

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Sviluppo di un sensore elettrochimico per la
rilevazione di perfluorottanosulfonato(PFOS),acido
perfluoroottanoico(PFOA) ed acido
perfluorobutanoico(PFBA) in soluzioni acquose**

Relatore

Prof. Alessandro Paccagnella

Laureando

Alessandro Serraglio

Correlatori

Prof. Lucio Litti

Dott. Stefano Bonaldo

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Data di laurea 25/09/2024

*Condivido questo traguardo con i miei genitori,
senza il loro supporto non avrei mai potuto affrontare questo percorso.*

*Ringrazio la mia famiglia ed i miei amici
per la serenità con cui mi hanno accompagnato in questi anni,
spero di essere sempre stato in grado di ricambiare.*

*Ringrazio l'università e la città di Padova
per le esperienze che ho potuto fare
e le persone che ho potuto incontrare,
in particolare i tutori di 18correttolode.
Dedico questo traguardo a mia nonna.*

Indice

1	Introduzione	1
1.1	PFAS:origine,struttura e caratteristiche chimiche	1
1.2	Diffusione dei PFAS	2
1.3	Tossicità per l'uomo	4
1.4	La rilevazione dei PFAS	5
1.4.1	Metodologia analitica di riferimento	6
1.4.2	Metodologie emergenti	8
2	Misurazioni elettrochimiche	15
2.1	Modello dell'interfaccia elettrodo-soluzione	15
2.1.1	Caratteristiche dell'Interfaccia	15
2.1.2	Modelli di Interfaccia	15
2.2	Spettroscopia di impedenza elettrochimica	18
2.3	Voltammetria	18
3	Materiali,strumenti e protocolli	21
3.1	Costruzione dell'elettrodo	21
3.1.1	Ablazione	21
3.1.2	Spray coating	22
3.1.3	Funzionalizzazione della superficie	22
3.1.4	Soluzioni di prova	23
3.2	Misurazioni con EIS	23
3.2.1	Strumentazione	23
3.2.2	Procedimento	25
4	Risultati	27
4.1	Misurazioni EIS con funzionalizzazione di GV38	27
4.1.1	misurazione GV38+PFOA	27
4.1.2	misurazione GV38+PFBA/PFOS	30

4.2	Misurazione con GV38 e mediatore Redox ferri/ferrocianuro	32
5	Conclusioni	35
	Bibliografia	37

Elenco delle figure

1.1	struttura chimica del PFOS	2
1.2	struttura chimica del PFOA	2
1.3	struttura chimica del PFBA	2
1.4	Diffusione PFAS in Europa (adattata da articolo del giornale 'Le Monde') . . .	3
1.5	Risultati analisi centro depurazione Acquevenete	4
1.6	Pfas e danni alla salute	5
1.7	schema di un LC-MS setup	7
1.8	Esempio di plot proveniente da una analisi LC-MS	8
1.9	Effetto raman	11
2.1	Modello interfaccia elettrodo soluzione riportato da [29]	17
2.2	grafico tipico ciclovoltammetria	19
3.1	Emstat pico development kit	24
3.2	Interfaccia software PSTrace	25
4.1	Diagrammi Bode GV38+PFOA	28
4.2	Zoom GV38+PFOA	28
4.3	misurazioni GV38+PFOA interv.30 min	29
4.4	Circuito elettrico equivalente	29
4.6	Diagrammi Bode GV38+PFOS	31
4.7	Diagrammi Bode GV38+PFBA	31
4.8	Nyquist EIS con redox	33

Capitolo 1

Introduzione

La produzione di questo elaborato è frutto del lavoro svolto quest'anno dall'Uni_Padua_IT iGEM Team, un gruppo di 16 studenti provenienti non solo dalla facoltà di Ingegneria Biomedica, ma anche da Biotecnologie, Biologia e Biologia Molecolare, ed è parte della più ampia organizzazione studentesca Mutans. Questo gruppo si è posto l'obiettivo di partecipare alla competizione iGEM (International Genetically Engineered Machine) per il 2024, una competizione studentesca di calibro internazionale che mira a promuovere lo sviluppo della biologia sintetica. Lo scorso anno hanno preso parte alla competizione 393 team, per un totale di 8829 partecipanti provenienti da 44 nazioni differenti. Tra questi, vi è stato anche il primo team proveniente dall'Università di Padova, che ha conseguito ottimi risultati. La competizione prevede l'affrontare, sfruttando i mezzi offerti dalla biologia sintetica, alcune delle problematiche della vita quotidiana. Quella scelta dal nostro team è l'inquinamento da PFAS (sostanze polifluoroalchiliche), un problema particolarmente grave nel nostro territorio, di grande importanza e complessità.

1.1 PFAS:origine,struttura e caratteristiche chimiche

Con il termine PFAS ci riferiamo a una vasta categoria di sostanze composta da oltre 4000 elementi, il cui numero è in continuo aumento a causa degli sviluppi industriali. Queste molecole sono accomunate dalla presenza di legami carbonio-fluoro, così forti da rendere difficile la loro degradazione biologica in natura ma anche attraverso l'uso di tecniche chimiche e fisiche. Le tipologie di PFAS presenti in quantità più elevate nel nostro territorio, e su cui si focalizzano generalmente gli sforzi di ricerca in materia di degradazione e rilevazione, sono perfluorottanosulfonato (PFOS), acido perfluorottanoico (PFOA) e acido perfluorobutanoico (PFBA). Le catene di carboni fluorurati presenti in questi composti conferiscono alla molecola caratteristiche idrofobiche e lipofobiche, mentre i gruppi funzionali (gruppo terminale solfonico

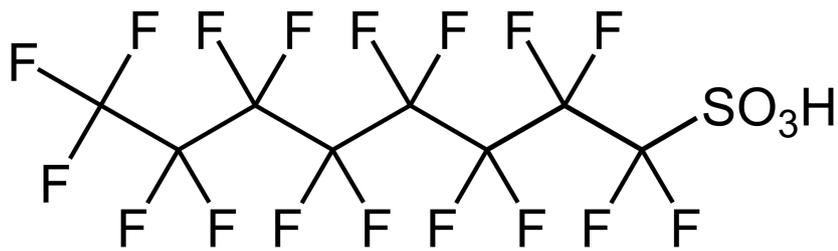


Figura 1.1: struttura chimica del PFOS

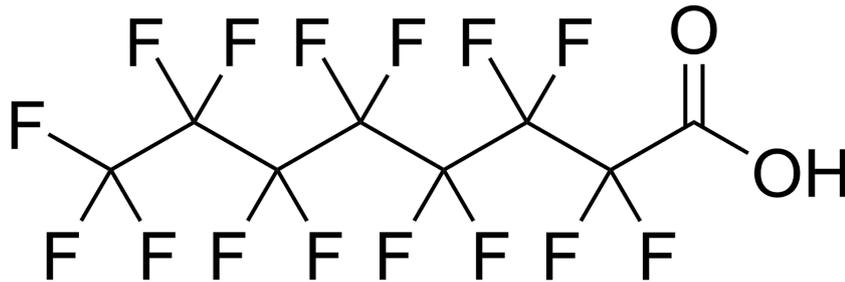


Figura 1.2: struttura chimica del PFOA

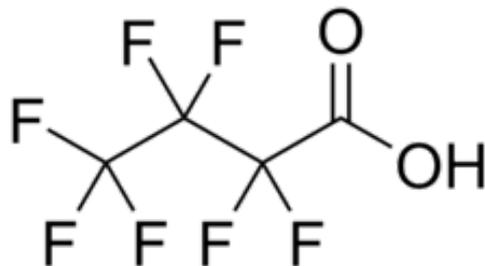


Figura 1.3: struttura chimica del PFBA

per il PFOS e acido carbossilico terminale per il PFOA e il PFBA) conferiscono caratteristiche di polarità.[1]

Tali caratteristiche li hanno resi ideali per l'utilizzo in moltissimi prodotti industriali, tra cui tessuti, tappeti, confezioni, schiume antincendio, pesticidi, diserbanti, abbigliamento sportivo, cera per pavimenti e pellame.[2]

1.2 Diffusione dei PFAS

Sebbene l'uso industriale di alcuni dei composti più comuni sia già stato regolamentato, le industrie sono state in grado di sintetizzare altri PFAS con le stesse caratteristiche fisiche, ugualmente dannosi. Il primo dei PFAS prodotti industrialmente e riconosciuto come tale è il teflon (PTFE), brevettato nel 1941, che però non sembra causare danni a persone e animali se

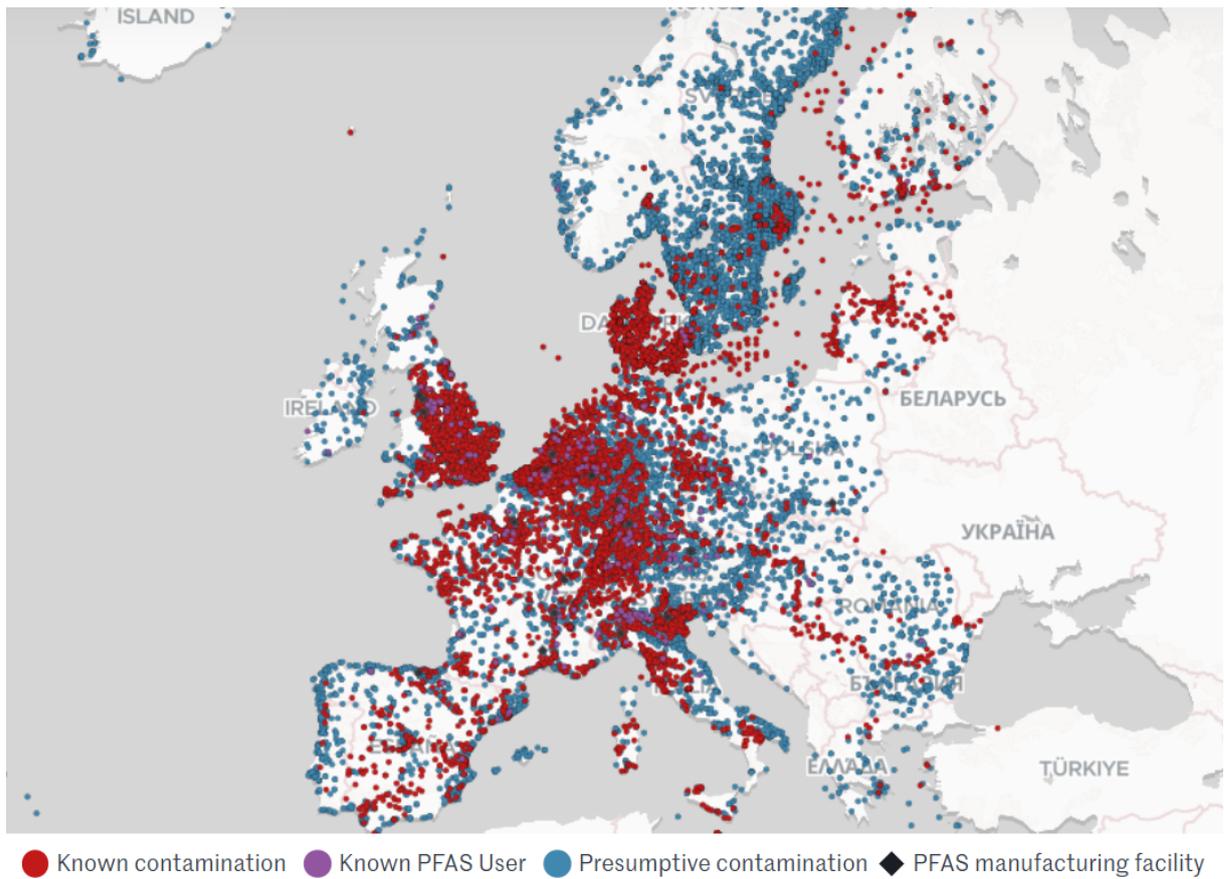


Figura 1.4: Diffusione PFAS in Europa (adattata da articolo del giornale 'Le Monde')

mantenuto sotto i 200°C. Differente è invece la questione per altri PFAS. Secondo un'indagine pubblicata nel febbraio 2023 dal giornale francese Le Monde, in Europa sono circa 23.000 i siti che necessiterebbero di monitoraggio, poiché hanno riportato quantitativi di PFAS superiori a 10 ng/l, 2.300 dei quali con livelli considerati pericolosi per la salute umana (oltre i 100 ng/l). Almeno 12 stabilimenti industriali sono stati riconosciuti colpevoli del rilascio di queste sostanze nell'ambiente; tra questi, due si trovano in Italia: la Miteni, con sede a Trissino (VI), che nel 2011 ha registrato nel torrente Poscola livelli di PFAS di 203.900 ng/l, e la Solvay, ad Alessandria (AL).

Il rilascio nell'ambiente di queste sostanze tramite le acque reflue industriali provoca un accumulo, poiché sono impossibili da degradare, sia nelle acque superficiali che nei terreni e nelle falde acquifere. Di conseguenza, queste sostanze possono introdursi negli organismi viventi, all'interno dei quali spesso interagiscono con le stesse dinamiche degli acidi grassi (proprio per la loro conformazione, con una coda idrofobica e lipofobica e una testa polare), accumulandosi principalmente in sangue[3], fegato[4], siero materno[5] ed è stato anche visto che alcune tipologie riescono probabilmente a diffondersi anche nel cervello[6].

Lab sample ID		501095-0119-1
Client Sample ID		1-NF
Matrix		Water
Sample Reporting Limit Multiplier		1.2
Notes		Nil
Analyte	Reporting Limit (ng/L)	ng/L
T1C1-PESOUHS	4	<0.01
3-3 FTCA	5	<0.01
42FTS	4	<0.01
5-3 FTCA	25	<0.01
62FTS	4	<0.01
7-3 FTCA	25	<0.01
82FTS	4	<0.01
9C1-PFSDNS	4	<0.01
ADONS	4	<0.01
HFPO-DA	4	<0.01
NEFOSA	1	<0.01
NEFOSAA	1	<0.01
NEFOSE	10	<0.01
NFDHA	2	<0.01
NMnFOSA	1	<0.01
NMnFOSAA	1	<0.01
NMnFOSE	10	<0.01
PFBA	4	26
PFBS	1	20
PFDA	1	<0.01
PFDoA	1	<0.01
PFDoS	1	<0.01
PFDS	1	<0.01
PFESA	2	<0.01
PFHpA	1	4.1
PFHpS	1	<0.01
PFHxA	1	14
PFHxS	1	3.4
PFMBA	2	<0.01
PFMPA	2	<0.01
PFNA	1	<0.01
PFNS	1	<0.01
PFOSA	1	110
PFOS	1	11
PFOSA	1	<0.01
PFPeA	2	14
PFPeS	1	<0.01

Figura 1.5: Risultati analisi centro depurazione Acquevenete

1.3 Tossicità per l'uomo

L'introduzione di questi contaminanti nell'organismo umano non avviene senza effetti collaterali. Sebbene lo studio di tali problematiche sia particolarmente complesso a causa del gran numero di composti da analizzare, delle difficoltà nel reperire standard analitici e delle loro caratteristiche fisico-chimiche (come la loro forte tendenza ad aderire alle superfici degli strumenti di laboratorio comunemente utilizzati), vi sono forti evidenze riguardo agli effetti avversi di queste sostanze, tra cui:

- **funzione immunitaria** sono state trovate associazioni significative tra la concentrazione di PFOA, ma non di PFOS, e i livelli corretti di anticorpi vaccinali contro Haemophilus influenzae di tipo b, tetano e difterite [7] In particolare è stato rilevato che tra i bambini ai quali era stata somministrata una dose di vaccino per la difterite all'età di 5 anni, un aumento nella concentrazione di PFAS (in particolare PFOA e PFDA) ha provocato una riduzione degli anticorpi fino al 25% negli anni successivi [8]
- **livelli di colesterolo** hanno rilevato forti correlazioni positive tra i livelli di PFOS e PFAS e il colesterolo totale presente nel sangue di 753 individui, questo legame era correlato anche a fattori come il sesso e la presenza di diabete. sembrerebbe che PFOA e PFOS siano in grado di interagire con l'espressione di geni coinvolti nelle fasi di immobilizzazione e trasporto del colesterolo nel sangue. [9]
- **cancro** i dati raccolti da una analisi comparativa trascrizionale svolta in collaborazione dalle università di Bologna e di Padova mostra inoltre che l'esposizione ai PFAS produce una sovraregolazione del gene ID1, coinvolto nello sviluppo di vari tipi di cancro, tra cui

leucemia, cancro al seno e al pancreas. I dati epidemiologici suggeriscono inoltre che un'elevata esposizione a questi materiali possa aumentare significativamente la mortalità di individui affetti da neoplasie maligne dei tessuti linfatici ed ematopoietici, come milza, fegato e midollo osseo.

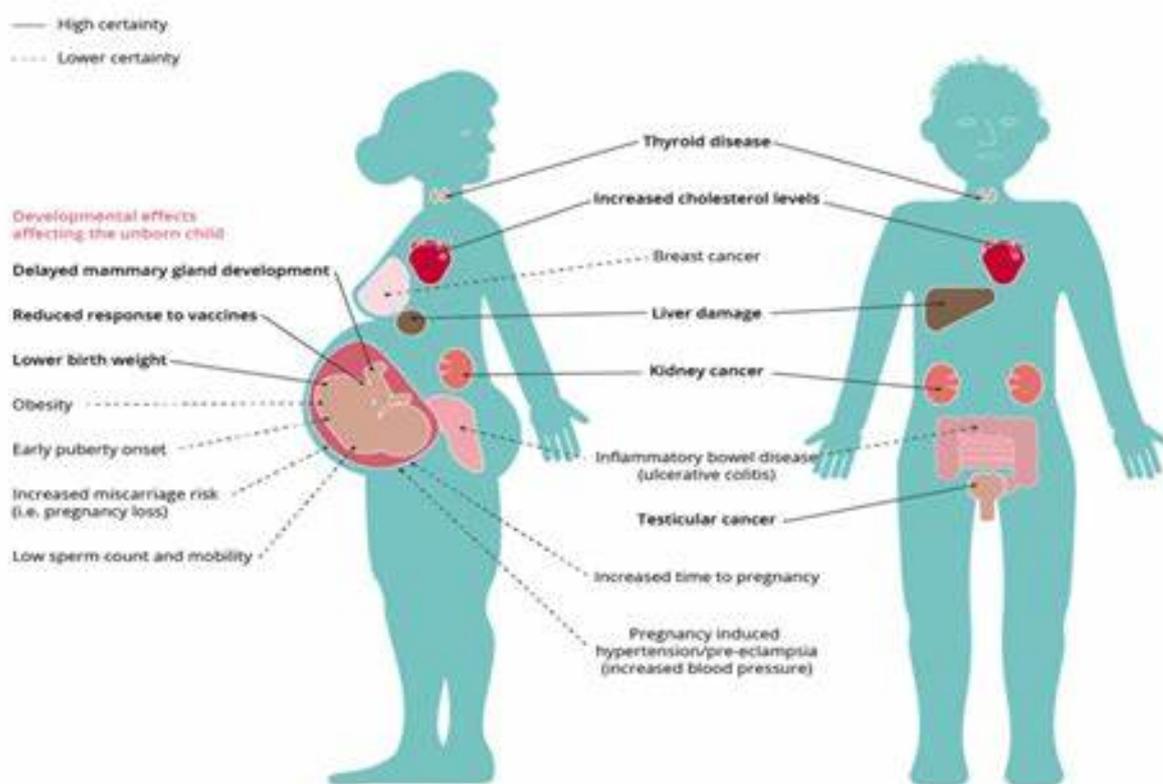


Figura 1.6: Pfas e danni alla salute

1.4 La rilevazione dei PFAS

L'EPA e vari Stati hanno iniziato a richiedere test per rilevare diversi PFAS nell'acqua potabile e in altre matrici, al fine di proteggere la salute pubblica. Attualmente, i PFAS possono essere identificati tramite metodi come la gascromatografia o cromatografia liquida (GC o LC) accoppiate alla spettrometria di massa tandem (MS/MS). Queste tecniche, pur essendo precise e sensibili, sono costose, richiedono molto tempo e necessitano che i campioni siano analizzati in laboratori centralizzati.

L'analisi sul campo di questi composti rappresenterebbe un grande punto di svolta, ma attualmente è limitata poiché mancano tecniche portatili e facilmente applicabili in situ. Il rilevamento dei PFAS è complesso, poiché la particolare natura chimica di questi composti

li rende non attivi né otticamente né elettrochimicamente. Inoltre, essi hanno una forte tendenza ad aderire alle superfici dei contenitori tipicamente utilizzati per le loro analisi in laboratorio.

Tra i materiali più comunemente utilizzati in laboratorio, il trend generale di adsorbimento dei PFAS sulle superfici è risultato essere (dal maggiore adsorbimento al minore): polipropilene > HDPE > PET > vetro > polistirene. Tuttavia, questo ordine può variare in base al composto specifico preso in considerazione. [10]

1.4.1 Metodologia analitica di riferimento

L'accoppiamento della cromatografia liquida (LC) con la spettrometria di massa (MS) si è rivelato un potente strumento per riuscire ad analizzare con efficacia concentrazioni di analita così basse (ordine dei ng) Molto brevemente possiamo descrivere questo processo dividendolo nelle seguenti fasi:

- **Separazione LC:** La Cromatografia Liquida (LC) è una tecnica utilizzata per separare fisicamente gli analiti presenti in un campione liquido o in una soluzione di un campione solido. Un volume di campione (da 0.1ul a 100 ul)viene iniettato in un flusso di solvente definito come come fase mobile. Questa soluzione attraversa poi una colonna riempita con particelle di silice ricoperte da un altro liquido,la fase stazionaria. A seconda del tipo di interazioni che si hanno tra la fase liquida e la fase solida possiamo distinguere:
 - **partition chromatography** che sfrutta le differenze in solubilità e idrofobicità
 - **ion-exchange chromatography** che separa gli analiti sulla base della loro carica ionica
 - **size-exclusion chromatography** che sfrutta le differenze di taglia delle molecole
 - **affinity cromatography** che sfrutta la capacità dell'analita di legarsi con la fase solida

La separazione avviene grazie alle differenti interazioni che i componenti della fase liquida hanno con la fase solida,Il tempo che ciascun analita impiega a percorrere la colonna è chiamato tempo di ritenzione (RT).

- **Rilevamento LC:** Una volta separati, gli analiti passano attraverso un rilevatore che misura una caratteristica fisica o chimica, come l'assorbimento della luce. Questa misurazione genera un segnale, la cui intensità è proporzionale alla quantità di analita presente nel campione.Anche Il tempo di ritenzione (RT) può essere utilizzato per identificare i composti, confrontandolo con il RT di standard conosciuti, anche se questo metodo non è sempre molto preciso.

- **Uso della MS per il Rilevamento LC:** La spettrometria di massa (MS) è spesso utilizzata in combinazione con la LC per ottenere livelli di sensibilità e selettività ottimali. A differenza della LC, la spettrometria di massa opera sotto vuoto e in presenza di ioni in fase gassosa. Il solvente viene quindi evaporato tramite l'applicazione di calore, e gli analiti vengono ionizzati tramite un'interfaccia che collega i due sistemi. Questo passaggio è cruciale poiché la MS può rilevare solo ioni in fase gassosa. Gli ioni così generati vengono poi separati in base al loro rapporto massa/carica (m/z) tramite l'applicazione di campi elettrici e/o magnetici e rilevati, solitamente attraverso un moltiplicatore di elettroni.

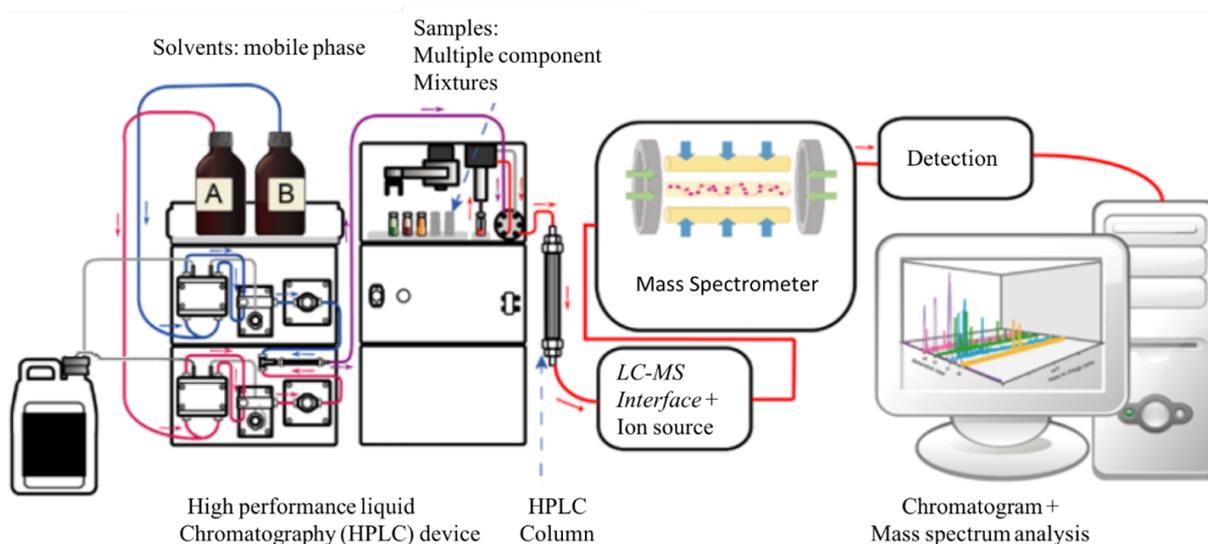


Figura 1.7: schema di un LC-MS setup

- **Interpretazione dei Dati LC-MS:** I risultati dell'analisi LC-MS vengono rappresentati in un cromatogramma totale degli ioni (TIC), che mostra l'intensità degli ioni in funzione del loro RT. Ogni punto sul cromatogramma corrisponde a uno spettro di massa, che fornisce informazioni sulla massa e, in alcuni casi, sulla struttura dei composti. La MS può operare in modalità scan, rilevando una vasta gamma di ioni, o in modalità selected ion monitoring (SIM), che si concentra su ioni specifici per una quantificazione più precisa.

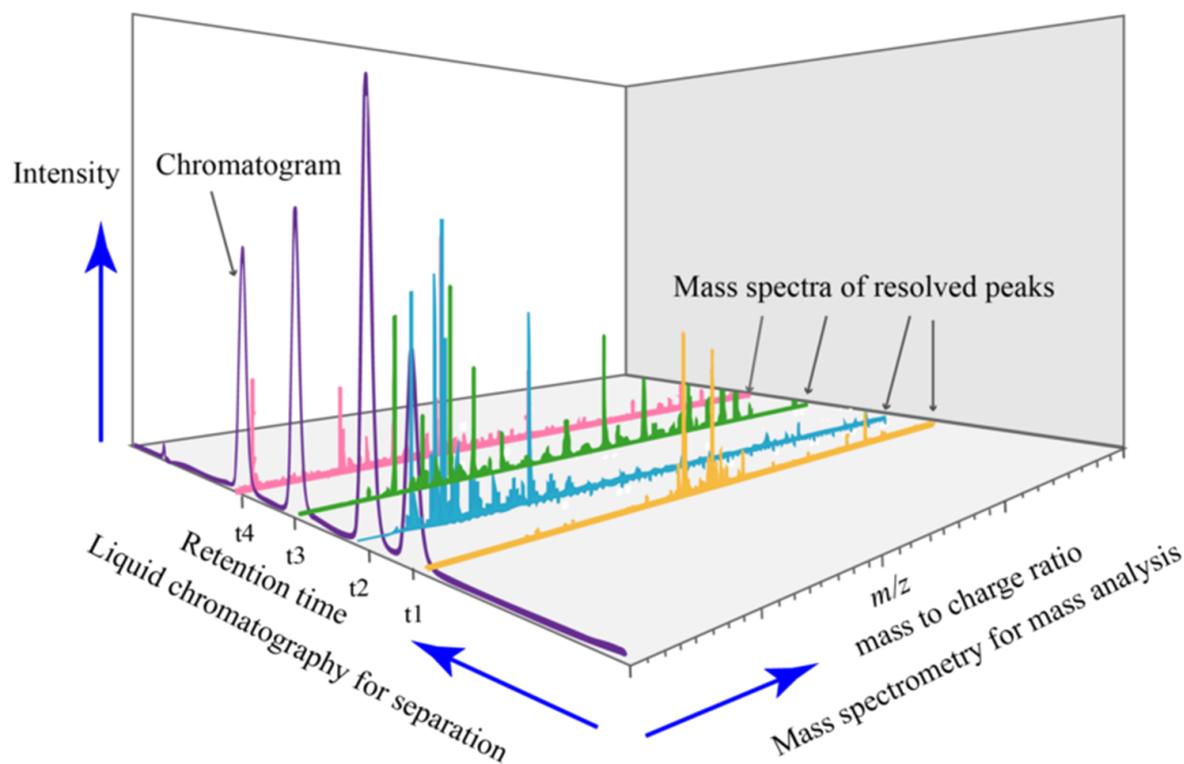


Figura 1.8: Esempio di plot proveniente da una analisi LC-MS

come già detto questo tipo di metodologia permette l'analisi di soluzioni che contengono concentrazioni di PFAS anche inferiori alle limitazioni imposte dalla legge. Ciò però avviene a discapito di altri aspetti quali:

- Il costo (attorno ai 200-300\$) che la rende un'analisi inadatta a controlli di routine
- la necessità di svolgere le misure in un laboratorio e l'impossibilità di conseguenza di creare un dispositivo da utilizzare in situ
- la necessità di personale formato per svolgere l'analisi
- le lunghe tempistiche necessarie per l'analisi

1.4.2 Metodologie emergenti

Analisi della fluorescenza

Questo metodo di rilevazione si basa sulla capacità di alcuni materiali fluorescenti, detti sonde, di interagire con l'analita, inducendo una variazione nell'intensità della fluorescenza. Questa tecnica è considerata conveniente dal punto di vista economico e di facile applicazione. Tuttavia,

è importante notare che, nel caso dei PFAS, l'analita non possiede proprietà di emissione di fluorescenza; pertanto, tale compito viene affidato completamente alla sonda. Sono stati già effettuati diversi studi sull'analisi dei PFAS utilizzando questa tecnica, riassunti nella seguente tabella.

Campione	Materiale fluorescente	Molecole target	LODs (ng/L)	Riferimento
Estratto di suolo	Derivato cationico del perilen diimmide	PFOS	1.55×10^4	[11]
Campioni di acqua di fiume	MIP basato su SiO ₂	PFOS	5570	[12]
Campioni tessili	CdS QDs idrosolubili	PFOA	1.24×10^5	[13]
Campioni d'acqua	QDs con guscio-core rivestiti con MIP	PFOA	1.0×10^4	[14]
Campioni d'acqua	CDs	PFOS	9.1×10^3	[15]
Campioni d'acqua	Compositi di CDs e cloridrato di berberina	PFOS	1.1×10^4	[16]
Campioni d'acqua	CDs dopati con Se,N	PFOA	7.45×10^5	[17]
Campioni di siero e urina	Compositi di CDs di chitosano	PFOS	$66e85(\times 10^{-3})$	[18]
Campioni d'acqua di piscina	Nanocluster d'oro e derivati calix[4]arene	PFOS	6.7×10^5	[19]
Campioni d'acqua e di imballaggi alimentari	COFs funzionalizzati UCNPs	PFOS	7.5×10^{-2}	[20]

Tabella 1.1: Metodi di determinazione dei PFAS basati sul rilevamento della fluorescenza, adattata da [21]

Campione	Materiale fluorescente	Molecole target	LODs (ng/L)	Riferimento
Campioni d'acqua	Compositi di $Fe_3O_4@NH_2$ & F13 e PF-DBT-Im	PFOA e PFOS	2.5×10^3 (PFOA); 7.2×10^3 (PFOS)	[22]
Campioni d'acqua o di siero	Doppio biosensore fluorescente ("sensore DT" e "sensore FT")	PFDoA	9.8×10^4	[23]
Campioni d'acqua	Colorante fluorescente bromuro di etidio e CDs dopati con azoto	PFOS	1.4×10^4	[24]
Campioni d'acqua, siero umano e estratto di uova	Sonda fluorescente ratiometrica basata su MIP	PFOS	0.5	[25]
Fluidi biologici umani e campioni d'acqua	Sensore basato su derivati di imine	PFOA	1.28	[26]
Campioni d'acqua	Biosensore batterico geneticamente modificato	PFOA e PFOS	N.M.	[27]
Campioni d'acqua	Aptameri ssDNA leganti i PFAS	PFOA	7.0×10^4	[28]

Tabella 1.2: Metodi di determinazione dei PFAS basati sul rilevamento fluorescente, adattata da [21]

I coloranti fluorescenti sono composti utilizzati come marcatori nei sensori a fluorescenza, ma spesso presentano scarsa solubilità in acqua e costi elevati. Si stanno sviluppando coloranti più economici ed ecologici. I derivati del perilene diimmide (PDI) sono promettenti per la loro stabilità e facilità di modifica. Un esempio è il PDI-Pyr, che, grazie alla sua solubilità in acqua, può rilevare il PFOS tramite l'attenuazione della fluorescenza.

Un'altra tecnica coinvolge i quantum dots (QDs), particelle nanometriche che offrono spettri di emissione regolabili e alta sensibilità. Ad esempio, i CdS QDs sono stati utilizzati per rilevare PFOA, mostrando buone capacità di recupero nei campioni di tessuti.

Tuttavia, l'uso dei QDs è limitato dalla loro tossicità e scarsa compatibilità biologica, spingendo la ricerca verso nanomateriali più sicuri come i carbon dots (CDs), che offrono ottima solubilità e proprietà fluorescenti. Un esempio di applicazione dei CDs è nel rilevamento del PFOS, con buoni risultati di sensibilità.

Infine, le nanoparticelle a conversione ascendente (UCNPs) offrono una nuova prospettiva, convertendo la luce a bassa energia in emissioni ad alta energia, permettendo un rilevamento altamente sensibile del PFOS in acqua potabile.

In generale, mentre i metodi basati su sonde fluorescenti offrono soluzioni rapide ed economiche per rilevare i PFAS, sono necessarie ulteriori ricerche per migliorare la precisione e la sensibilità, soprattutto attraverso lo sviluppo di nuovi nanomateriali e metodi di rilevamento

Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica analitica che si basa sull'analisi delle vibrazioni molecolari tramite la misurazione del cambiamento di frequenza della luce diffusa quando interagisce con un campione. Questo fenomeno, noto come effetto Raman, fornisce informazioni dettagliate sulla composizione chimica e sulla struttura molecolare dei materiali.

Quando un campione è irradiato con luce laser, una piccola frazione della luce diffusa presenta una lunghezza d'onda diversa da quella della luce incidente. Questa variazione, chiamata Raman shift, è misurata in unità di numero d'onda (cm^{-1}) e rappresenta un "fingerprint" molecolare unico.

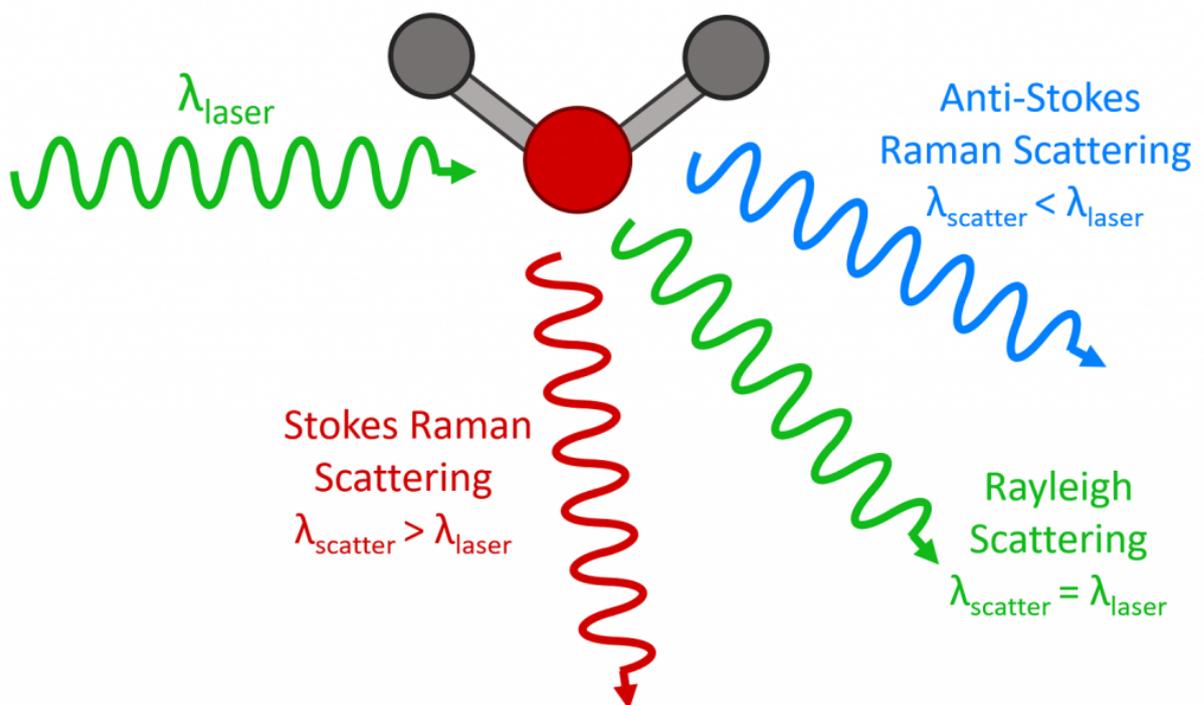


Figura 1.9: Effetto raman

La spettroscopia Raman permette così di identificare e caratterizzare le molecole e i materiali con precisione. Nella spettroscopia Raman, la luce incidente può essere diffusa in due principali

modalità:

1. **Scattering Rayleigh:** La maggior parte della luce diffusa mantiene la stessa lunghezza d'onda della luce incidente e non fornisce informazioni dettagliate sulla struttura molecolare. Questo è noto come scattering elastico.
2. **Scattering Raman:** Una piccola parte della luce diffusa presenta lunghezze d'onda diverse, a causa delle vibrazioni molecolari nel campione. Questo è chiamato scattering anelastico e si suddivide in:
 - **Scattering Raman Stokes:** La molecola emette luce a una frequenza inferiore a quella incidente, cedendo energia al fotone.
 - **Scattering Raman anti-Stokes:** La molecola emette luce a una frequenza superiore a quella incidente, assorbendo energia dal fotone.

Il segnale Raman è generalmente debole rispetto al Rayleigh, e per migliorare la sua intensità si ricorre alla Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). La Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) migliora significativamente la sensibilità della spettroscopia Raman mediante l'uso di superfici metalliche nanostrutturate. Le nanoparticelle metalliche, come oro e argento, amplificano il segnale Raman attraverso due meccanismi principali:

1. **Amplificazione Elettromagnetica:** Questo meccanismo, dominante in SERS, si basa sulla generazione di campi elettromagnetici intensi vicino alle nanoparticelle metalliche. Quando la frequenza della luce incidente coincide con la frequenza di risonanza plasmonica superficiale delle nanoparticelle, i campi elettromagnetici generati aumentano notevolmente l'intensità del segnale Raman.
2. **Amplificazione Chimica:** Questo meccanismo riguarda il trasferimento di carica tra la molecola e la superficie metallica, aumentando la polarizzabilità della molecola adsorbita. Sebbene contribuisca in misura minore rispetto all'amplificazione elettromagnetica, è importante per comprendere le interazioni tra molecole e superfici metalliche.

Le nanoparticelle di oro sono spesso preferite per la loro stabilità chimica e compatibilità con substrati biologici, mentre le nanoparticelle di argento, sebbene più reattive, offrono una maggiore amplificazione.

Studi recenti hanno dimostrato l'efficacia della SERS utilizzando nanoparticelle metalliche. Ad esempio, elettrodi preparati con nanoparticelle d'argento (AgNPs) hanno mostrato un aumento significativo dell'intensità del segnale Raman, permettendo la rilevazione di molecole a concentrazioni molto basse, fino a 20 fg/L. Questo miglioramento è stato ottenuto utilizzando

sorgenti laser e ottimizzando i parametri sperimentali, come il tempo di acquisizione, per ottenere dati di alta qualità e precisione analitica.

Capitolo 2

Misurazioni elettrochimiche

2.1 Modello dell'interfaccia elettrodo-soluzione

Modelli dell'Interfaccia Elettrodo-Soluzione L'interfaccia elettrodo-soluzione è la regione di contatto tra due fasi diverse, come metallo e soluzione elettrolitica, e gioca un ruolo cruciale nel funzionamento dei sensori elettrochimici. Questa interfaccia presenta una discontinuità nelle proprietà chimico-fisiche, che provoca variazioni nella distribuzione della carica e nella generazione di un campo elettrico.

2.1.1 Caratteristiche dell'Interfaccia

In un trasduttore elettrochimico, l'interfaccia è formata da un metallo, che contiene elettroni liberi come cariche mobili, e da una soluzione elettrolitica, in cui le cariche mobili sono ioni. La porzione di soluzione più vicina alla discontinuità, chiamata interfase, presenta condizioni anisotrope ed eterogenee, generando un campo elettrico. Questo campo provoca un trasferimento di carica attraverso l'interfaccia, innescando un processo di ossidoriduzione. Gli elettroni liberi nel metallo possono attraversare l'interfaccia per ridurre gli ioni in soluzione, mentre durante l'ossidazione, gli elettroni lasciano la soluzione e ritornano al metallo. Le correnti di riduzione e ossidazione si equilibrano al potenziale standard di ossidoriduzione caratteristico per ogni elettrolita.

2.1.2 Modelli di Interfaccia

- **Modello di Helmholtz**

Nel 1853, Helmholtz ha proposto un modello che rappresenta l'interfaccia come un condensatore piano. Questo modello assume che la densità di carica sulle facce del condensatore sia uguale e opposta. Il double layer è descritto come una capacità

dipendente dalla costante dielettrica della soluzione e dalla distanza tra le due facce. Tuttavia, questo modello è limitato perché non considera fenomeni come la diffusione degli ioni e l'adsorbimento, né l'effetto della tensione applicata e delle variazioni di temperatura e concentrazione.

- **Modello di Gouy-Chapman**

Tra il 1910 e il 1913, Gouy e Chapman hanno migliorato il modello di Helmholtz introducendo il concetto di double layer diffusivo. Questo modello descrive la variazione di potenziale come esponenziale e dipendente dalla distanza dall'elettrodo, utilizzando l'equazione di Poisson-Boltzmann. Sebbene più accurato, il modello di Gouy-Chapman non considera le dimensioni degli ioni e la loro interazione con la superficie, e non è adatto per sistemi con un alto carico.

- **Modello di Stern**

Nel 1924, Stern ha combinato i modelli di Helmholtz e Gouy-Chapman. Il modello di Stern prevede due strati: uno esterno di diffusione e uno interno dove gli ioni sono adsorbiti dalla superficie dell'elettrodo. Questo modello tiene conto delle interazioni Coulombiane e considera la capacità come la somma delle capacità del double layer e dello strato di diffusione. Tuttavia, esso assume che la permittività dielettrica e la viscosità siano costanti e non considera le dimensioni degli ioni.

- **Modello di Grahame**

Nel 1947, Grahame ha ulteriormente raffinato il modello di Stern introducendo tre regioni: lo Inner Helmholtz Plane (IHP), che include gli ioni specificamente adsorbiti; lo Outer Helmholtz Plane (OHP), che include gli ioni solvatati vicini alla superficie; e il double layer diffuso. Questo modello tiene conto anche degli ioni solvatati che perdono il loro guscio di solvatazione vicino all'elettrodo.

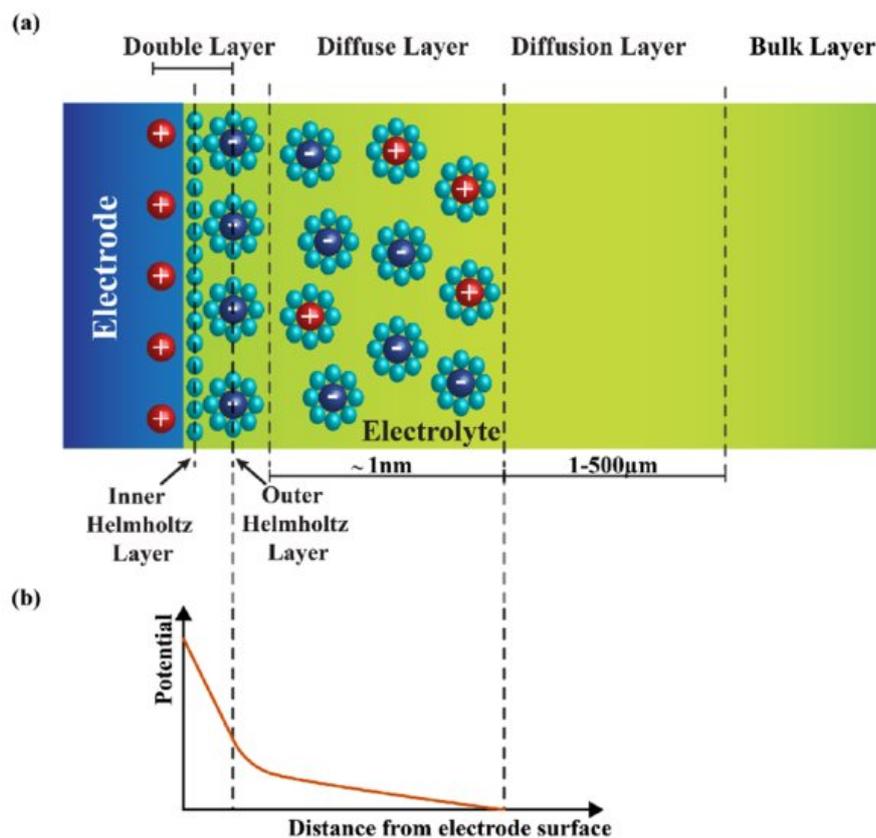


Figura 2.1: Modello interfaccia elettrodo soluzione riportato da [29]

- **Modello BDM**

Nel 1963, Bockris, Devanathan e Müller hanno proposto il modello BDM, che integra l'azione del solvente all'interfaccia. Questo modello mantiene la struttura del double layer di Grahame, ma include un primo strato di solvente che è orientato secondo il campo elettrico applicato. Questo orientamento variabile del solvente modifica la costante dielettrica, migliorando la rappresentazione del comportamento dell'interfaccia rispetto ai modelli precedenti.

- **Miglioramenti Recenti**

Recenti studi hanno ampliato la comprensione del comportamento dell'interfaccia elettrodo-soluzione, includendo modelli che considerano variabili come le dimensioni degli ioni e le interazioni più complesse tra gli ioni e la superficie dell'elettrodo. Tali studi cercano di risolvere le limitazioni dei modelli storici e di applicare queste conoscenze per migliorare la precisione dei sensori elettrochimici e delle tecniche analitiche.

In sintesi, l'evoluzione dei modelli dell'interfaccia elettrodo-soluzione ha portato a una comprensione più approfondita dei fenomeni elettrochimici, migliorando la progettazione e

l'accuratezza dei sensori elettrochimici.

2.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica

la spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) permette di andare ad analizzare la zona di interfaccia tra elettrodo e soluzione. Nell'applicazione di questa tecnica il sistema viene sottoposto ad uno spettro di frequenze e ne viene ricavata la misura dell'impedenza.

La necessità di andare ad analizzare questo parametro deriva principalmente dal fatto che, mentre nei sistemi composti da componenti ideali, nei sistemi reali il comportamento diverge da quello ideale esclusivamente ohmico e non viene più rispettata la legge canonica $R = \frac{V(t)}{I(t)}$ per via della comparsa di altre componenti capacitive ed induttive.

Per ricavare questo valore il sistema viene prima polarizzato ad una determinata V_0 denominata 'punto di lavoro' e viene successivamente applicata una perturbazione dV di carattere sinusoidale (di ampiezza generalmente nell'ordine di qualche mV). Questa sollecitazione va a generare una perturbazione di corrente dI con la quale a questo punto è possibile andare a calcolare il valore dell'impedenza del sistema definita come $Z(\omega) = \frac{\delta v(\omega)}{\delta i(\omega)}$. Questa componente sarà quindi caratterizzata da una componente reale con fase nulla (la resistenza del nostro sistema) e da una componente immaginaria che considera anche i comportamenti non ideali del sistema $-\frac{j}{\omega C}$ con fase $\frac{\pi}{2}$.

Questa tecnica è definita non perturbativa perché le correnti generate all'interno del nostro sistema hanno valori sufficientemente ridotti.

Per questo motivo questa misurazione potrebbe venire effettuata anche a soli 2 elettrodi ottenendo buoni risultati. Nelle nostre misurazioni abbiamo preferito utilizzare comunque 3 elettrodi per meglio apprezzare le caratteristiche del sistema. Lo spettro di frequenze che viene analizzato è generalmente ampio e può spaziare dai mHz fino ai MHz, in base alle necessità ed al sistema da misurare.

2.3 Voltammetria

La voltammetria è una tecnica elettrochimica utilizzata in chimica analitica per ottenere informazioni su un analita misurando la corrente generata in una cella elettrochimica al variare del potenziale. Questo metodo, sviluppato inizialmente con la polarografia da Jaroslav Heyrovsky nel 1922, si basa sulla misurazione della corrente in funzione del potenziale applicato a un elettrodo di lavoro, che può essere di platino, oro, mercurio o carbonio. La corrente misurata

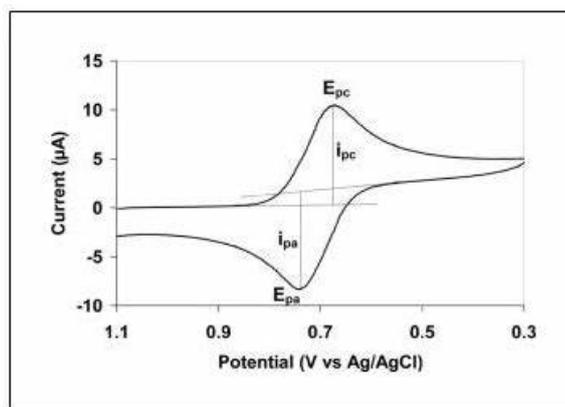


Figura 2.2: grafico tipico ciclovoltammetria

è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita nella soluzione, permettendo un'analisi quantitativa sensibile delle specie presenti.

Le celle elettrochimiche utilizzate per la voltammetria includono un elettrodo di lavoro, un elettrodo di riferimento e un contro elettrodo. L'elettrodo di lavoro è il sito della reazione redox, l'elettrodo di riferimento mantiene un potenziale costante tramite una semireazione reversibile che segue l'equazione di Nerst e l'elettrodo ausiliario completa il circuito per permettere il flusso della corrente.

Tra le diverse tipologie di voltammetria, la voltammetria a scansione lineare (LSV) e la ciclovoltammetria (CV) sono le più diffuse. Nella LSV, la corrente viene misurata mentre il potenziale applicato varia linearmente, producendo picchi di corrente che indicano i potenziali a cui avvengono le reazioni redox. La CV, invece, prevede l'inversione del potenziale dopo aver raggiunto un valore massimo, tracciando un voltammogramma ciclico che mostra la relazione tra corrente e potenziale durante il ciclo di scansione. Questa tecnica è particolarmente utile per studiare le dinamiche di reazioni redox e i meccanismi associati, poiché permette di ottenere informazioni sia sulle specie elettroattive che sugli intermedi di reazione. La corrente di picco catodico (i_{pc}) e quella anodica (i_{pa}) rappresentano i punti chiave del voltammogramma ciclico. I picchi di corrente si verificano ai potenziali di picco catodico (E_{pc}) e anodico (E_{pa}), e la loro analisi fornisce indicazioni sulla reversibilità del processo redox e sul numero di elettroni scambiati.

Come precedentemente descritto le celle elettrochimiche possono essere modellate come circuiti elettrici equivalenti, dove la resistenza e la capacità del sistema influenzano le misurazioni. In presenza di un mediatore redox, la cella elettrochimica mostra un'impedenza faradica che si oppone al trasferimento di carica, rappresentata da un circuito RC equivalente. Questa configurazione circuitale, nota come cella di Randles, include l'elemento di Warburg, che descrive l'impedenza dovuta alla diffusione delle specie redox a basse frequenze.

In sintesi, la voltammetria, con le sue diverse varianti e modelli circuitali, rappresenta una potente tecnica per lo studio dei processi redox e per l'analisi di specie elettroattive, fornendo informazioni dettagliate sulle reazioni chimiche e sui meccanismi di trasferimento di carica in una cella elettrochimica.

Capitolo 3

Materiali, strumenti e protocolli

3.1 Costruzione dell'elettrodo

3.1.1 Ablazione

L'Ablazione Laser in Liquido (LAL) è una tecnica utilizzata per la produzione di nanoparticelle d'oro (AuNPs) basata sull'espulsione di materiale da un bersaglio solido immerso in un liquido, tramite l'irradiazione con un impulso laser. Il processo di ablazione avviene grazie all'interazione tra il laser e il materiale solido. Nella LAL specifica per nanoparticelle metalliche in acqua, chiamata ns-PLAL (Ablazione Laser con impulsi di nanosecondi), il processo segue una sequenza precisa di fasi: il laser induce l'ablazione del bersaglio e la formazione di plasma; il plasma trasferisce energia al liquido circostante, viene generata una bolla di cavitazione che rilascia le particelle ablate nella soluzione acquosa. Solo una parte dell'impulso laser colpisce direttamente il bersaglio, mentre la maggior parte dell'energia è spesa per riscaldare gli elettroni esterni del materiale, trasformando il materiale ablatato in plasma. In un ambiente acquoso, l'incomprimibilità dell'acqua provoca un forte confinamento del materiale ablatato. Questo limita la penetrazione del laser durante le prime fasi dell'espansione del plasma e genera forti gradienti di temperatura nel materiale espulso. La durata degli impulsi è dell'ordine dei nanosecondi poiché in questo modo l'interazione tra laser e materiale è più efficace, inducendo ionizzazione e riscaldamento degli elettroni. Il plasma ha un ruolo fondamentale nella ns-LAL, poiché da esso deriva la formazione delle nanoparticelle. Le nanoparticelle si formano in tutta l'area del plasma, non solo ai margini dove il raffreddamento è più rapido. Nel nucleo del plasma, durante l'impatto, la temperatura scende rapidamente oltre il punto di condensazione dei metalli. La forte pressione e le elevate temperature presenti in queste condizioni consentono la condensazione delle nanoparticelle. Il trasferimento rapido di energia dal plasma all'acqua porta alla formazione di un sottile strato di vapore attorno al plasma. Questo strato si espande

formando la cosiddetta bolla di cavitazione, che si espande fino a raggiungere un equilibrio con il liquido circostante. Quando la bolla raggiunge la massima espansione, si comprime di nuovo, spingendo il materiale ablatato verso il punto di impatto dell'impulso laser. Se le nanoparticelle acquisiscono una carica sufficiente dopo la fase di plasma, la pressione elettrostatica può superare la pressione alla frontiera tra acqua e vapore, permettendo alle nanoparticelle di uscire dalla bolla di cavitazione e disperdersi nella soluzione. Durante il nostro processo di LAL abbiamo utilizzato una sorgente laser Quantel Q-smart 450, impulsato a 9 ns con frequenza di ripetizione a 20 Hz alla lunghezza di emissione fondamentale di 1064 nm. Il corretto risultato dell'ablazione è stato verificato grazie all'ausilio di uno spettrofotometro UV-Vis-NIR che ci ha permesso di stabilire dopo circa 5 ore di ablazione che la soluzione era sufficientemente concentrata e che le particelle avevano dimensioni attorno ai 30nm. La soluzione a questo punto si presenta con una colorazione viola-rossastra e può venire utilizzata successivamente attraverso la deposizione tramite spray coating per la costruzione della nostra superficie.

3.1.2 Spray coating

Lo spray coating è una tecnica che sfrutta una fonte d'aria per generare un aerosol da una soluzione, che si deposita sulla superficie d'interesse, garantendo una distribuzione uniforme e graduale. Nel contesto del nostro studio, è stato utilizzato un aerografo a doppia azione BEL-AIR004 di Belkits, collegato a una fonte di azoto (N_2), per la deposizione di una superficie nanostrutturata di nanoparticelle d'oro (AuNPs). Per ottenere film plasmonici sottili, omogenei ed efficaci per le misurazioni SERS, è fondamentale seguire alcuni accorgimenti durante la procedura di rivestimento. Durante la fabbricazione degli elettrodi abbiamo mantenuto una distanza dell'aerografo dal substrato di circa 20 cm e la pressione dell'azoto (N_2) fissata a 3 bar. Abbiamo utilizzato inoltre una piastra riscaldata a 115°C sotto il substrato, per favorire l'evaporazione istantanea della parte acquosa dell'aerosol e garantire una corretta deposizione delle nanoparticelle. L'utilizzo di questa tecnica è volto in particolare ad ottimizzare le misurazioni con tecnica SERS che vengono favorite dalla granulosità della superficie, ma rende comunque possibile l'analisi con tecniche elettrochimiche.

3.1.3 Funzionalizzazione della superficie

Per ottenere la corretta interazione tra PFOA e le nanoparticelle d'oro, abbiamo utilizzato una molecola composta da una catena carboniosa (C9) per imitare la struttura del nostro analita, un tiolo (-SH) per l'affinità con l'oro a un'estremità e un gruppo guanidinio positivo per l'affinità con il PFOA all'altra estremità. Nel nostro progetto, abbiamo chiamato questa molecola GV38. La soluzione di funzionalizzazione era composta da MeOH + GV38 (1 mM).

Abbiamo ritenuto la molecola GV38 molto promettente grazie alla sua struttura simile al PFOA, che ne permetterebbe l'inserimento tra le molecole di funzionalizzazione.

3.1.4 Soluzioni di prova

Le soluzioni che abbiamo testato erano composte da:

- acqua MilliQ + NaCl 10 mM (+ PFOA 1mM)
- acqua MilliQ + Hepes 10 mM (+ PFOA/PFOS/PFBA 1 mM)

L'Hepes rientra tra le cosiddette 'soluzioni tampone' infatti stabilizza il pH della soluzione a 7,55 e rende le interazioni AuNPs-GV38-PFOA più efficienti. Serve anche come elettrolita per aumentare la conducibilità della soluzione e permettere l'analisi elettrochimica.

La scelta di iniziare con concentrazioni relativamente elevate di PFOA, specialmente se confrontate con le soluzioni reali, deriva dal fatto che, essendo questa ricerca parte del progetto iGEM2024 dell'Università di Padova, un corretto funzionamento a queste concentrazioni garantirebbe un metodo di monitoraggio dei processi di degradazione che il gruppo sta sviluppando, i quali avverrebbero con soluzioni debitamente concentrate.

3.2 Misurazioni con EIS

3.2.1 Strumentazione

Kit di Sviluppo EmStat Pico dispone di un modulo di potenziostato affidabile, testato e calibrato, che consente un rapido prototipaggio senza richiedere alcuna competenza di programmazione. Con questo strumento è possibile eseguire un'ampia gamma di misurazioni elettrochimiche utilizzando il proprio sensore.

Alcune caratteristiche importanti di questo strumento che lo rendono un candidato perfetto per eseguire l'analisi necessaria per il rilevamento di PFAS sono:

- Possibilità di essere collegato e alimentato via USB
- Software gratuito PStTrace utilizzato per completare le misurazioni
- possibilità di essere collegato anche wireless a dispositivi mobili

Queste caratteristiche ci permettono di lavorare con l'obiettivo di creare un sistema sensoriale portatile, economico e rapido per la rivelazione di PFAS.

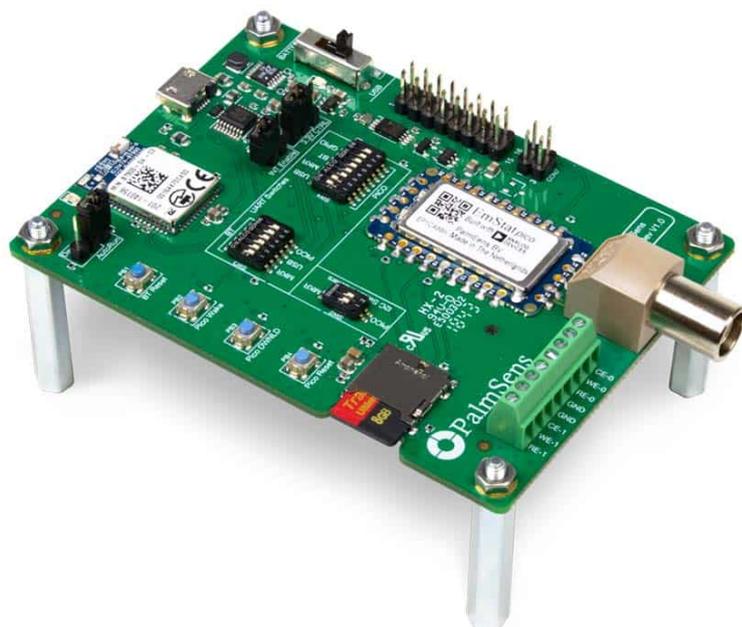


Figura 3.1: Emstat pico development kit

Software PSTrace: Questo software consente una gestione semplice degli strumenti PalmSens. La sua interfaccia permette di impostare facilmente i parametri necessari per le misurazioni e poi effettuare il fitting dei dati per identificare i componenti elettrici equivalenti del sistema elettrochimico. I dati raccolti possono essere scaricati e processati; nel nostro caso, abbiamo utilizzato MATLAB per creare grafici che aiutano a interpretare meglio i dati.

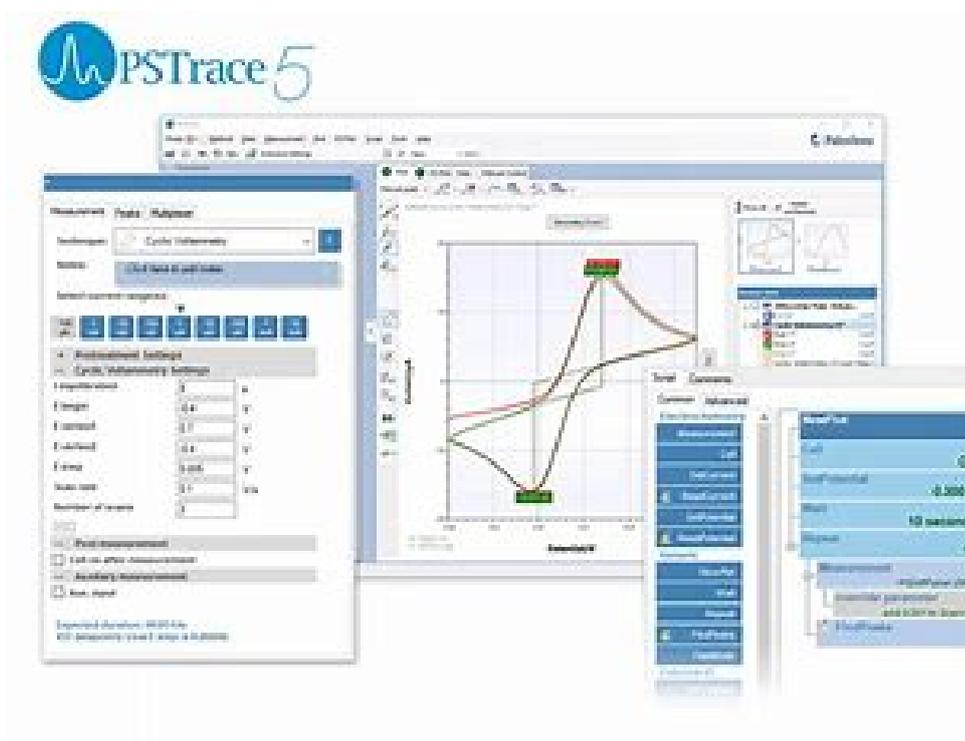


Figura 3.2: Interfaccia software PSTrace

3.2.2 Procedimento

Sono stati effettuati tre diversi cicli di misurazioni EIS a tre elettrodi. Come elettrodi abbiamo :

Working Electrode: Au electrode

Reference: Ag/AgCl

Counter: Pt

Nel **primo ciclo** la molecola di funzionalizzazione utilizzata è stata il 11-Mercapto-1-undecanolo mentre come elettrolita è stato scelto NaCl che non ha portato però a risultati rilevanti.

Nel **secondo ciclo** di misurazioni è stata testata una nuova molecola di funzionalizzazione precedentemente descritta nella sezione 3.1.3, In tutte le misurazioni è presente in soluzioni Hepes a concentrazione 10mM le misurazioni effettuate sulla superficie sono state le seguenti:

1. Misurazione superficie metallica senza funzionalizzazione
2. Misurazione superficie metallica post funzionalizzazione (1h di incubazione)
3. Misurazione con superficie metallica funzionalizzato e soluzione con PFOA (a 0 minuti dall'aggiunta della soluzione con PFOA)
4. Misurazione della stessa superficie metallica in (3) dopo 30 minuti

5. Misurazione della stessa superficie metallica in (3) dopo 60 minuti
6. Misurazione della stessa superficie metallica in (3) dopo 90 minuti

I parametri utilizzati per la misurazione sono stati i seguenti:

- $V_{dc}=0V$
- $V_{ac}=15\text{ mV}$
- Hold time = 5 s
- Frequency Range = 100 kHz – 1 Hz

nel **terzo ciclo** (di cui per questioni pratiche verranno presentati solo i risultati più significativi) abbiamo costruito 5 diversi prototipi in modo da andare a testare le seguenti condizioni:

1. GV38 + HEPES 10 mM
2. GV38 + PFOA 1 mM
3. MeOH + PFOA 1 mM
4. GV38 + PFBA 1 mM
5. GV38 + PFOS 1 mM

La presenza del prototipo 1 (in cui non vengono inseriti i PFAS) e del prototipo 3 (che non viene funzionalizzato) ci permette di avere una misura di controllo per confermare che le variazioni di impedenza che osserveremo siano effettivamente dovute all'interazione della funzionalizzazione con i PFAS e non ad altri fattori esterni. Il protocollo di misurazioni scelto è simile a quello utilizzato nel secondo ciclo con la differenza che abbiamo scelto di attendere 40 minuti tra le misurazioni con la soluzione con PFAS. I parametri utilizzati per la misurazione sono stati i seguenti:

$$V_{dc}=0\text{ V}$$

$$V_{ac}=15\text{ mV}$$

$$\text{Hold time} = 10\text{ s}$$

$$\text{Frequency Range} = 100\text{ kHz} - 1\text{ Hz}$$

Abbiamo quindi effettuato una prima misurazione su tutti i prototipi in seguito alla funzionalizzazione e sul prototipo 3 che non è stato funzionalizzato. La seconda misurazione è stata eseguita immediatamente dopo la aggiunta della soluzione con PFAS e le successive tre misurazioni sono state eseguite ad intervalli di 40 minuti su tutti i prototipi.

Capitolo 4

Risultati

4.1 Misurazioni EIS con funzionalizzazione di GV38

4.1.1 misurazione GV38+PFOA

Questa misurazione è stata ideata sulla base di un precedente tentativo sviluppato con una funzionalizzazione di 11-Mercapto-1-undecanolo e una soluzione di acqua MilliQ con NaCl 10 mM e PFOA 1 mM, che non aveva fornito risultati significativi. Abbiamo quindi deciso di modificare la molecola di funzionalizzazione, scegliendo una molecola con una lunghezza della catena di carbonio più simile a quella dell'analita e utilizzando l'Hepes come elettrolita per ottenere un pH più stabile e favorevole all'interazione tra funzionalizzazione e analita. La molecola GV38 è stata la prima molecola di funzionalizzazione che ha permesso di osservare cambiamenti nell'impedenza del sistema.

I grafici sotto riportati sono stati creati combinando tre misurazioni: superficie metallica, superficie funzionalizzata e superficie funzionalizzata + soluzione di PFOA. I primi due grafici mostrano come il modulo dell'impedenza e la fase cambino tra le tre misurazioni.

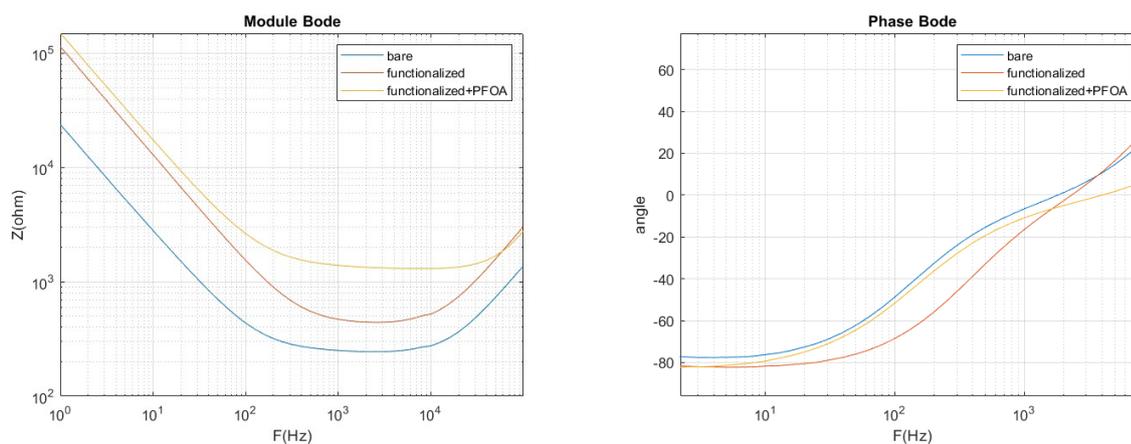


Figura 4.1: Diagrammi Bode GV38+PFOA

La parte più interessante del grafico è il range 100-1000 Hz, poiché con questo intervallo di frequenza possiamo apprezzare meglio gli effetti del cambiamento di capacità nel sistema.

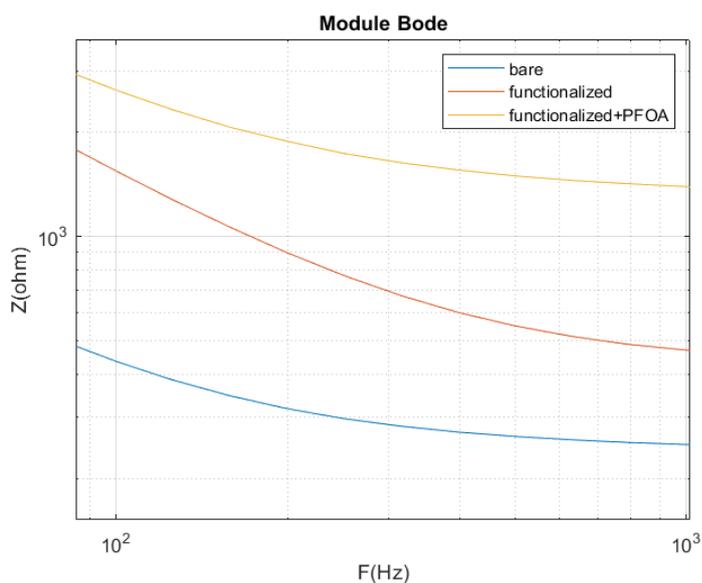


Figura 4.2: Zoom GV38+PFOA

Come si può vedere, per i valori più elevati di frequenze si osservano differenze importanti tra le misurazioni. Queste sono però dovute principalmente alla differente resistenza della cella elettrochimica. Questo parametro però non è strettamente legato all'adesione delle molecole di PFAS alla superficie mentre dipende principalmente da differenze di setup difficili da controllare, poiché la posizione degli elettrodi, evaporazione della soluzione e la fabbricazione dell'elettrodo possono modificarla sensibilmente. La misurazione della superficie funzionalizzata + PFOA mostrata nel primo grafico è stata presa immediatamente dopo l'inserimento della soluzione di PFOA nella nostra camera; abbiamo poi effettuato altre 2

misurazioni a intervalli di 30 minuti, che hanno confermato l'interazione stabile tra il PFOA e la superficie, poiché il modulo della capacità è rimasto quasi esattamente lo stesso.

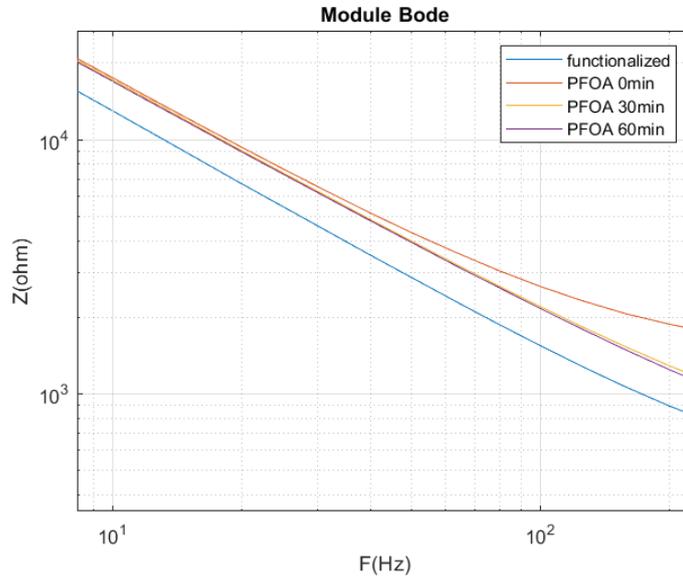


Figura 4.3: misurazioni GV38+PFOA interv.30 min

Per avere un'idea più quantitativa del dato ottenuto (seppur resti comunque un risultato estremamente preliminare) ci siamo serviti del software PStace ed abbiamo effettuato un fitting dei dati impediometrici ottenuti sulla base di un circuito elettrico equivalente così composto:

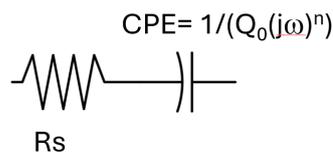


Figura 4.4: Circuito elettrico equivalente

Nel circuito possiamo identificare due elementi distinti, la R_s che rappresenta il contributo resistivo della cella elettrochimica ed il CPE (constant phase element) che ne rappresenta il contributo capacitivo. Dal fitting eseguito vengono restituiti tre parametri: R_s , Q_0 ed n . Quest'ultimo valore permette di caratterizzare la non linearità della risposta reale ed è usato insieme a Q_0 per calcolare il CPE tramite la formula: $\frac{1}{Q_0(j\omega)^n}$, è facile notare come nel caso di $n=1$ il nostro elemento avrebbe un comportamento capacitivo ideale. Dal fitting abbiamo ottenuto i valori riportati nella seguente tabella:

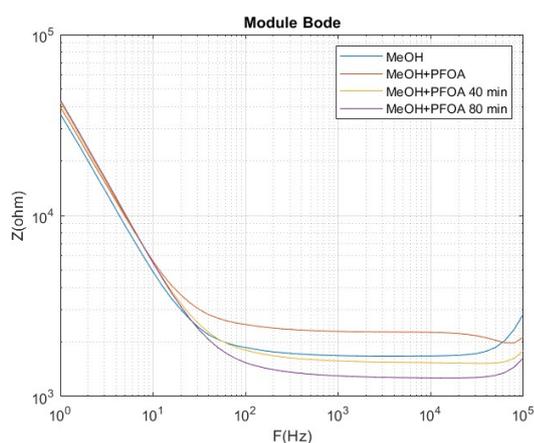
	BARE	FUNCT	PFOA start	PFOA 30 min	PFOA 60 min
R_s (Ω)	217.2	446.3	1317	505.1	432
Q_0 (μF)	6.8	1.5	1.25	1.3	1.35
n	0.92	0.96	0.92	0.91	0.91
C_{dl}	3.86	1.106	0.716	0.623	0.646

Tabella 4.1: Valori di R_s , Q_0 e n per diverse condizioni.

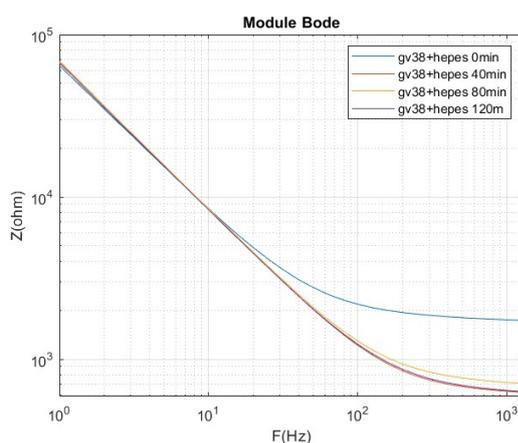
La C_{dl} (capacità di double layer) non è stata generata dal fitting ma calcolata dal valore di CPE tramite la seguente formula: $C_{dl} = \frac{(R_s * Q_0)^{\frac{1}{n}}}{R_s}$

4.1.2 misurazione GV38+PFBA/PFOS

Abbiamo voluto testare il nostro prototipo anche con PFOS e PFBA, quindi abbiamo realizzato un altro set di sensori. Questo ciclo di test è stato eseguito a causa di problemi tecnici con camere di contenimento in polipropilene, che non sono ottimali per l'analisi dei PFAS a causa della loro alta tendenza ad assorbirli. Le misurazioni avvenute sui prototipi 1 e 3 descritti nella sezione 3.2.2 hanno confermato che i fenomeni osservati nella precedente misurazione sono dovuti all'adesione delle molecole sulla superficie in quanto non si hanno avuto variazioni significative dei parametri iniziali nel tempo.



(a) Diagramma Bode modulo prototipo 1 senza funzionalizzazione



(b) Diagramma Bode modulo prototipo 3 senza PFAS

Nei grafici puoi vedere le misurazioni della superficie funzionalizzata (functionalized) e poi le misurazioni dopo l'aggiunta della soluzione PFAS da T0 (0 min) a T3 (120 min) a intervalli di 40 minuti.

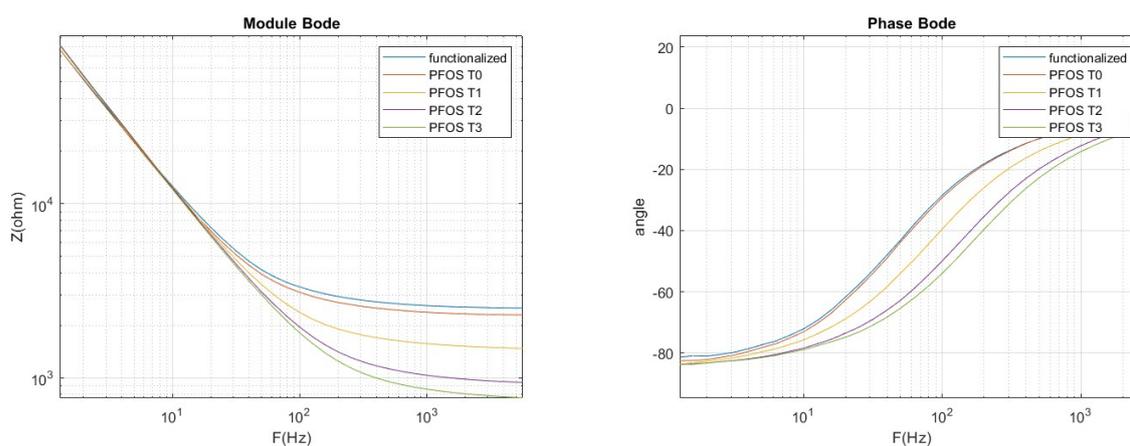


Figura 4.6: Diagrammi Bode GV38+PFOS

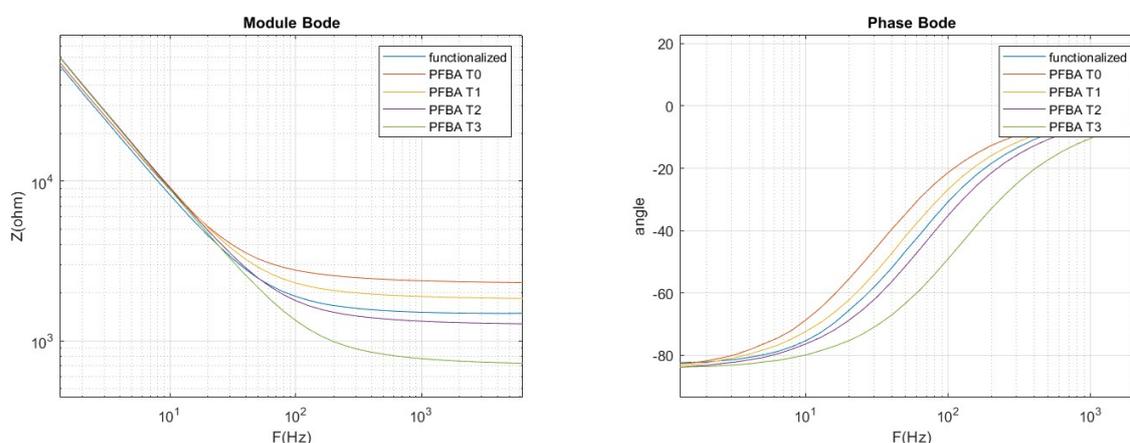


Figura 4.7: Diagrammi Bode GV38+PFBA

Abbiamo eseguito un fitting dei risultati ottenuti dalla prova con PFBA utilizzando come circuito equivalente quello rappresentato nella figura 4.4. Il valore del C_{dl} è stato calcolato con il medesimo metodo descritto nella sezione 4.1.1.

	FUNCT	PFBA T0	PFBA 40min	PFBA 80min	PFBA 120min
$R_s(\Omega)$	1442	2426.8	1937	1326	756.8
$Q_0(\mu F)$	2.61	2.43	2.27	2.26	2.29
n	0.93	0.94	0.94	0.94	0.94
$C_{dl}(\mu F)$	1.75	1.79	1.63	1.56	1.53

Tabella 4.2: Dati sperimentali PFBA a diversi intervalli

Purtroppo, non è stata riportata alcuna modifica sostanziale dell'impedenza nelle misurazioni con PFOS rispetto alle misurazioni con la sola funzionalizzazione. Il PFBA, che presenta lo stesso gruppo funzionale del PFOA, sembra poter dare dei segnali di interazione

sebbene più deboli di quelli riscontrati con il PFOA. Ciò potrebbe essere attribuito d alla ridotta dimensione di questa molecola se confrontata con il PFOA che presenta una catena carboniosa più lunga. Sarà necessario in futuro analizzare meglio questa possibilità.

4.2 Misurazione con GV38 e mediatore Redox ferri/ferrocianuro

Come ultimo esperimento, abbiamo eseguito un test utilizzando come specie redox il ferri/ferrocianuro nella speranza di amplificare il fenomeno. Abbiamo quindi effettuato alcune misurazioni con EIS utilizzando sempre lo stesso protocollo adottato nelle misure precedenti. I parametri utilizzati per queste misurazioni sono stati i seguenti:

- $V_{dc}=22\text{mV}$
- $V_{ac}=15\text{mV}$
- freq=1-100k Hz
- Hold time =10s

La decisione di inserire una V_{dc} non nulla è dovuta dalla necessità di polarizzare la soluzione per permettere alla reazione redox di verificarsi correttamente

Sono stati prodotti alcuni primi risultati promettenti ma su cui al momento non è possibile fare considerazioni rilevanti in quanto sono necessarie ulteriori esperienze.

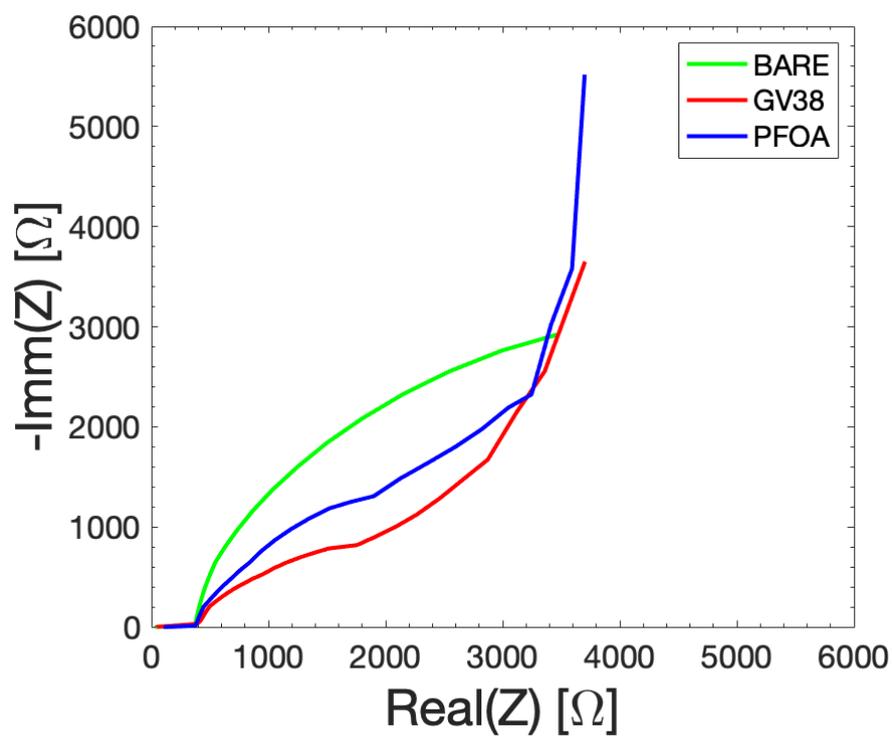


Figura 4.8: Nyquist EIS con redox

Capitolo 5

Conclusioni

Nonostante i dati ottenuti siano estremamente preliminari, le grandi difficoltà che si sono presentate fino ad oggi nell'ambito della rilevazione dei PFAS, dovute alle loro caratteristiche chimico-fisiche descritte nell'introduzione di questo elaborato, e i significativi limiti che le tecnologie attuali di rilevazione presentano rendono il lavoro svolto durante questa esperienza di grande valore scientifico.

L'individuazione di una o più molecole in grado di interagire sistematicamente con questa classe di composti apre la porta a numerose applicazioni future, non solo in ambito elettrochimico. Sebbene non sia stato trattato a fondo in questo elaborato, infatti, queste superfici funzionalizzate hanno permesso di ottenere risultati preliminari anche sfruttando la tecnica di rilevazione SERS, ma le possibili applicazioni vanno ancora oltre.

Come già accennato in precedenza, inoltre, lo sviluppo di un metodo di rilevazione rapido e applicabile in sito rappresenterebbe una vera e propria svolta nel monitoraggio di questi inquinanti nelle falde e nelle acque superficiali, in quanto nessuna tecnologia con queste caratteristiche è stata finora in grado di fornire risultati validi in soluzioni reali con concentrazioni vicine ai limiti di legge. Anche il corretto funzionamento di questa tecnica con concentrazioni più elevate potrebbe trovare importanti applicazioni in ambito industriale, poiché molte aziende che si occupano della degradazione di questi inquinanti potrebbero utilizzarla per verificare la corretta concentrazione e degradazione di tali sostanze.

Inoltre, in futuro, si potrebbe lavorare su sistemi di rilevazione che integrino un sistema di accumulo preliminare di queste sostanze prima della misurazione, al fine di facilitare il compito alla strumentazione sensoristica. Certamente, proseguendo dai risultati ottenuti in questo progetto, sarà necessario in futuro, oltre a caratterizzare meglio l'interazione tra il PFOA e la molecola GV38, ampliare l'analisi ad altri PFAS. Alcuni prototipi attualmente in fase di sviluppo, come quello dell'azienda canadese FREDsense, sfruttano array di sensori elettrochimici, ciascuno in grado di discriminare una singola sostanza, per fornire un'analisi

più dettagliata della soluzione.

L'utilizzo della tecnologia SERS in questo contesto potrebbe apportare un miglioramento significativo, in quanto capace, a differenza della tecnica EIS, di discriminare diverse molecole aderenti alla stessa superficie. In conclusione, i risultati ottenuti con questo lavoro, specialmente se consideriamo il tempo limitato a disposizione, sono estremamente soddisfacenti e possono certamente fornire un contributo importante nello sviluppo di un sistema economico e veloce per il rilevamento dei PFAS.

Bibliografia

- [1] S. C. E. Leung, D. Wanninayake, D. Chen, N.-T. Nguyen e Q. Li, «Physicochemical properties and interactions of perfluoroalkyl substances (PFAS)-Challenges and opportunities in sensing and remediation,» *Science of The Total Environment*, p. 166 764, 2023.
- [2] M. Schöpel, G. Jacobs, J. Jordens, G. van Ermen, S. Voorspoels e M. Krause, *Analytical Methods for PFAS in Products and the Environment*. Nordic Council of Ministers, 2022.
- [3] N. Kotlarz, J. McCord, D. Collier et al., «Measurement of novel, drinking water-associated PFAS in blood from adults and children in Wilmington, North Carolina,» *Environmental health perspectives*, vol. 128, n. 7, p. 077 005, 2020.
- [4] S. Salihovic, J. Stubleski, A. Kärman et al., «Changes in markers of liver function in relation to changes in perfluoroalkyl substances-a longitudinal study,» *Environment international*, vol. 117, pp. 196–203, 2018.
- [5] E. Papadopoulou, A. Sabaredzovic, E. Namork, U. C. Nygaard, B. Granum e L. S. Haug, «Exposure of Norwegian toddlers to perfluoroalkyl substances (PFAS): the association with breastfeeding and maternal PFAS concentrations,» *Environment international*, vol. 94, pp. 687–694, 2016.
- [6] Y. Cao e C. Ng, «Absorption, distribution, and toxicity of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the brain: a review,» *Environmental Science: Processes & Impacts*, vol. 23, n. 11, pp. 1623–1640, 2021.
- [7] K. Abraham, H. Mielke, H. Fromme et al., «Internal exposure to perfluoroalkyl substances (PFASs) and biological markers in 101 healthy 1-year-old children: associations between levels of perfluorooctanoic acid (PFOA) and vaccine response,» *Archives of toxicology*, vol. 94, n. 6, pp. 2131–2147, 2020.
- [8] P. W. F. N. U. B. M. A. T. Philippe Grandjean Carsten Heilmann e E. Budtz-Jørgensen, «Estimated exposures to perfluorinated compounds in infancy predict attenuated vaccine antibody concentrations at age 5-years,» *Journal of Immunotoxicology*, vol. 14, n. 1, pp. 188–195, 2017, PMID: 28805477. doi: 10.1080/1547691X.2017.1360968. eprint:

<https://doi.org/10.1080/1547691X.2017.1360968>. indirizzo: <https://doi.org/10.1080/1547691X.2017.1360968>.

- [9] T. Fletcher, T. S. Galloway, D. Melzer et al., «Associations between PFOA, PFOS and changes in the expression of genes involved in cholesterol metabolism in humans,» *Environment international*, vol. 57, pp. 2–10, 2013.
- [10] J. E. Zenobio, O. A. Salawu, Z. Han e A. S. Adeleye, «Adsorption of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) to containers,» *Journal of Hazardous Materials Advances*, vol. 7, p. 100 130, 2022, issn: 2772-4166. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100130>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772416622000869>.
- [11] C. Li, H. Geng, X. Zhu et al., «Self-assembly TiO₂ nanosheets as a SALDI-TOF-MS matrix for high-throughput identification of polyfluorinated compounds in water samples,» *Microchemical Journal*, vol. 152, p. 104 294, 2020.
- [12] C. Wang, W. Li, Y. Lv et al., «Rapid analysis of perfluorinated carboxylic acids in textiles by dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry,» *Microchemical Journal*, vol. 155, p. 104 773, 2020.
- [13] Y. T. Simonini Steiner, G. M. Romano, L. Massai et al., «Pyrene-Containing Polyamines as Fluorescent Receptors for Recognition of PFOA in Aqueous Media,» *Molecules*, vol. 28, n. 11, p. 4552, 2023.
- [14] H. Feng, N. Wang, L. Yuan, J. Li, Q. Cai et al., «Surface molecular imprinting on dye-(NH₂)-SiO₂ NPs for specific recognition and direct fluorescent quantification of perfluorooctane sulfonate,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 195, pp. 266–273, 2014.
- [15] Q. Liu, A. Huang, N. Wang, G. Zheng e L. Zhu, «Rapid fluorometric determination of perfluorooctanoic acid by its quenching effect on the fluorescence of quantum dots,» *Journal of Luminescence*, vol. 161, pp. 374–381, 2015.
- [16] F. Zhang, J. Liang, Y. Liu et al., «A highly sensitive dual-readout assay for perfluorinated compounds based CdTe quantum dots,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 269, p. 120 753, 2022.
- [17] L. Zheng, Y. Zheng, Y. Liu et al., «Core-shell quantum dots coated with molecularly imprinted polymer for selective photoluminescence sensing of perfluorooctanoic acid,» *Talanta*, vol. 194, pp. 1–6, 2019.

- [18] Q. Chen, P. Zhu, J. Xiong, L. Gao e K. Tan, «A sensitive and selective triple-channel optical assay based on red-emissive carbon dots for the determination of PFOS,» *Microchemical Journal*, vol. 145, pp. 388–396, 2019.
- [19] Z. Cheng, H. Dong, J. Liang et al., «Highly selective fluorescent visual detection of perfluorooctane sulfonate via blue fluorescent carbon dots and berberine chloride hydrate,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 207, pp. 262–269, 2019.
- [20] L. S. Walekar, M. Zheng, L. Zheng e M. Long, «Selenium and nitrogen co-doped carbon quantum dots as a fluorescent probe for perfluorooctanoic acid,» *Microchimica Acta*, vol. 186, pp. 1–9, 2019.
- [21] Y. Cui, S. Wang, D. Han e H. Yan, «Advancements in detection techniques for per- and polyfluoroalkyl substances: A comprehensive review,» *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 176, p. 117754, 2024, issn: 0165-9936. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117754>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993624002371>.
- [22] J. Zhu, B. Yang, L. Peng, J. Wu, H. Hao e S. Lou, «Target-triggered double fluorescent biosensors for rapid and sensitive detection of long-chain perfluorinated compounds using DNA probe and lysozyme fiber,» *Science of The Total Environment*, vol. 860, p. 160496, 2023.
- [23] Z. Jiao, J. Li, L. Mo, J. Liang e H. Fan, «A molecularly imprinted chitosan doped with carbon quantum dots for fluorometric determination of perfluorooctane sulfonate,» *Microchimica Acta*, vol. 185, pp. 1–9, 2018.
- [24] T.-Y. Guo, C. L. Duncan, H.-W. Li, C.-X. Zhang, M. Mocerino e Y. Wu, «Calixarene-based supramolecular assembly with fluorescent gold-nanoclusters for highly selective determination of perfluorooctane sulfonic acid,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 302, p. 123127, 2023.
- [25] J. Li, C. Zhang, M. Yin et al., «Surfactant-sensitized covalent organic frameworks-functionalized lanthanide-doped nanocrystals: an ultrasensitive sensing platform for perfluorooctane sulfonate,» *ACS omega*, vol. 4, n. 14, pp. 15947–15955, 2019.
- [26] Q. Chen, P. Zhu, J. Xiong, L. Gao e K. Tan, «A new dual-recognition strategy for hybrid ratiometric and ratiometric sensing perfluorooctane sulfonic acid based on high fluorescent carbon dots with ethidium bromide,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 224, p. 117362, 2020.

- [27] L. Tian, H. Guo, J. Li et al., «Fabrication of a near-infrared excitation surface molecular imprinting ratiometric fluorescent probe for sensitive and rapid detecting perfluorooctane sulfonate in complex matrix,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 413, p. 125 353, 2021.
- [28] X. Chen, S. Hussain, Y. Tang et al., «Two-in-one platform based on conjugated polymer for ultrasensitive ratiometric detection and efficient removal of perfluoroalkyl substances from environmental water,» *Science of The Total Environment*, vol. 860, p. 160 467, 2023.
- [29] K. Wijeratne, «Conducting Polymer Electrodes for Thermogalvanic Cells,» *Linköping Studies in Science and Technology. Dissertations*, 2018. indirizzo: [https : / / api . semanticscholar . org/CorpusID:139700586](https://api.semanticscholar.org/CorpusID:139700586).