l'identificazione e rilevazione di soluzioni acquose contaminate da microplastiche di varie taglie [8] [9]. Si è quindi intrapreso uno studio per l'implementazione delle tecniche di rivelazione e di analisi dati al caso delle nanosfere d'oro. La scelta del materiale è stata dettata dalle numerose applicazioni che esso ritrova: l'oro infatti è fortemente impiegato per la costruzione di elementi di elettronica e in vari altri ambiti. Inoltre, nanoparticelle di oro sono fortemente utilizzate per la rilevazione di contaminazione delle acque da parte di inquinanti organici [10] e in campo medico con immunoterapie per la cura del cancro [11]. Essendo questa una valutazione preliminare, sono state utilizzate nanosfere di produzione industriale con diametro variabile tra 10 nm e 400 nm. Effettuando diluizioni successive in PBS 0.1 mM, solvente nel quale le nanosfere si trovano in commercio con caratteristiche simili all'acqua, si sono ottenute soluzioni di varie concentrazioni in modo da valutare la sensibilità dello strumento sia al variare della taglia che al variare della concentrazione. Si sono quindi acquisite le firme spettrali di ciascuna soluzione mediante a produzione di gocce nella piattaforma opto-fluidica e si sono analizzati i risultati sia con tecniche riprese dai lavori precedenti [8] [9] sia introducendone di nuove. Infine, è stata effettuata una valutazione dei risultati ottenuti in riferimento anche all'obiettivo primario di questo lavoro,

ossia la definizione della possibilità di rilevare nanosfere d'oro in soluzioni acquose.

L'elaborato si articola in due capitoli:

- Nel *Capitolo 1* vengono presentati la piattaforma opto-fluidica integrata, l'apparato strumentale per il funzionamento di quest'ultima e per la rivelazione del segnale e le soluzioni di nanosfere d'oro utilizzate.
- Nel *Capitolo 2* viene valutata la possibilità di rivelare nanoparticelle d'oro con l'apparato strumentale descritto in precedenza mediante l'integrazione di vari strumenti per l'analisi dati. Vengono quindi proposti diversi indicatori per la distinzione della taglia e della concentrazione delle nanosfere, confrontando i risultati ottenuti con un modello teorico simulato.

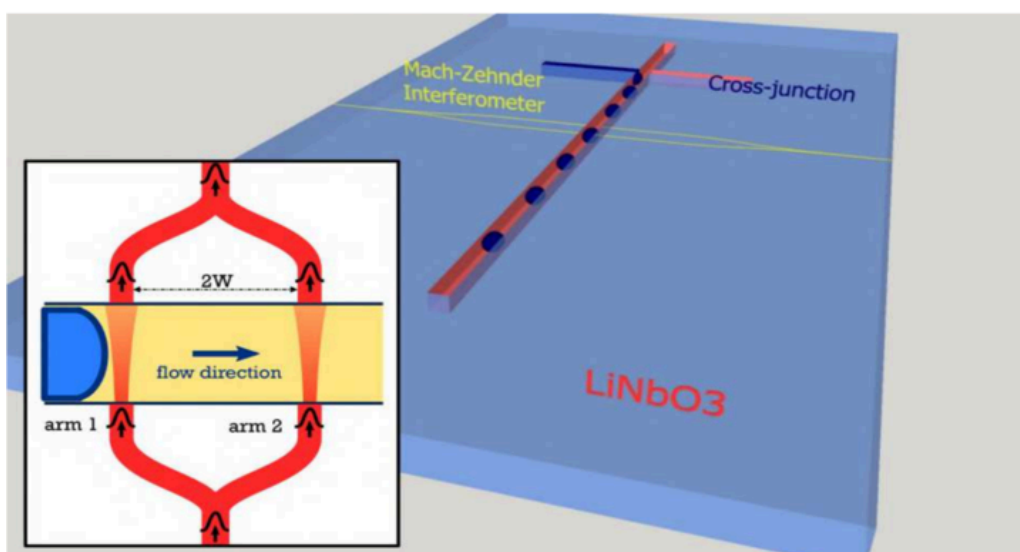
# Capitolo 1

## Optofluidica: environmental sensing in una sola piattaforma

L'apparato sperimentale utilizzato è costituito da due componenti principali: una piattaforma opto-fluidica integrata (denominata anche *chip*), descritta nel paragrafo 1.1, e l'apparato necessario per il funzionamento di essa, analizzato nel paragrafo 1.2. Vengono inoltre presentate in questo capitolo le soluzioni di nanosfere d'oro utilizzate per le prese dati.

### 1.1 Piattaforma opto-fluidica integrata

La generazione e la rilevazione del passaggio di gocce sono state realizzate mediante una piattaforma opto-fluidica integrata. Essa è composta da uno stadio microfluidico (paragrafo 1.1.1), responsabile della formazione delle gocce, e da uno stadio ottico (paragrafo 1.1.2), grazie al quale si osserva in tempo reale il passaggio della goccia.



**Figura 1.1:** Si riporta lo schema della piattaforma opto-fluidica evidenziando la struttura della giunzione a T e la configurazione dell'interferometro Mach-Zehnder.

### 1.1.1 Stadio microfluidico

Lo stadio microfluidico è costituito da una giunzione a forma di croce con direttrici perpendicolari incisa su un substrato di niobato di litio  $LiNbO_3$ . In particolare, la realizzazione dell'apparato strumentale avviene mediante il processo di *microcutting* su LN x-cut commerciale: si effettua una rimozione del substrato per abrasione con l'impiego di un disco a rivestimento diamantato-polimerico montato su una segatrice triassiale DISCO DAD 321 a controllo numerico [7] [12]. Entrambi i canali hanno larghezza media pari a  $(213 \pm 1) \mu m$  e profondità media di  $(108 \pm 1) \mu m$ .

La finitura superficiale ottenuta è di grado ottico in modo che sia possibile accoppiare le guide di luce descritte in 1.1.2. Il circuito microfluidico viene infine richiuso da uno strato di vetro, materiale efficiente per installare le connessioni microfluidiche in silicone.

Una configurazione come quella appena descritta prende il nome di *cross junction*. La T-junction, che verrà utilizzata in questo lavoro, è realizzata chiudendone un'estremità.

Le gocce sono prodotte dalla T-junction grazie alle forze che la fase continua applica sulla fase dispersa (figura 1.2): una è di carattere viscoso, proporzionale alla velocità della fase continua, mentre l'altra è originata dal gradiente di pressione. La combinazione di esse supera la forza capillare, che tende a contrastare la rottura, e si ha così la formazione della goccia [5] [13]. La fase continua utilizzata in questo lavoro è esadecano con SPAN<sup>®</sup> 80% mentre la fase dispersa PBS 0.1 mM con nanosfere d'oro. Ci si riferirà ai relativi flussi con la notazione  $Q_c$  per la fase continua e  $Q_d$  per la fase dispersa.

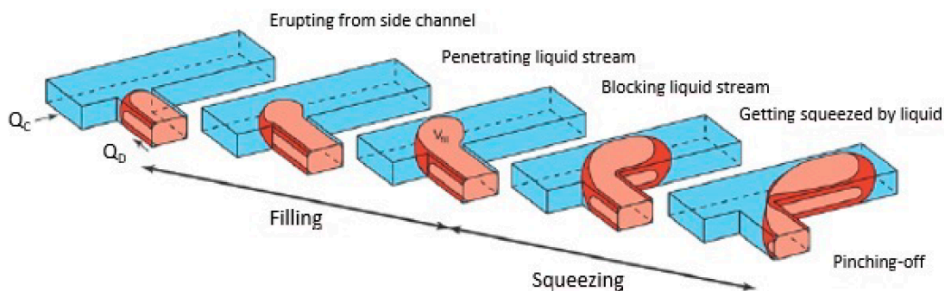


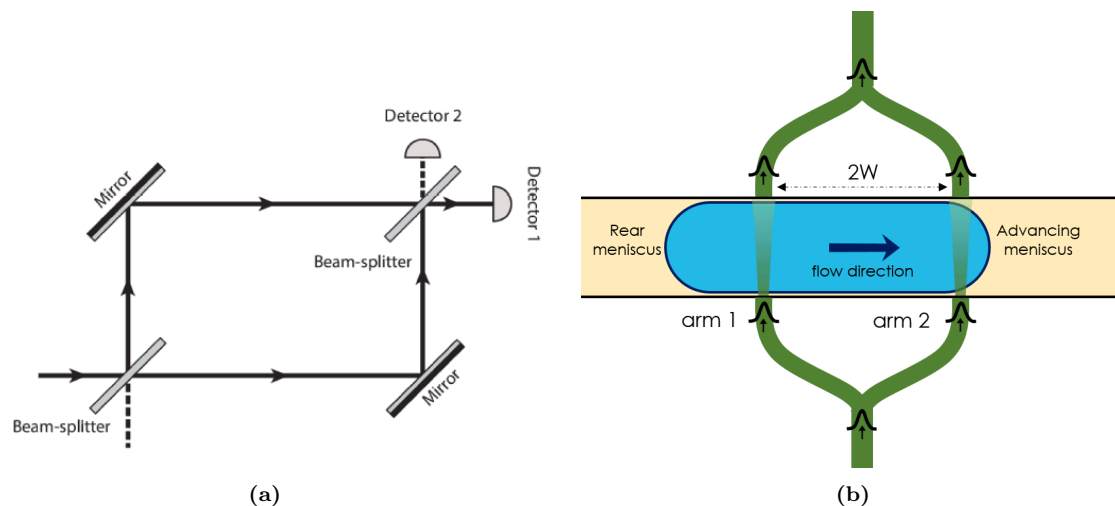
Figura 1.2: Schema della generazione di una goccia in T-junction [6].

### 1.1.2 Stadio ottico

Al *chip* microfluidico descritto in 1.1.1, è integrato uno stadio ottico volto alla rilevazione del segnale prodotto dal passaggio di gocce. Il substrato di niobato di litio viene localmente drogato con ioni di titanio mediante processi termici. Tale procedura è ampiamente diffusa in campo sperimentale per la sua semplicità e per la flessibilità forma delle guide ottiche prodotte. Maggiori dettagli sullo sviluppo e sulla fabbricazione si trovano in [6] [7].

La configurazione utilizzata nel presente lavoro è quella di Mach-Zehnder (MZI, figura 1.3). Essa prevede che il fascio incidente venga diviso in due raggi che si propagano separatamente nel *chip*. Una volta arrivati in prossimità del canale, i fasci entrano in esso ed interagiscono col contenuto. Infine, i raggi rientrano nei rispettivi rami dell'interferometro e vengono riuniti mediante una struttura a Y della guida ottica. Il risultato dell'interferenza dei due fasci verrà rivelato dalla componente ottica dell'apparato sperimentale (paragrafo 1.2) e i segnali permetteranno di distinguere il materiale che sta attraversando il canale microfluidico.



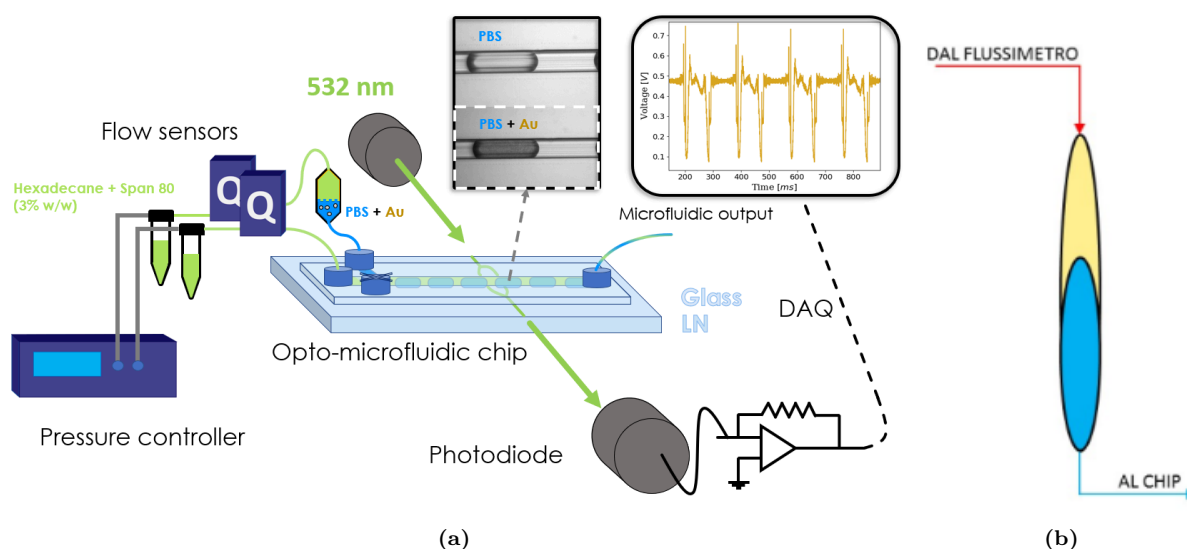


**Figura 1.3:** A sinistra, figura 1.3a, si riporta il modello generale dell'interferometro Mach-Zehnder. A destra, figura 1.3b, è rappresentato lo schema delle guide ottiche sul *chip*.

## 1.2 Apparato sperimentale

L'apparato sperimentale è costituito da componenti microfluidiche, ottiche ed elettroniche che permettono il funzionamento del *chip* descritto in 1.1 e la rilevazione dei segnali.

La componente microfluidica è costituita da una pompa pneumatica Elveflow OBI Mk3 (Elveflow, Parigi, Francia) equipaggiata con tre canali (range di pressione 0 - 8 bar). Tre flussimetri BFS Coriolis10 (Bronkhorst, AK Ruurlo, Olanda) effettuano un controllo del flusso in feedback. Poiché i flussimetri sono strumenti estremamente sensibili, per ovviare il possibile ingresso di corpi estranei all'interno dei loro tubi si è utilizzato un gavitello biconico (schematizzato in figura 1.4b) per introdurre la fase dispersa nel *chip*. Le due estremità del gavitello sono collegate mediante tubicini in silicone una con l'outlet di un flussimetro e l'altra con il *chip*.



**Figura 1.4:** A sinistra, figura 1.4a, si riporta lo schema dell'apparato strumentale collegato al *chip*. A destra, figura 1.4b, viene rappresentata la struttura del gavitello biconico.

La componente ottica è costituita da un laser continuo a diodo di lunghezza d'onda  $532\text{ nm}$  (quindi sui toni del verde) e di potenza  $7.35\text{ mW}$  circa. Esso viene polarizzato passando attra-

verso una lamina a mezz'onda e un polarizzatore e focalizzato all'ingresso del MZI mediante un obiettivo 20 X. La luce passa quindi per il *chip* che è stato a sua volta installato su una piattaforma mobile a sei gradi di libertà (tre traslazionali e tre rotazionali). Dopodiché, il fascio in uscita viene focalizzato su un fotodiodo in silicio da un obiettivo a lunga distanza 50 X.

Infine, la componente elettronica amplifica il segnale tramite un amplificatore a transimpedenza e lo digitalizza grazie alla scheda di acquisizione.

La piattaforma su cui è disposto il *chip* permette di regolarne la posizione in modo da accoppiare correttamente il fascio laser con l'ingresso del MZI e di riaccoppiare il setup se, in seguito a sollecitazioni meccaniche, cala l'efficienza del segnale. Il limite di questa struttura mutevole è che l'accoppiamento può variare per ciascuna presa dati. Verranno quindi introdotti nel capitolo 2 tecniche di analisi indipendenti da esso.

### 1.3 Soluzioni di nanosfere d'oro

Come fase dispersa sono stati utilizzati campioni di PBS 0.1 *mM* con nanosfere d'oro in sospensione stabilizzata senza reagenti. Le soluzioni sono state ottenute mediante diluizioni successive rispetto alle concentrazioni nominali iniziali riportate in tabella 1.1. Si segnalano inoltre altre due concentrazioni, denominate con C1 e C2, che saranno utili per gli studi effettuati nel paragrafo 2.4.

denominazione	diametro [ <i>nm</i> ]	concentrazione [ <i>N/mL</i> ]
C50	50	$3.5 \cdot 10^{10}$
C100	100	$3.8 \cdot 10^9$
C150	150	$3.6 \cdot 10^9$
C1	—	$2.155 \cdot 10^9$
C2	—	$1.445 \cdot 10^9$
C250	250	$7.1 \cdot 10^8$
C400	400	$1.9 \cdot 10^8$

**Tabella 1.1:** Si riportano le concentrazioni iniziali delle soluzioni di nanosfere d'oro in PBS 0.1 *mM*. A ciascuna di queste concentrazioni è stata assegnata una denominazione utile per le analisi che verranno affrontate nel capitolo 2.

Al momento delle diluizioni si sono effettuate due ipotesi: il volume complessivo delle nanosfere e la loro massa sono trascurabili rispetto a quelli della soluzione complessiva.

L'approssimazione di volume ha facilitato il calcolo delle concentrazioni  $C = \frac{N}{V_{PBS} + V_{sfere}}$  considerando  $V_{PBS} \approx 1 - 10 \text{ mL}$ ,  $N \approx 10^7 - 10^8$  nei casi presi in esame e quindi  $V_{sfere} = N \cdot \frac{4}{3} \pi r^3 \approx 10^{-2} - 10^{-3} \text{ mL}$ . Per gli obiettivi di rilevazione, tale approssimazione non compromette la validità dei risultati ottenuti.

L'approssimazione di massa è stata effettuata nel momento in cui, per ottenere una maggiore precisione sul processo di diluizione, si è misurata la quantità di PBS puro e di PBS con oro aggiunti con l'ausilio di una bilancia di precisione. Si ottiene innanzitutto che  $\rho_{acqua} \approx \rho_{PBS}$  in quanto esso è composto principalmente da acqua (circa 99%) e in minor parte da *NaCl* e *KCl* (circa 1%) e altre componenti minoritarie che complessivamente danno un apporto trascurabile alla densità. Si osserva inoltre che, dal calcolo approssimato del volume delle sfere appena effettuato e considerando  $\rho_{Au} = 19320 \text{ kg/m}^3$ , si ottiene  $m_{Au} \approx 10^{-4} \text{ g}$ . Anche in questo caso i valori ottenuti ci permettono di affermare che  $\rho_{PBS} \approx \rho_{PBS+Au}$ .

# Capitolo 2

## Risultati e discussioni

L'obiettivo del presente lavoro è quello di rilevare la presenza di nanosfere d'oro disperse in soluzioni acquose. Vengono quindi presentati i protocolli di misura utilizzati e gli strumenti necessari per l'analisi dati. Si procede poi con lo studio della sensibilità dello strumento in funzione della taglia delle nanosfere a concentrazioni fissate. Viceversa, viene poi valutato l'impatto della concentrazione a diametro fissato. Infine si effettua un breve studio su taglie molto ridotte (diametri di 10 *nm* e 50 *nm*).

### 2.1 Misure preliminari e tecniche di elaborazione dei dati

L'apparato sperimentale utilizzato, con l'integrazione di specifiche tecniche di analisi dati, è estremamente efficiente per la rilevazione di microplastiche in soluzioni acquose, come approfonditamente studiato in [8] [9]. La possibilità di estendere l'applicazione anche in altri contesti di interesse per la rivelazione di contaminanti, quali residui metallici, è quindi di grande utilità per la salvaguardia dell'ambiente. Ci si è quindi interrogati se tali procedure potessero essere implementate in maniera analoga alla rivelazione di aggregati metallici come in questo studio. È infatti noto che nelle acque la presenza di contaminanti è di norma accompagnata da una contaminazione di metalli. Il processo di produzione della plastica impiega spesso stampi metallici per forgiare le forme plastiche cui sono connesse parti metalliche per giunzioni o per contatti elettrici con altri dispositivi. In quest'ultimo caso predomina l'oro, ampiamente in uso in microelettronica.

Per verificare l'efficienza di rivelazione si è quindi scelto di effettuare uno studio preliminare con aggregati metallici di taglia, forma e materiali noti. Il metallo maggiormente impiegato è l'oro e per tale ragione è stato analizzato un campione di nanosfere d'oro con diametro 400 *nm* alla concentrazione originale C400. Il segnale della goccia di PBS con oro (Figura 2.1b) è stato poi confrontato con PBS puro (Figura 2.1a) osservando una netta differenza tra le due: nella regione centrale del segnale si nota la presenza di rapide variazioni (di seguito denominate *spikes* per brevità) solo laddove siano presenti anche nanosfere d'oro (in analogia al caso delle microplastiche analizzato in [8] [9]).

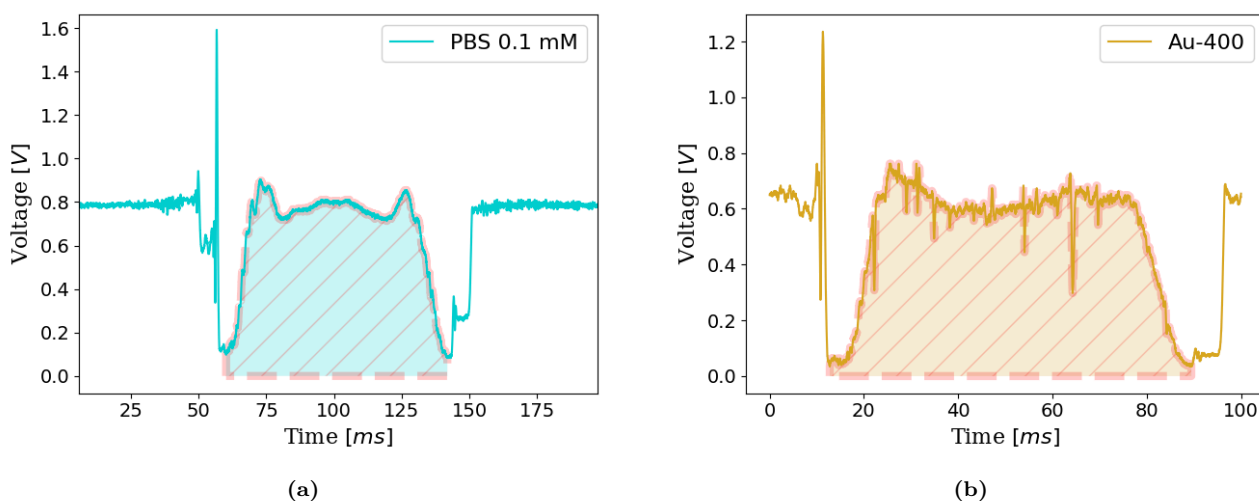
A partire da queste osservazioni sperimentali, si utilizzerà in questa trattazione il seguente quantificatore per stimare la presenza o meno di nanosfere di oro nelle gocce prodotte. Si definisce  $I_N$  come l'integrale della curva sottesa tra i due minimi del segnale all'interno della

goccia normalizzato al valore medio del livello della fase continua e all'intervallo di tempo del passaggio della goccia. Tale parametro così definito è adimensionale.

$$I_{N,i} = \frac{1}{V_{C-hexa}^i} \frac{1}{\Delta t_i} \int_{t-\Delta t_i/2}^{t+\Delta t_i/2} V_i(t) dt$$

$$I_N = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{N,i}$$

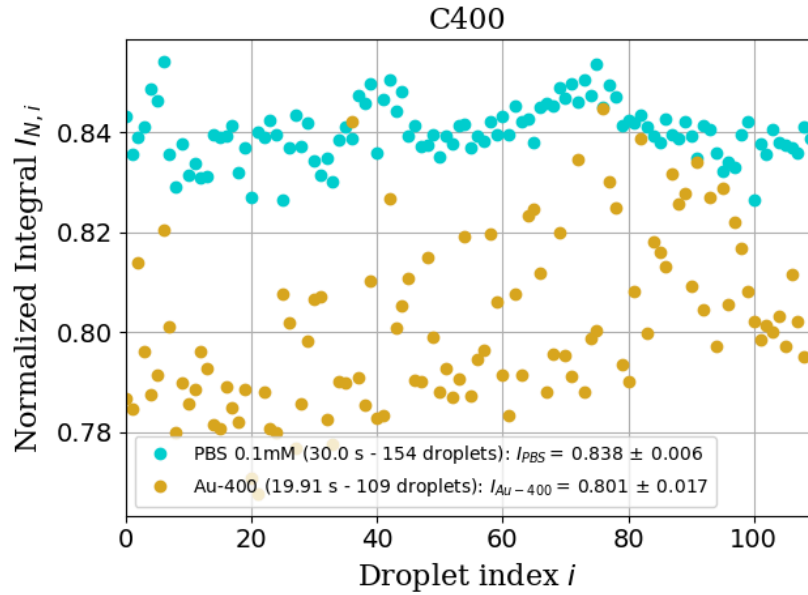
Questo indicatore risulta essere molto soddisfacente perché è facilmente utilizzabile considerando l'elevato numero di dati da analizzare per ogni dataset e soprattutto perché è indipendente dall'accoppiamento ottico della luce nella guida (che varia per ogni presa dati) e dalla forma del segnale.



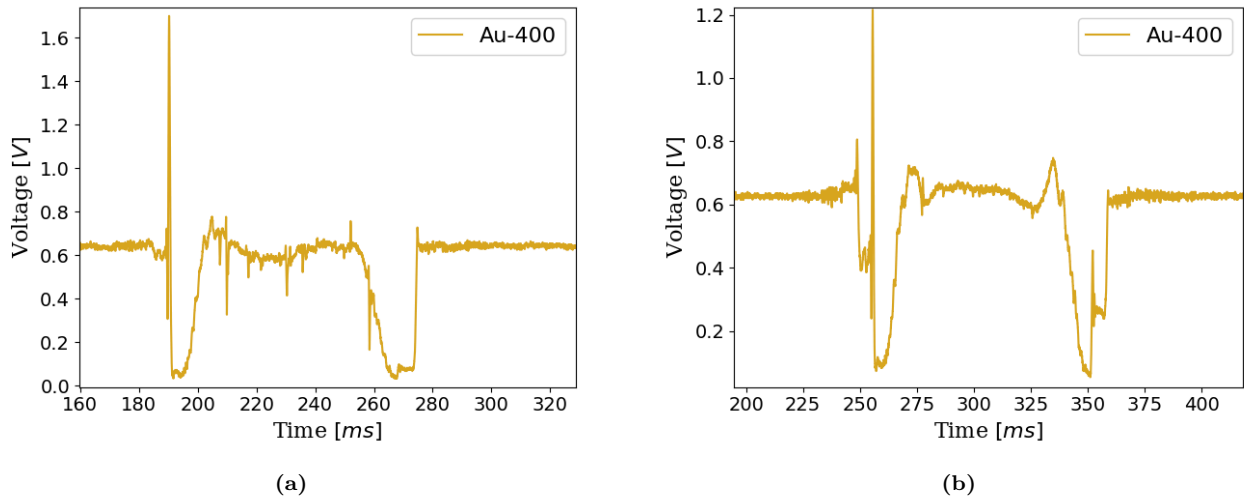
**Figura 2.1:** In Figura 2.1 si riporta un esempio esplicativo del segnale corrispondente alla luce trasmessa attraverso la goccia quando illuminata dalla guida di luce che interseca il canale microfluidico in due configurazioni diverse: nel primo caso (a) si osserva la trasmittività di una goccia di PBS puro al 0.1 mM mentre nel caso (b) si osserva la trasmittività quando sono aggiunte anche nanosfere d'oro. Entrambi i segnali sono stati rilevati alla combinazione di flussi  $Q_c = 10 \mu L/min$  su  $Q_d = 8 \mu L/min$  e ne è stato evidenziato l'integrale  $I_{N,i}$ .

Si osserva in figura 2.2 come si riesca a distinguere in maniera abbastanza netta l'andamento dell'integrale del segnale di PBS puro da quello del segnale con nanosfere d'oro. In questo lavoro l'indicatore per la verifica della presenza di particelle d'oro sarà il PBS puro 0.1 mM ma un confronto analogo si può effettuare con acqua distillata.

Se si confrontano prese dati successive relative al medesimo campione si osserva come le *spikes* siano molto più pronunciate per le prime (figura 2.3a) piuttosto che per le successive (figura 2.3b). Tale fenomeno è tanto più accentuato maggiore è la dimensione delle nanosfere che si vanno a considerare. Infatti, il gavitello così posizionato causa la discesa per gravità dell'oro e dunque una maggiore presenza di esso nei primi campioni. La discrepanza è suggerita non solo dalla forma delle gocce ma anche dall'integrale complessivo che ne risulta, come ben evidente dal confronto tra la figura 2.2 relativa alla prima acquisizione e la figura 2.7e relativa a una delle ultime prese dati.



**Figura 2.2:** Confronto tra l'integrale normalizzato di ciascuna goccia  $I_{N,i}$  di PBS puro 0.1 mM e PBS con nanosfere di diametro 400 nm a C400.



**Figura 2.3:** In figura 2.3a è riportata una goccia di PBS con nanosfere d'oro di diametro 400 nm rilevata nei primi momenti di acquisizione dati. L'elevato numero di *spikes* pronunciate è sintomo della presenza di molte nanosfere, talvolta disposte in agglomerati. In figura 2.3b è riportata una goccia relativa al medesimo campione ma rilevata in un'acquisizione successiva. In essa si ritrovano *spikes* molto meno pronunciate e una forma complessiva più simile a quella del PBS puro.

## 2.2 Modello a singola particella

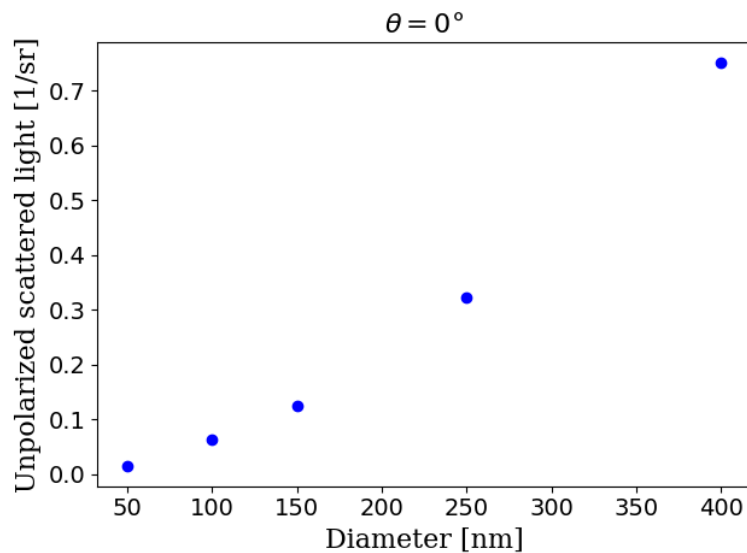
Per avere un riscontro teorico dei risultati ottenuti sperimentalmente, mediante l'utilizzo di opportune librerie di calcolo [14], si sono effettuate alcune simulazioni sull'intensità della luce dispersa dopo l'interazione con una nanoparticella d'oro in acqua a 20°C. Il trend in figura 2.4 propone un andamento crescente dell'intensità in funzione del diametro a  $\theta = 0^\circ$ , ossia all'angolo in corrispondenza della guida di luce in uscita in questo caso.

La spiegazione di questo trend si può ritrovare considerando che a tali diametri ci troviamo nel regime di scattering di Mie [15] nel quale la dipendenza angolare della luce diffusa è pro-

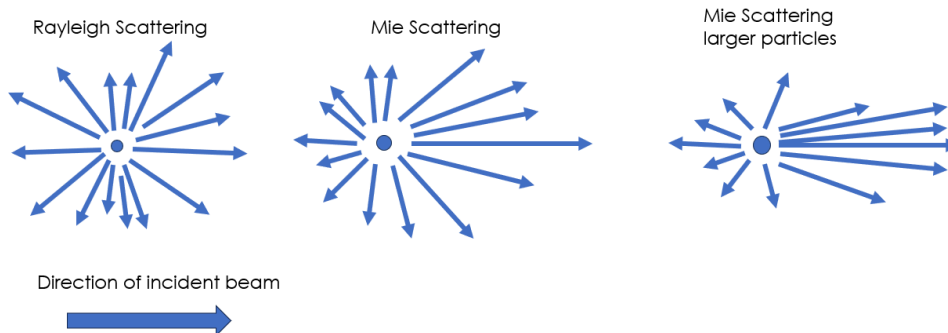
porzionale alla taglia della particella, come si osserva in figura 2.5. Maggiore è il diametro delle particelle, più ci si aspetta che la componente di luce diffusa dalle stesse aumenti e possa contribuire all'incremento dell'intensità di luce trasmessa rilevata dalla guida ottica in uscita. In particolare, si considera un andamento del tipo  $f(D) = aD^m + b$ , in cui  $D$  è la variabile che indica il diametro della nanosfera, in seguito alle considerazioni effettuate in [16] sulle dipendenze dei coefficienti di assorbimento, estinzione e scattering in funzione del diametro delle nanosfere. In questo modello simulato risulta

$$m_{th} = 1.8 \pm 0.1$$

Verrà confrontato tale valore con quelli ottenuti nel paragrafo 2.3 per valutare l'aderenza al modello teorico e spiegare, osservando la distribuzione delle nanosfere all'interno della goccia, eventuali discrepanze. Questo modello a singola particella, infatti, può essere un buon indicatore per il trend generale ma non tiene in considerazione l'eventuale presenza di agglomerati che, come si è osservato in 2.1, possono essere ampiamente rilevati nei casi considerati.



**Figura 2.4:** Il grafico riporta la simulazione, effettuata con [14], dell'andamento dell'intensità diffusa nella direzione di uscita della guida al variare del diametro della nanosfera contenuta in acqua.



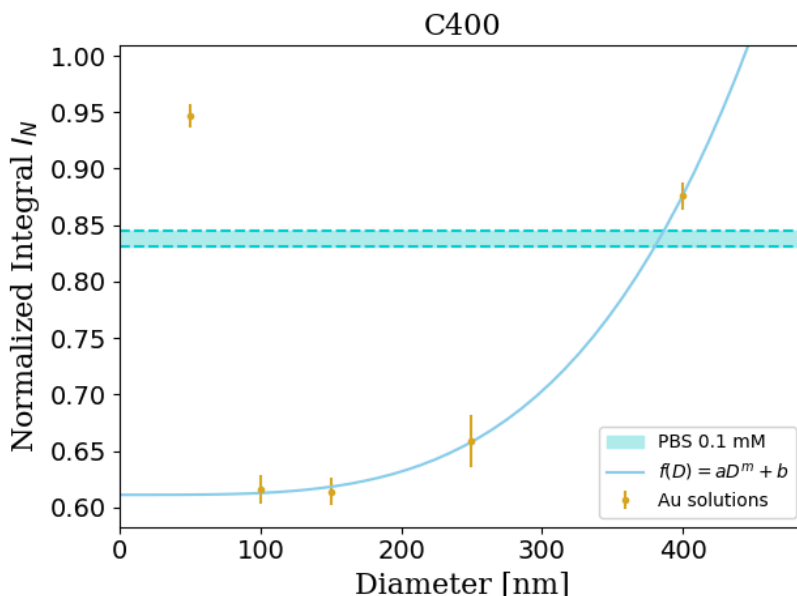
**Figura 2.5:** Si evidenzia la dipendenza angolare dello scattering in funzione della dimensione delle particelle. Per particelle piccole lo scattering avviene in tutte le direzioni indipendentemente dall'angolazione (scattering di Rayleigh). Al crescere del diametro, si ha un cambiamento di regime che introduce una dipendenza angolare della luce riflessa che è più pronunciata più la taglia della particella è maggiore (scattering di Mie).

## 2.3 Misure a concentrazione fissata

Al fine di ottenere informazioni sulla sensibilità dello strumento nella rilevazione delle nanosfere d'oro si sono eseguite una serie di misure a concentrazione fissata.

### 2.3.1 Misure alla concentrazione C400

Poiché nel paragrafo 2.1 si è constatato che è possibile rilevare la presenza di nanosfere d'oro di diametro  $400\text{ nm}$  a C400, partendo dalle soluzioni in dotazione si sono diluite quelle a taglie minori ottenendo così un set di misure a C400 fissata.



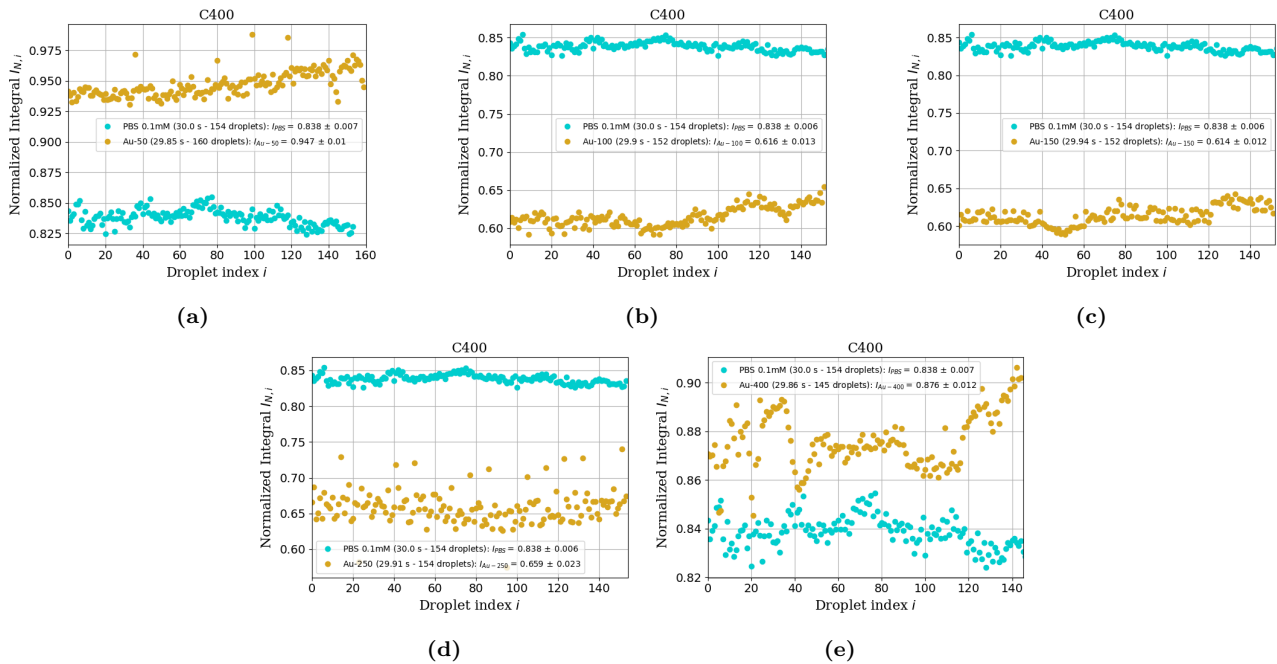
**Figura 2.6:** Il grafico mostra l'andamento dell'integrale normalizzato  $I_N$  a concentrazione fissata C400 al variare del diametro delle nanosfere evidenziando il confronto con PBS puro  $0.1\text{ mM}$ . Viene inoltre riportato il fit  $f(D) = aD^m + b$ .

Come prima cosa si osserva che in tutti i casi considerati le soluzioni contenenti nanosfere possono essere distinte da PBS puro. Dopodiché, per analizzare l'andamento osservato si prendono in considerazione tre fattori: la forma dei segnali, quella della parte centrale del segnale e la stabilità dei flussimetri durante la presa dati.

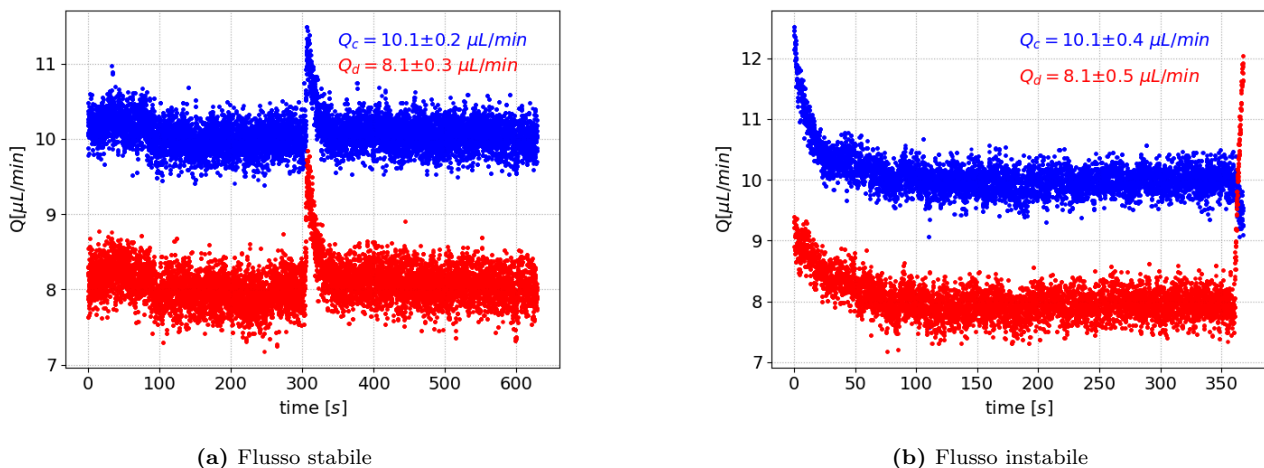
I segnali in figura 2.7 hanno un andamento coerente durante il corso della misurazione, eventuali instabilità sono dovute alle fluttuazioni della risposta dei flussimetri che si riflettono ovviamente in instabilità della trasmittanza ottica rivelata come segnale (figura 2.8).

Analizzando ora la parte centrale del segnale delle singole gocce (figura 2.9) si osserva che quella relativa ai  $50\text{ nm}$  risulta di molto differente rispetto alle altre. La spiegazione di questo fenomeno si può ritrovare considerando che a tale diametro ci troviamo in prossimità del passaggio di regime nello scattering Rayleigh [17] ( $d \approx \frac{\lambda}{10}$ ) per cui si ha uno scattering indipendente dalla direzione angolare. Viceversa, per le altre nanosfere l'andamento crescente dell'integrale normalizzato si spiega mediante la dipendenza angolare dello scattering di Mie, già approfondita in 2.2. Effettuando quindi il fit con la funzione  $f(D) = aD^m + b$  con  $D$  nell'intervallo  $[100\text{ nm}; 400\text{ nm}]$  si trova

$$m_{C400} = 3.7 \pm 0.3$$



**Figura 2.7:** Vengono riportati i grafici degli integrali  $I_{N,i}$  per ciascuna taglia alla concentrazione C400



**Figura 2.8:** In figura 2.8a si riporta un'acquisizione di un flusso stabile, eccetto una *spike* nella zona centrale che comunque non ha inficiato significativamente sulla stabilità del segnale. In figura 2.8b si riporta invece un'acquisizione di un flusso instabile.

L'incompatibilità con il valore  $m_{th}$  ricavato in 2.2 si riconduce a due fattori. Il primo consiste nel fatto che la presenza di più particelle aumenta inevitabilmente la quantità di luce diffusa verso l'uscita della guida. Il secondo relativo alla presenza, seppur in questo caso non estremamente rilevante, di agglomerati che di fatto si comportano come particelle a diametro maggiore.

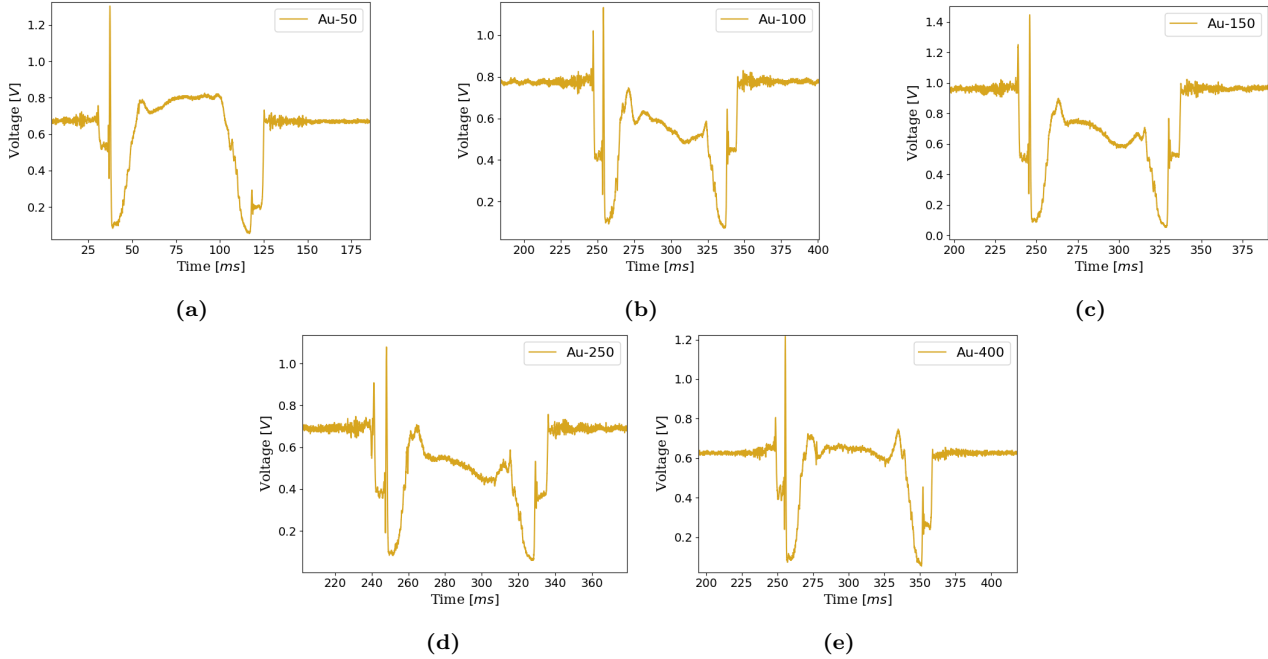
Per le taglie da  $100\text{ nm}$  in poi la forma del segnale della singola goccia si riconduce gradualmente a quella del PBS puro, mantenendo comunque la presenza delle *spikes*. L'inclinazione della parte centrale, che si riduce gradualmente all'aumentare del diametro, è dovuta al fatto che per taglie più piccole le nanosfere tendono a posizionarsi sull'interfaccia abbassando la tensione superficiale e cambiando così la forma della goccia. Tale fenomeno prende il nome di emulsione di Pickering (ampiamente analizzato in [18]): si osserva infatti la proporzionalità



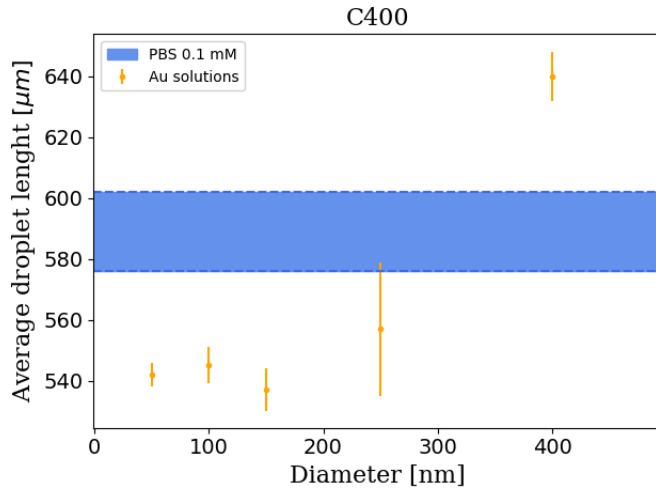
diretta tra la lunghezza  $L$  e la tensione superficiale  $\gamma$  essendo le due grandezze così connesse tra loro secondo questo modello

$$L = (\epsilon + \omega\phi)Ca^{-m}$$

con  $\epsilon$ ,  $\omega$  e  $m$  fattori geometrici,  $Ca = \frac{\mu_c v_c}{\gamma}$  numero di capillarità e  $\phi = \frac{Q_d}{Q_c}$ .



**Figura 2.9:** Si evidenziano i segnali delle singole gocce per ciascuna taglia alla concentrazione C400 alla combinazione  $Q_c = 10 \mu L/min$  su  $Q_d = 8 \mu L/min$ .



**Figura 2.10:** Si riporta l'andamento della lunghezza media delle gocce alla combinazione  $Q_c = 10 \mu L/min$  su  $Q_d = 8 \mu L/min$  in funzione del diametro delle nanosfere. Si evidenzia inoltre il confronto con gocce di PBS puro 0.1 mM ottenute sotto le medesime condizioni.

Per verificare analiticamente quanto appena proposto si vanno ad confrontare le lunghezze delle gocce prodotte e il numero di gocce nell'unità di tempo. Come ci si aspettava dalle considerazioni fatte in precedenza, le gocce contenenti nanosfere a taglia più piccola risultano

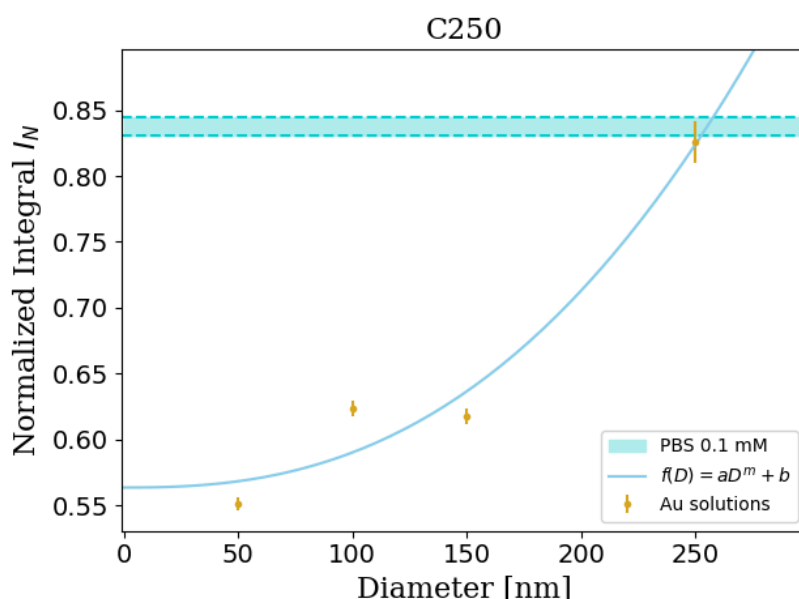
	$n^\circ$ gocce/s
PBS	5.13
50 nm	5.36
100 nm	5.08
150 nm	5.08
250 nm	5.15
400 nm	4.86

**Tabella 2.1:** Si riportano in tabella il numero di gocce prodotte al secondo alla combinazione  $Q_c = 10 \mu L/min$  su  $Q_d = 8 \mu L/min$  evidenziandone il confronto con il PBS puro 0.1 mM.

avere una lunghezza minore (figura 2.10). Il dato relativo ai  $400\text{ nm}$  si discosta dai restanti a causa della maggiore instabilità del suo segnale. Il calcolo del numero di gocce prodotte al secondo, riportato in tabella 2.1, conferma parzialmente il trend: eventuali discostamenti sono da ricondurre alla maggiore sensibilità di quest'ultima stima alle anomalie dei flussimetri e alla comparsa di impurità durante la presa dati.

### 2.3.2 Misure alla concentrazione C250

Avendo ottenuto buoni risultati per la rilevazione di nanosfere d'oro, è stata condotta un'ulteriore analisi effettuando uno studio analogo diluendo le soluzioni iniziali alla concentrazione C250. Ci si aspetta che avendo soluzioni più concentrate si possano avere maggiori conferme dei fenomeni appena analizzati.



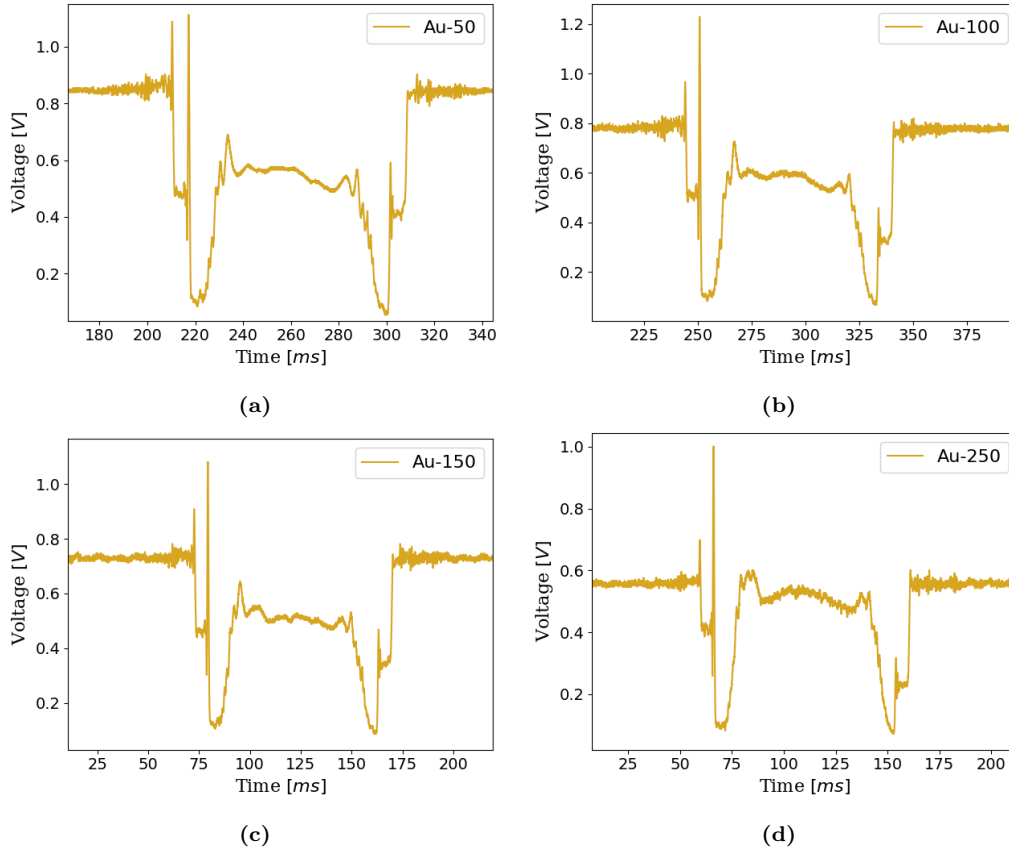
**Figura 2.11:** Il grafico mostra l'andamento dell'integrale normalizzato  $I_N$  a concentrazione fissata C250 al variare della taglia delle nanosfere evidenziando il confronto con PBS puro  $0.1\text{ mM}$ . Eventuali deviazioni standard anomale, come quella relativa ai  $250\text{ nm}$ , sono da ricollegare anche in questo caso a un'instabilità dei flussimetri durante la presa dati. Si riporta inoltre il fit con la funzione  $f(D) = aD^m + b$ .

Come si osserva in figura 2.11, a questa concentrazione, superiore alla C400, il trend viene riproposto analogamente a quanto ottenuto nel paragrafo 2.3.1. L'unica discrepanza riguarda le nanosfere di diametro  $50\text{ nm}$  che in questo caso non rientrano in un regime differente. A concentrazioni maggiori, infatti, esse hanno più probabilità di raggrupparsi in agglomerati: tale disposizione fa rientrare anche queste nanosfere nel regime di scattering di Mie. Si effettua anche in questo caso il fit con la funzione  $f(D) = aD^m + b$  includendo però anche il dato relativo ai  $50\text{ nm}$ , contrariamente a quanto fatto in 2.3.1. Così facendo si ottiene

$$m_{C250} = 2.5 \pm 1.7$$

Anche in questo caso ritroviamo un valore maggiore rispetto a  $m_{th}$  calcolato nel paragrafo 2.2 in accordo con le ipotesi fatte per le soluzioni a concentrazione C400 (paragrafo 2.3.1). Il fatto che  $m_{C250}$  sia minore rispetto a  $m_{C400}$  si può spiegare considerando la maggiore densità ottica che la soluzione più concentrata possiede. L'aumento dei fenomeni di estinzione riduce

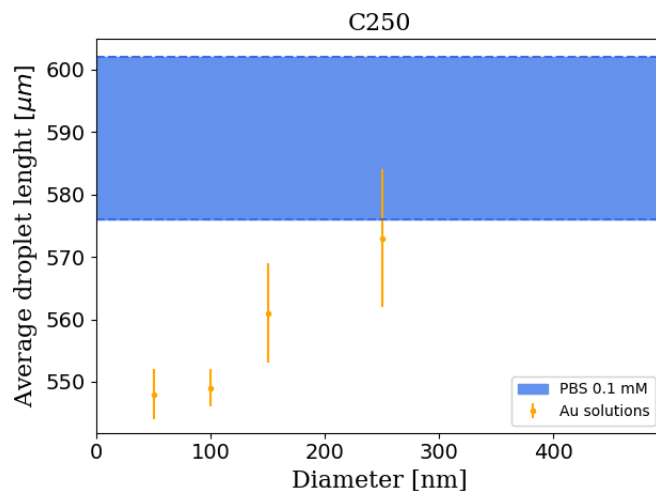
così l'intensità della luce diffusa verso la guida ottica in uscita. La spiegazione dettagliata di questi fenomeni è oltre lo scopo del presente lavoro di tesi, pertanto si rimanda a [19] per una trattazione più approfondita.



**Figura 2.12:** Si riportano, per ciascuna taglia, i segnali delle singole gocce alla concentrazione C250 alla combinazione  $Q_c = 10\mu L/min$  su  $Q_d = 8\mu L/min$ .

Coerentemente con le previsioni teoriche e con le evidenze sperimentali già riscontrate in questo lavoro, la presenza di spikes più pronunciate è proporzionale alla grandezza delle nanosfere presenti nelle soluzioni (figura 2.12). Inoltre, in buon accordo anche con l'andamento osservato in figura 2.11, all'aumentare della taglia si ha una maggiore somiglianza con la forma della goccia di PBS puro (figura 2.1a). La discrepanza al variare della taglia è evidente principalmente nella parte centrale del segnale che suggerisce una variazione della lunghezza della goccia parallelamente al cambiamento della taglia delle particelle.

In figura 2.13 si osserva un pronunciato andamento crescente della lunghezza delle gocce in funzione della dimensione delle nanosfere. È quindi confermata l'ipotesi effettuata con l'osservazione del trend nel grafico 2.10: le nanosfere agiscono da surfattante disponendosi sulla superficie delle gocce e riducendone così la lunghezza. In aggiunta, l'andamento sembra suggerire che tale caratteristica sia tanto più marcata tanto più sono piccole le nanosfere. Perciò, questo criterio in linea generale è utile per verificare la presenza o meno di nanosfere d'oro nella soluzione e a concentrazioni sufficientemente elevate è anche un buon indicatore sulla dimensione di tali particelle.



**Figura 2.13:** Si riporta l'andamento della lunghezza media delle gocce alla combinazione  $Q_c = 10 \mu L/min$  su  $Q_d = 8 \mu L/min$  in funzione del diametro delle nanosfere. Si evidenzia inoltre il confronto con gocce di PBS puro  $0.1 mM$  ottenute sotto le medesime condizioni.

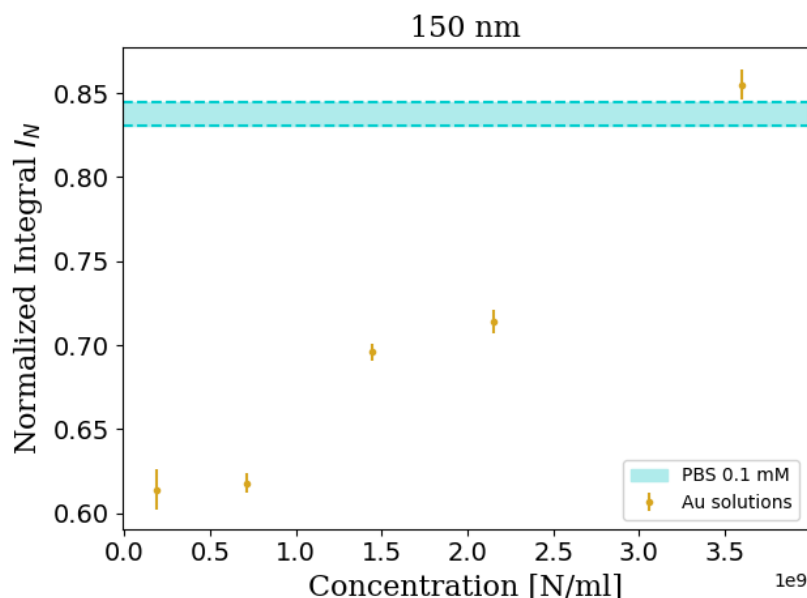
	$n^\circ$ gocce/s
PBS	5.13
50 nm	5.41
100 nm	5.04
150 nm	5.75
250 nm	5.30

**Tabella 2.2:** Si riportano in tabella il numero di gocce prodotte al secondo alla combinazione  $Q_c = 10 \mu L/min$  su  $Q_d = 8 \mu L/min$  evidenziandone il confronto con il PBS puro  $0.1 mM$ .

## 2.4 Misure a diametro fissato

Avendo stabilito nel paragrafo 2.3 che, non solo siamo in grado di rilevare la presenza di nanosfere di oro, ma riusciamo anche a stabilire dei criteri per determinarne la dimensione, si procede ulteriormente con l'analisi della sensibilità dello strumento. Ci si focalizza ora su uno studio a diametro fissato investigando così fino a che livello di diluizione è possibile distinguere in maniera sufficientemente netta le nanosfere.

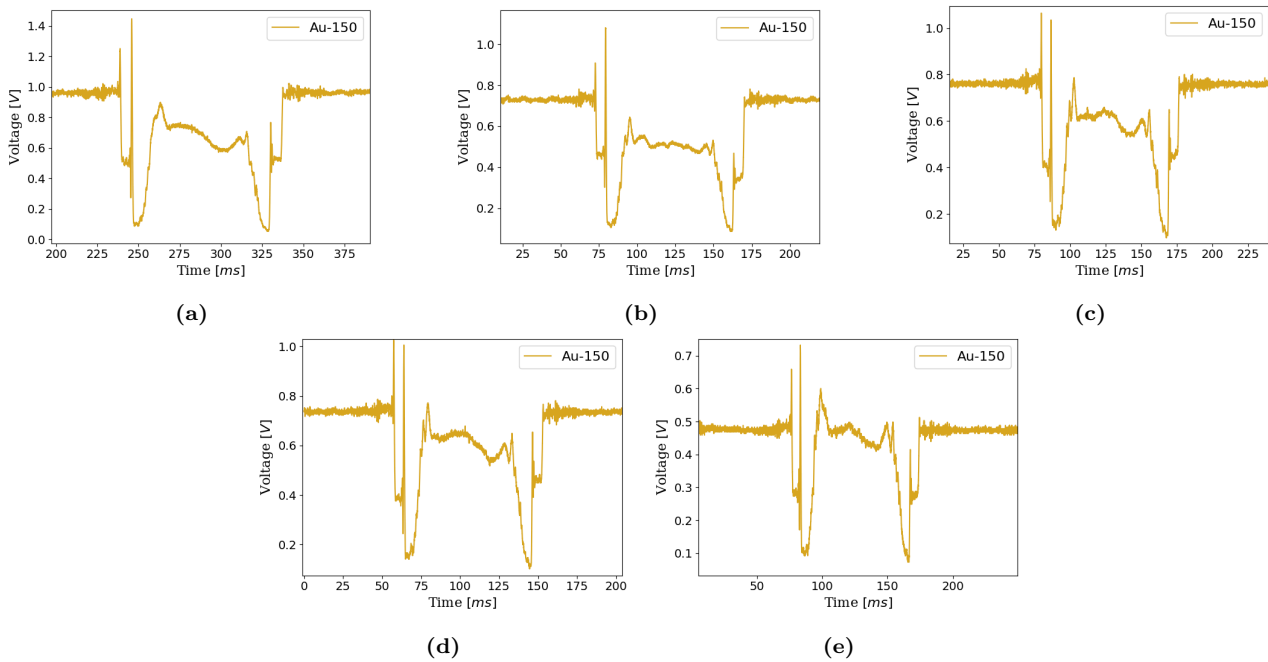
Mediante diluizioni successive, vengono studiate cinque concentrazioni diverse delle nanosfere di diametro  $150 nm$ .



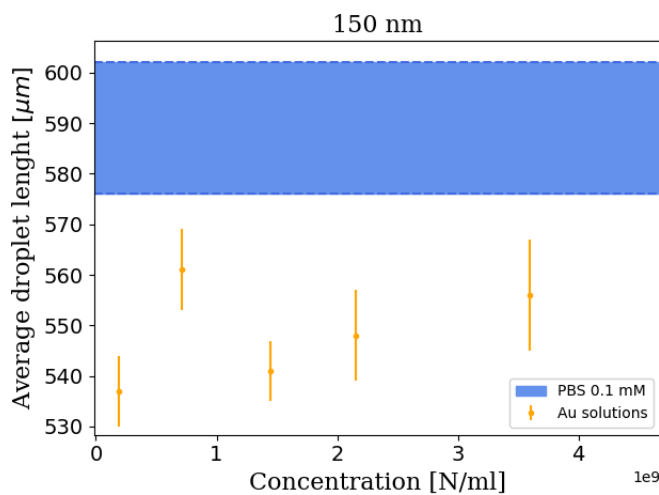
**Figura 2.14:** Il grafico mostra l'andamento dell'integrale normalizzato  $I_N$  per soluzioni di nanosfere di diametro  $150 nm$  a cui viene variata la concentrazione.

Il grafico in figura 2.14 evidenzia l'andamento crescente dell'integrale normalizzato  $I_N$  al crescere della concentrazione. Tale fenomeno può essere spiegato anche in questo caso dalla tendenza delle nanosfere a disporsi in agglomerati: a concentrazione maggiori il numero di agglomerati aumenta e con esso la dipendenza angolare dello scattering della luce del laser. Si ritrova quindi un andamento crescente in analogia a quelli riportati nel paragrafo 2.3 considerando di fatto, come già supposto in precedenza, gli agglomerati come particelle di taglia superiore.

Evidenza di tale supposizione si ritrova anche nel segnale di singole gocce (figura 2.15): al crescere della concentrazione si ha un aumento sia in numero che in ampiezza delle *spikes*.



**Figura 2.15:** Si evidenziano i segnali delle singole gocce contenenti nanosfere di diametro 150 nm al variare della concentrazione alla combinazione  $Q_c = 10 \mu\text{L}/\text{min}$  su  $Q_d = 8 \mu\text{L}/\text{min}$ .



**Figura 2.16:** Si riporta l'andamento della lunghezza media delle gocce alla combinazione  $Q_c = 10 \mu\text{L}/\text{min}$  su  $Q_d = 8 \mu\text{L}/\text{min}$  in funzione della concentrazione delle nanosfere con diametro 150 nm. Si evidenzia inoltre il confronto con gocce di PBS puro 0.1 mM ottenute sotto le medesime condizioni.

	$n^\circ \text{ gocce}/s$
PBS	5.13
C400	5.08
C250	5.75
C2	5.37
C1	5.35
C150	5.34

**Tabella 2.3:** Si riportano in tabella il numero di gocce prodotte al secondo alla combinazione  $Q_c = 10 \mu\text{L}/\text{min}$  su  $Q_d = 8 \mu\text{L}/\text{min}$  evidenziandone il confronto con il PBS puro 0.1 mM.

Valutando ora la lunghezza delle singole gocce prodotte, non si osserva un trend netto nella distribuzione dei dati (figura 2.16). Tuttavia si rileva comunemente l'azione di surfattante da parte delle nanosfere confermata anche dall'inclinazione nella parte centrale dei segnali in figura 2.15.

## 2.5 Misure a taglie più piccole

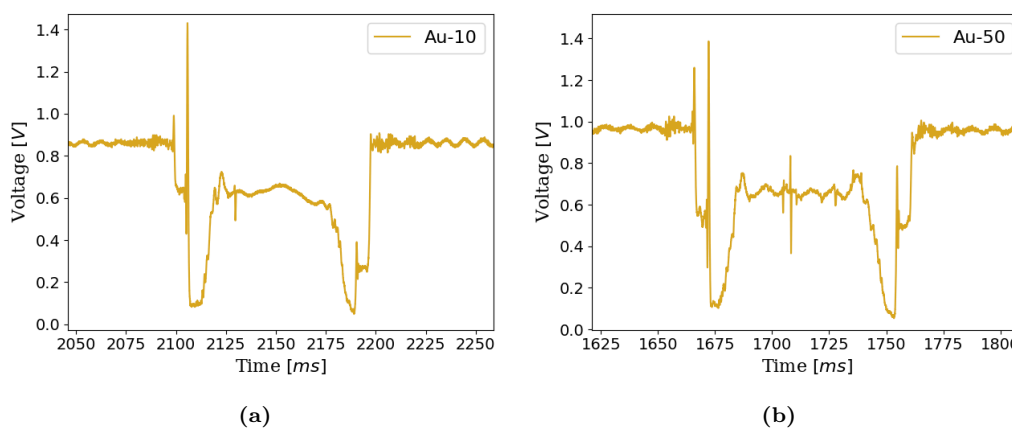
In questo paragrafo si approfondiscono ulteriormente le possibilità di rilevazione di nanosfere d'oro studiando i segnali relativi a soluzioni a C50 di particelle di 10 nm e 50 nm.

	$I_N$
PBS	$0.838 \pm 0.007$
10 nm	$0.595 \pm 0.009$
50 nm	$0.580 \pm 0.017$

**Tabella 2.4:** Si riportano i valori dell'integrale normalizzato  $I_N$  a concentrazione fissata C50 per nanosfere di 10 nm e 50 nm. Si evidenzia il confronto con il segnale di PBS 0.1 mM.

I valori riportati in tabella 2.4 permettono di affermare che, a determinati livelli di concentrazione, l'apparato strumentale è in grado di rilevare la presenza di nanosfere di diametro fino a 10 nm nelle soluzioni esaminate.

Questo studio a concentrazione elevata permette anche di portare un'ulteriore evidenza all'ipotesi sulla tendenza delle nanosfere a disporsi in agglomerati. Si osserva infatti in figura 2.17 che sono presenti numerose *spikes* di ampiezza notevole, soprattutto nel caso dei 50 nm (figura 2.17b).



**Figura 2.17:** Si riportano i segnali delle singole gocce relative a ciascuno dei due diametri analizzati alla combinazione  $Q_c = 10 \mu\text{L}/\text{min}$  su  $Q_d = 8 \mu\text{L}/\text{min}$ .

## 2.6 Dynamic Light Scattering

Si introduce infine un altro metodo per la stima della dimensione delle nanosfere e della loro concentrazione basato sul *Dynamic Light Scattering*, ampiamente diffuso nello studio di nanoparticelle e analizzato in [20]. Si valuta l'*autocorrelation function*, ossia la misura di similitudine come funzione di traslazione temporale del segnale con se stesso, che nei casi discreti, in cui

rientra anche quello in esame poiché la frequenza di campionamento è di  $50\text{ kHz}$ , è definita come

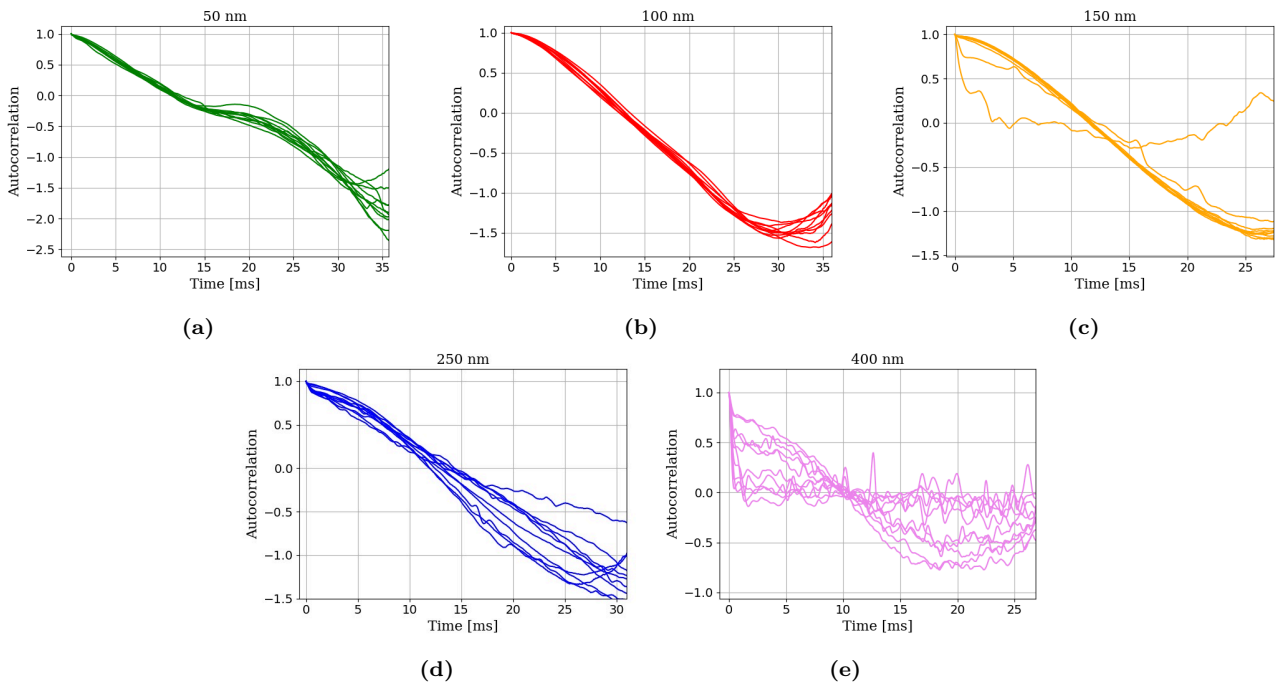
$$\hat{R}(k) = \frac{1}{(n-k)\sigma^2} \sum_{t=1}^{n-k} (X_t - \mu)(X_{t+k} - \mu)$$

con  $n$  numero di osservazioni,  $\mu$  valore di aspettazione e  $\sigma$  deviazione standard.

Generalmente tale funzione è determinata dal solo moto browniano delle particelle ma in questo caso si devono considerare anche moti naturali presenti nella goccia dovuti alla geometria, alla tensione superficiale e al movimento della goccia stessa studiati in [21].

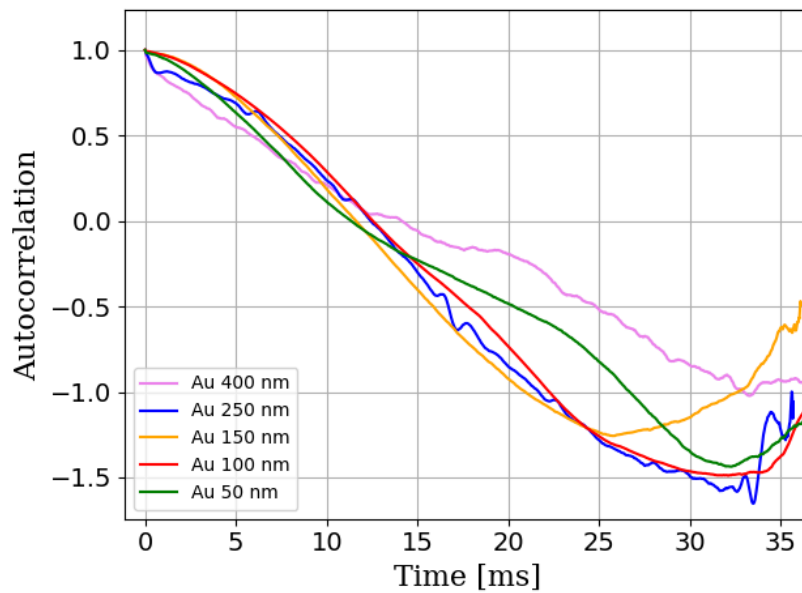
### 2.6.1 Stima del diametro a parità di concentrazione

Si valuta inizialmente la possibilità di utilizzare l'*autocorrelation function* come indicatore della taglia delle nanosfere a parità di concentrazione. Analizzando i risultati ottenuti per la concentrazione C400 (paragrafo 2.3.1), si osserva come essa sia effettivamente efficace per tale distinzione: come si osserva in figura 2.18 le funzioni presentano un andamento caratteristico a seconda della taglia.



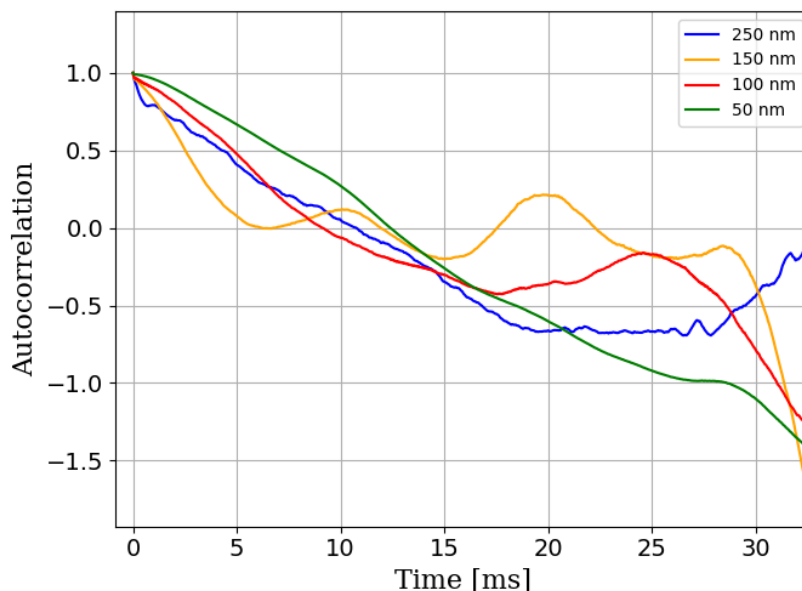
**Figura 2.18:** Per ciascuna taglia si riportano le *autocorrelation function* ottenute dall'analisi di dieci gocce rappresentative lungo il segnale.

Effettuando ora un confronto tra i vari andamenti (figura 2.19) si osserva che risulta possibile evidenziare diverse regioni del grafico da utilizzare come riferimento per la stima delle dimensioni delle nanosfere d'oro.



**Figura 2.19:** Il grafico mostra il confronto tra le *autocorrelation function* relative a ciascun diametro alla concentrazione C400 ottenute mediando quelle calcolate in figura 2.18.

Anche all'aumentare della concentrazione l'*autocorrelation function* rimane un indicatore molto efficiente. Risulta infatti evidente in figura 2.20 che anche per le soluzioni a concentrazione C250 (paragrafo 2.3.2) si ripropongono andamenti caratteristici al variare della taglia.



**Figura 2.20:** Il grafico mostra il confronto tra le *autocorrelation function* relative a ciascun diametro alla concentrazione C250.

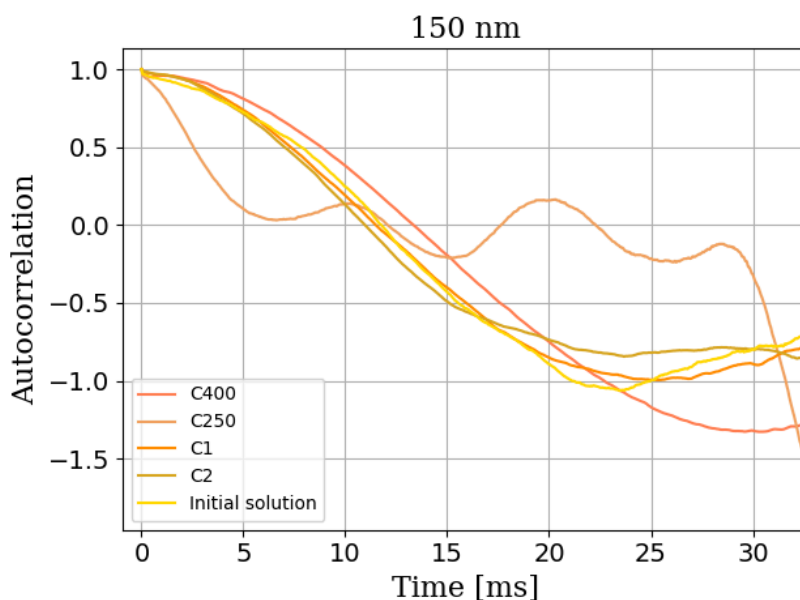
In particolare, confrontando i grafici ottenuti per le due concentrazioni (figura 2.19 per C400 e figura 2.20 per C250), si osserva come per concentrazioni maggiori si abbia un discostamento più evidente tra le varie taglie sin dalla parte iniziale del grafico e un andamento più frastagliato



di ciascuna funzione che si ricollega alla maggiore presenza di agglomerati. Inoltre, la pendenza delle curve è più pronunciata minore è la concentrazione delle nanosfere.

### 2.6.2 Stima della concentrazione a parità di diametro

A partire dalle considerazioni appena fatte, si valuta la proposta di utilizzare l'*autocorrelation function* non solo come criterio per la stima della grandezza delle nanosfere ma anche per la concentrazione di esse. L'analisi sulle prese dati delle soluzioni di nanosfere di 150 nm a varie concentrazioni (paragrafo 2.4) conferma l'efficacia di questo indicatore. Infatti, nonostante non sia sufficientemente sensibile per distinguere in maniera netta le concentrazioni più vicine quali C150, C1 e C2, si osserva che per concentrazioni sufficientemente diverse (ad esempio confrontando tra loro C400, C250 e C150) le *autocorrelation function* presentano un andamento caratteristico.



**Figura 2.21:** Si riportano nel grafico le *autocorrelation function* a diametro 150 nm fissato al variare della concentrazione.

# Conclusioni

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di rilevare la presenza di nanoaggregati metallici dispersi in soluzioni acquose mediante una piattaforma opto-fluidica integrata. L'apparato strumentale e le tecniche di elaborazione dei dati utilizzati hanno permesso di ottenere buoni risultati per la rilevazione di microplastiche in soluzioni acquose ([8] [9]) stimolando l'interesse per ulteriori applicazioni nell'ambito della rilevazione di nanoparticelle. In particolare, sono state esaminate soluzioni di nanosfere d'oro di varie taglie disperse in PBS 0.1 mM. Innanzitutto si è verificata la possibilità di distinguere soluzioni di PBS puro da soluzioni contaminate da nanoparticelle. Tale misura preliminare ha permesso di svolgere uno studio più articolato sulle possibilità, mediante opportuni strumenti di analisi dati, di poter distinguere la concentrazione e la taglia delle nanosfere.

Effettuando diversi studi a concentrazione fissata, è stato possibile definire tre criteri per distinguere la taglia delle nanosfere. Il primo criterio di base sull'impiego di un indicatore correlato alla trasmittanza ottica relativa ovvero l'integrale normalizzato  $I_N$  definito nel paragrafo 2.1. Il secondo criterio sfrutta la stima della lunghezza delle singole gocce mentre il terzo impiega la cosiddetta funzione di autocorrelazione (*autocorrelation function*). Questi indicatori hanno inoltre fornito importanti informazioni della disposizione delle nanosfere all'interno della goccia: la loro azione di surfattante evidenzia infatti la tendenza a disporsi sulla superficie andando così a ridurre la lunghezza delle gocce. Inoltre, all'aumentare della concentrazione risulta evidente, anche dall'analisi dei singoli segnali, la presenza sempre maggiore di agglomerati.

Questo ultimo punto è stato ulteriormente validato da uno studio a diametro fissato e a concentrazione variabile. Si è infatti riscontrato come all'aumentare della concentrazione ci fossero un sempre più *spikes* di ampiezza maggiore. Inoltre, anche in questo caso gli indicatori definiti in precedenza hanno permesso di elaborare un criterio qualitativo per la distinzione della taglia delle nanosfere.

L'elaborazione di un modello teorico mediante opportune simulazioni computazionali ha permesso di confrontare i risultati ottenuti e di spiegare mediante teorie già elaborate tali andamenti. Ci si è quindi riferiti alla teoria dello scattering di Mie per spiegare l'andamento della luce diffusa in funzione della taglia e della concentrazione delle nanosfere. Le discrepanze dal modello teorico a singola particella hanno permesso di validare ulteriormente l'ipotesi della formazione di agglomerati.

Infine, sono state effettuate delle misure su nanosfere di taglie ridotte a concentrazioni elevate in modo da verificare la sensibilità dello strumento. La possibilità di rilevare anche particelle con diametro fino a 10 nm è stata accertata, confermando così l'ottima sensibilità dello strumento.

Fatte queste premesse, si considera raggiunto l'obiettivo del presente lavoro di tesi perché la piattaforma opto-fluidica integrata costituisce un ottimo strumento per la rilevazione di nano-

sfere d'oro in soluzioni acquose. Inoltre, anche gli strumenti di analisi dati utilizzati, che sono stati ripresi da precedenti lavori volti alla rivelazione di microplastiche in soluzioni acquose ([8] [9]), sono stati ritenuti adatti anche per la descrizione dei fenomeni di diffusione, assorbimento ed estinzione propri delle nanosfere d'oro.

Questo lavoro di tesi costituisce anche un punto di partenza per uno studio congiunto di rilevazione di microplastiche e nanoaggregati metallici in soluzioni acquose, argomento di grande interesse per la comunità scientifica per fronteggiare l'inquinamento delle acque terrestri causato dalla dispersione di nanoparticelle.

Infine, sebbene siano stati analizzati diversi criteri qualitativi per definire il grado di contaminazione delle soluzioni (mediante la stima della taglia delle nanosfere e della loro concentrazione), partendo dalle considerazioni fatte in questo lavoro si può effettuare un'analisi più dettagliata in modo da definire anche quantitativamente degli indicatori sulle dimensioni e sulle concentrazioni delle particelle contaminati.

# Bibliografia

- [1] Pedro Mesquita, Liyuan Gong, and Yang Lin. Low-cost microfluidics: Towards affordable environmental monitoring and assessment. *Frontiers in Lab on a Chip Technologies*, 1:1074009, 2022.
- [2] Jinwoo Cheon and Jae-Hyun Lee. Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology. *Accounts of chemical research*, 41(12):1630–1640, 2008.
- [3] Barna Paul and Alka Tiwari. A brief review on the application of gold nanoparticles as sensors in multi dimensional aspects. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1(1), 2015.
- [4] Bidhan Chandra Dhar and Nae Yoon Lee. Lab-on-a-chip technology for environmental monitoring of microorganisms. *BioChip Journal*, 12:173–183, 2018.
- [5] Giovanni Bragato. Velocimetro per gocce microfluidiche basato su di un interferometro fotonico integrato in niobato di litio. 2019.
- [6] Giacomo Bettella et al. Integrated opto-microfluidic lab-on-a-chip in lithium niobate for droplet generation and sensing. 2016.
- [7] Giacomo Bettella, Gianluca Pozza, Sebastian Kroesen, Riccardo Zamboni, Enrico Baggio, Carlo Montevicchi, Annamaria Zaltron, Ludovic Gauthier-Manuel, Giampaolo Mistura, Claudio Furlan, et al. Lithium niobate micromachining for the fabrication of microfluidic droplet generators. *Micromachines*, 8(6):185, 2017.
- [8] EMANUELE PERFETTI. Droplet-based optofluidics sensing of micro plastics in aqueous solutions.
- [9] SIMONE MARCHETTI. Light based sensing di microplastiche disperse in soluzioni acquose.
- [10] Brajesh Kumar. Green synthesis of gold, silver, and iron nanoparticles for the degradation of organic pollutants in wastewater. *Journal of Composites Science*, 5(8):219, 2021.
- [11] Weibo Cai, Ting Gao, Hao Hong, and Jiangtao Sun. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, science and applications*, pages 17–32, 2008.
- [12] Annamaria Zaltron, Giacomo Bettella, Gianluca Pozza, R Zamboni, M Ciampolillo, N Argiolas, C Sada, Sebastian Kroesen, Michael Esseling, and Cornelia Denz. Integrated optics on lithium niobate for sensing applications. In *Optical Sensors 2015*, volume 9506, pages 50–59. SPIE, 2015.

- [13] Gordon F Christopher, N Nadia Noharuddin, Joshua A Taylor, and Shelley L Anna. Experimental observations of the squeezing-to-dripping transition in t-shaped microfluidic junctions. *Physical review E*, 78(3):036317, 2008.
- [14] Scott Prahl. miepython: Pure python implementation of Mie scattering, August 2023. If you use this software, please cite it as below.
- [15] Thomas Wriedt. A review of elastic light scattering theories. *Particle & Particle Systems Characterization: Measurement and Description of Particle Properties and Behavior in Powders and Other Disperse Systems*, 15(2):67–74, 1998.
- [16] Prashant K Jain, Kyeong Seok Lee, Ivan H El-Sayed, and Mostafa A El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *The journal of physical chemistry B*, 110(14):7238–7248, 2006.
- [17] Andrew T Young. Rayleigh scattering. *Applied optics*, 20(4):533–535, 1981.
- [18] Jie Wu and Guang-Hui Ma. Recent studies of pickering emulsions: particles make the difference. *Small*, 12(34):4633–4648, 2016.
- [19] Xiong Liu, Mark Atwater, Jinhai Wang, and Qun Huo. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1):3–7, 2007.
- [20] Fanny Caputo, Jeffrey Clogston, Luigi Calzolari, M Rösslein, and Adriele Prina-Mello. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of euncl and nci-ncl. a step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release*, 299:31–43, 2019.
- [21] Charles N Baroud, Francois Gallaire, and Rémi Dangla. Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip*, 10(16):2032–2045, 2010.