



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica

Direttore Prof. Mauro Freccero

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

**Sviluppo di dispositivi di filtrazione basati sulla
polidopamina per pre-concentrazione e rilevazione di
nanoplastiche mediante spettroscopia Raman e Raman-
SERS**

Relatore:
Prof. Angelo Taglietti

Correlatore:
Dr. Serena Schiavi

Tesi di Laurea Magistrale di
Antonino Iaccarino

Anno Accademico 2025/2026

Sommario

Abstract.....	3
1. Introduzione.....	9
1.1. Nanomateriali	9
1.1.1. Nanoparticelle plasmoniche	9
1.1.2. Nanostelle d'oro (GNS).....	11
1.2. Spettroscopia Raman	13
1.3. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS).....	14
1.3.1. Dipendenza dell' <i>enhancement</i> SERS dalle proprietà del substrato.....	15
1.3.2. L'Efficienza SERS: l' <i>Enhancement</i> Factor	17
1.4. Biopolimeri catecolamminici: la polidopamina	18
1.4.1. Proprietà della Polidopamina	18
1.5. Micro- e nano-plastiche	20
1.5.1. Separazione di micro- e nano-plastiche mediante assorbimento: l'uso della polidopamina – stato dell'arte.....	21
1.6. Progetto di Tesi.....	23
2. Materiali e metodi.....	28
2.1. Reagenti e materiali	28
2.2. Strumentazione	30
2.3. Procedure.....	32
2.3.1. Lavaggio vetreria	32
2.3.2. Rivestimento dei filtri con polidopamina (filtri@PDA).....	32
2.3.3. Sintesi nanostelle d'oro (GNS).....	33
2.3.4. Filtrazione nanoplastiche	34
2.3.5. Preparazione dei substrati plasmonici	35

2.4.	Caratterizzazioni.....	36
2.4.1.	Caratterizzazione filtri@PDA	36
2.4.2.	Caratterizzazione sospensioni colloidali di nanoplastiche	36
2.4.3.	Valutazione della ritenzione di nanoplastiche sui filtri	37
2.4.4.	Caratterizzazione della sospensione colloidale di GNS	37
2.4.5.	Caratterizzazione substrato plasmonico	38
2.4.6.	Analisi Raman	39
3.	Risultati e discussione	40
3.1.	Preparazione filtri@PDA	40
3.1.1.	Analisi capacità di ritenzione dei Filtri – <i>particle concentration</i>	42
3.1.2.	Nanoplastiche di polistirene da 100 nm non modificate (PS-100nm)....	43
3.1.3.	Nanoplastiche di polistirene 100 nm positive (PS@NR ₃ ⁺ -100nm).....	49
3.1.4.	Nanoplastiche di polistirene 50 nm	51
3.1.5.	Nanoplastiche di PMMA 120 nm.....	54
3.2.	Analisi Raman di nanoplastiche pre-concentrate su Filtri@PDA	59
3.2.1.	PS 100 nm.....	59
3.2.2.	PMMA 120 nm.....	64
3.2.3.	PS 50 nm.....	66
3.3.	Funzionalizzazione plasmonica del substrato per rilevazione SERS	68
4.	Conclusioni e prospettive	74
5.	Riferimenti.....	76

Abstract

Nanoplastics represent one of the categories of emerging pollutants of greatest scientific interest, given that their small size favours their dispersion across a wide range of possible ecosystems, from marine environments to agricultural fields (**Figure I**).¹ This establishes an interaction with living organisms and a potential accumulation along the food chain. Although the scientific community is paying particular attention to the issue of nanoplastics, procedures capable of overcoming fundamental limitations—such as the difficulty of identifying and quantifying these contaminants in environmental matrices—are not yet available to date. For this reason, it is highly important to develop devices capable of pre-concentrating nanoplastics, thereby making their detection accessible through spectroscopic techniques. Among these, Raman spectroscopy is prominent by virtue of its non-destructive characteristics and its ability to yield spectra that coincide with the "fingerprints" of plastic materials.²

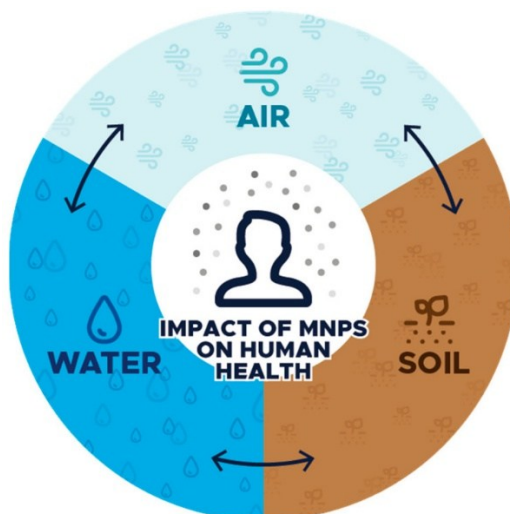


Figure I: impact of micro- and nano- plastics (MNPS) on human health.¹

The present thesis study is situated within this specific field of research. Our objective is to create a device capable of pre-concentrating nanoplastics, and to achieve this we functionalized the surface of commercial filters with a catecholaminic biopolymer called polydopamine (PDA). By exploiting the rich

surface chemistry of PDA, we are able to engineer a surface capable of maximizing interactions with nanoplastics under appropriate experimental conditions. The effective pre-concentration of nanoplastics on the filter@PDA device is essential for utilizing Raman spectroscopy during the detection phase.³

The filters were functionalized with PDA by exploiting the self-polymerization process of dopamine in the liquid phase in the presence of atmospheric oxygen and a weakly alkaline pH.⁴ The characterization of the filter@PDA was performed through qualitative observation of the surface colour change and SEM imaging. The retention capabilities of both the unmodified filter and filter@PDA filtration devices were investigated using MADLS particle concentration analysis, taking care to subject colloidal suspensions of the tester nanoplastics to the filtration process. The stability of these suspensions under two different pH conditions (pH 3 and pH 6) was confirmed by DLS measurements. The possibility of detecting pre-concentrated nanoplastics on the filters@PDA was evaluated by Raman spectroscopy. For the detection of smaller nanoplastics, whose identification is notoriously difficult using conventional Raman spectroscopy, a SERS substrate was designed. This substrate was obtained by functionalizing the surface of the filter@PDA through the filtration of a colloidal suspension of GNS previously synthesized using a seed-growth methodology; the colloid characterization involved the UV-Vis extinction spectrum recording and TEM imaging.

The experimental results highlighted that the preparation of filter@PDA filtration devices constitutes an effective strategy for the pre-concentration of tester nanoplastics. When the filtration process takes place under appropriate experimental conditions, the adsorption of nanoplastics onto the filter surface is a direct consequence of electrostatic interactions between the filter surface and the nanoplastics. SEM images confirmed that the formation of a thin polydopamine coating (approximately 10 nm thick) does not significantly alter the material's porosity nor compromise its permeability, allowing the passage of nanoplastics through the filtering structure. Filtration tests showed that the retention capacities of the filter@PDA strongly depend on the pH of the colloidal suspension of

nanoplastics being filtered. This confirms that the adsorption mechanism of nanoplastics onto the device is driven by the development of electrostatic interactions between the surface and the nanoplastics when there is a complementarity in the sign of their respective charges, as illustrated in **Figure II**. The experimental evidence showing an absence of quantitative retention capacity for the filter@PDA when the filtration process is carried out under unfavourable pH conditions indicates that the retention performance of our devices depends strongly on adsorption mediated primarily by electrostatic interactions, rather than a sieving effect due to pore diameter reduction following the PDA coating.

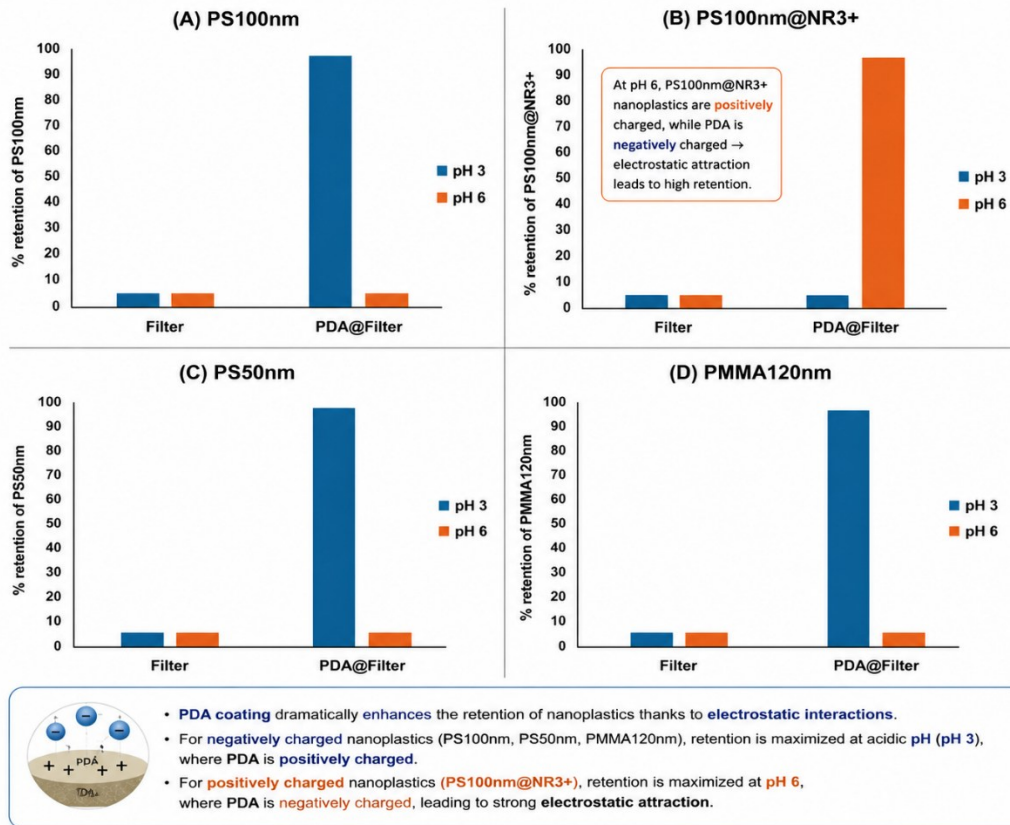


Figure II: Retention capacity analysis of filter and filter@PDA toward tester nanoplastics under different pH conditions: comparative synoptic overview of the main results (original graphs and specific numerical data are reported in Chapter 3.2). Graphic developed by the author with the assistance of generative AI [ChatGPT].

The high retention capacities establish the possibility of pre-concentrating tester nanoplastics on the filter@PDA device, enabling the use of conventional Raman spectroscopy to detect the presence of the nanoplastics. In particular, for PS100nm, it was possible to resolve well-defined spectra and highlight a linear correlation between the intensity of the main polystyrene Raman marker (the peak falling at 1001 cm^{-1}) and the initial concentration of the filtered colloidal suspension. This demonstrates the potential of using the described approach to perform semi-quantitative analyses for concentrations in the ppm range. Similarly, it was possible to detect PMMA nanoplastics of 120 nm in diameter, proving the versatility of the approach toward different plastic materials and, above all, the key role of pre-concentration in successfully detecting analytes with a small cross-section via Raman spectroscopy. Conversely, using conventional Raman spectroscopy, it was not possible to detect the presence of PS50nm. SEM images allowed this behaviour to be attributed not to a reduction in the retention capacity of the filter@PDA toward PS50nm, but rather to the different adsorption pattern of the nanoplastics within the porous structure of the device. Due to their smaller size, the nanoplastics permeate into the deeper layers of the filter, resulting in an insufficient local concentration within the volume sampled by the Raman laser. In the case of particles around 100 nm in size, on the other side, the particles pack into compact layers (as also indicated by SEM images), forming an easily detectable layer. **Figure III** highlights the differences described above.

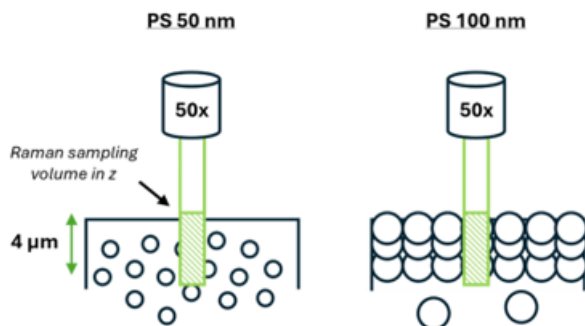


Figure III: Illustrative diagram of the different distribution patterns of PS50nm and PS100nm nanoparticles on the filter@PDA. The different adsorption relative

to the sampling volume of the Raman measurement influences the technique's capability to detect the presence of nanoplastics.

To overcome these limitations, a SERS substrate was developed. The latter is prepared starting from the filter@PDA, through which an aliquot of a colloidal suspension of plasmonic nano-objects—gold nanostars (GNS) in our case study—is subsequently filtered.⁵

Figure IV shows SEM images of the obtained substrates.

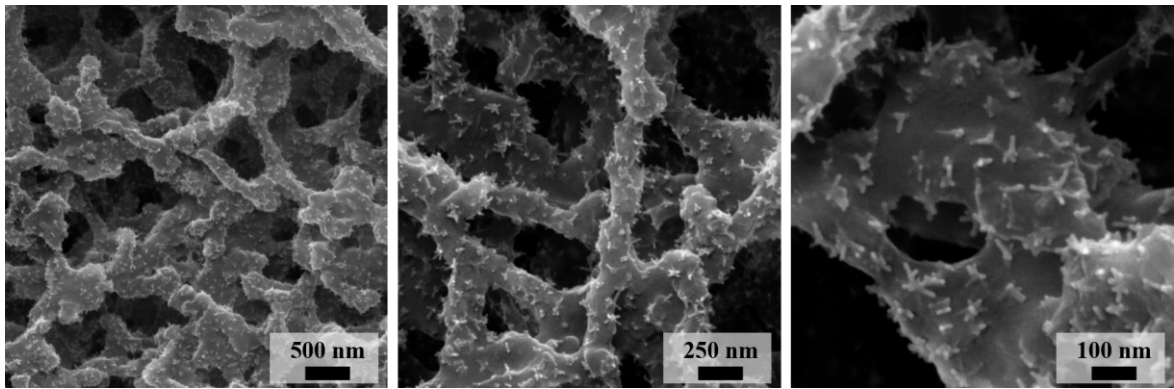


Figure IV: SEM imaging of SERS substrates

Although the procedure successfully allowed the preparation of the SERS substrate, experimental results suggest that the presence of electrostatic repulsions between the GNS and the nanoplastics prevents effective retention of the nanoplastics on the surface. This result allowed to identify the main limitations of the device and to define future development strategies for designing higher-performing SERS substrates, which should involve the use of positively charged plasmonic objects when targeting negative nanoplastics, or *vice versa*.

Overall, we demonstrated that the functionalization of commercial filters with PDA represents an effective strategy for the pre-concentration of nanoplastics when pH conditions favour the establishment of attractive electrostatic interactions between the filter surface and the analytes, making subsequent identification by Raman spectroscopy possible. The experimental results show how the ability to

chemically modify the filter surface constitutes a key element for improving the efficiency of the physicochemical processes responsible for loading nanoplastics inside filtration devices.

Beyond the potential use in analytical fields, the achieved results suggest that filtration devices functionalized with polydopamine may also represent a promising platform for remediation applications in waters contaminated by nanoplastics. This opens new perspectives for the development of innovative materials intended both for the monitoring and for the removal of these emerging pollutants.

1. Introduzione

1.1. Nanomateriali

La nanochimica riguarda la totalità delle tecniche che si pongono come obbiettivo la progettazione, caratterizzazione e manipolazione di materiali nanometrici. Un materiale è definibile nanostrutturato quando almeno una delle 3 dimensioni che lo caratterizza è inferiore ai 100 nm.⁶ In queste condizioni, il materiale può esibire importanti variazioni nelle proprietà chimico-fisiche, spesso sensibilmente diverse se confrontate con le proprietà dello stesso materiale in forma *bulk*, o alla comparsa di “nuove” proprietà, tipiche dei nanomateriali. Per questa ragione, i nanomateriali sono oggi ampiamente studiati per le loro potenziali applicazioni in numerosi ambiti di ricerca.⁷⁻⁸

L'origine di queste nuove ed interessanti proprietà chimico fisiche associate ai nanomateriali è da ricercarsi principalmente nella loro elevata energia superficiale e ad effetti di natura quantistica. Il comportamento chimico fisico dei nanomateriali è espressione del loro elevato contenuto in energia superficiale dovuto all' elevato rapporto tra atomi superficiali e atomi *bulk* del cristallo stesso. È opportuno di fatti ricordare che gli atomi superficiali presentano uno stato energetico termodinamicamente più instabile rispetto agli atomi che costituiscono il volume interno del nanocristallo. L'energia superficiale di una nanoparticella, dunque, cresce con la diminuzione del raggio della stessa ed è proprio l'energia superficiale che guida processi come l'*Ostwald Ripening*, l'aggregazione o anche la capacità di fisisorbimento di specifici agenti chimici sulla superficie delle nanoparticelle.⁹ Inoltre, la dimensione nanometrica rende rilevanti gli effetti di confinamento quantico, in grado di modificare le proprietà elettroniche, ottiche e magnetiche dei materiali.¹⁰

1.1.1. Nanoparticelle plasmoniche

Nanomateriali 0D (cioè materiali nei quali tutte e tre le dimensioni spaziali sono comprese nella nanoscala, cioè, in genere, tra 0 e 100 nm) a base di metalli nobili

come oro, argento, palladio e platino suscitano grande interesse in virtù di proprietà caratteristiche che emergono grazie alla nanoscala.¹¹ Tra le diverse tipologie di nanomateriali, quelli plasmonici hanno mostrato un enorme interesse e sono stati sviluppati per un gran numero di applicazioni in campi come la nanomedicina,¹² fotonica,¹³ elettronica¹⁴ e *biosensing*¹⁵ per via della loro capacità di interagire fortemente con luce incidente.

Quando ad un materiale metallico (conduttore) viene applicato un campo elettromagnetico esterno, si può generare un movimento oscillatorio collettivo e coerente degli elettroni liberi di superficie. In condizioni di risonanza, gli elettroni liberi rispondono al campo elettromagnetico esterno oscillando collettivamente e generando un plasmone di superficie che si propaga lungo la superficie del metallo. Alla nanoscala, la lunghezza d'onda del campo esterno incidente è molto maggiore rispetto alle dimensioni della nanoparticella, di fatto coinvolgendo tutti gli elettroni liberi del metallo. Di conseguenza, tutti gli elettroni liberi presenti nella nanoparticella risentono del campo elettrico esterno incidente. Questo induce un'oscillazione collettiva dipolare della nube elettronica che, al raggiungimento di una specifica condizione di risonanza, dà origine a un intenso assorbimento della radiazione a una determinata lunghezza d'onda. Tale oscillazione elettronica confinata prende il nome di *Localized Surface Plasmon Resonance* (LSPR).¹⁶ Il risultato della LSPR è osservabile come intensi assorbimenti di radiazione elettromagnetica visibili come picchi nella regione Uv-Visibile. I picchi osservati sono definiti picchi di estinzione, poiché l'attenuazione della radiazione incidente è il risultato sia dell'assorbimento dovuto alla risonanza plasmonica localizzata (LSPR) sia della diffusione (*scattering*) della luce. Il contributo di quest'ultimo fenomeno varia in funzione delle caratteristiche delle nanoparticelle, dalle loro dimensioni e della loro efficienza nel diffondere la radiazione incidente. La risposta plasmonica di questi sistemi è influenzata da varie caratteristiche: la frequenza di assorbimento delle bande LSPR può infatti essere modulata da diverse variabili, tra cui la natura chimica del materiale, la morfologia e la dimensione dei nano-oggetti.¹⁷

Oltre a queste proprietà intrinseche, anche variazioni del mezzo disperdente o della chimica superficiale delle nanoparticelle possono indurre uno spostamento della posizione delle bande LSPR.

Come già accennato, la forma e la dimensione delle nanoparticelle influenza drasticamente la posizione delle bande LSPR, spesso dando luogo a profili di estinzione con bande multiple.¹⁷⁻¹⁸ Di conseguenza, modulando la geometria e l'*aspect ratio* di nano-oggetti anisotropici è possibile controllare la posizione delle bande di assorbimento plasmonico. Un esempio classico è rappresentato dai *nanorod* e dalle nanostelle d'oro, la cui anisotropia geometrica consente di spostare le bande LSPR verso lunghezze d'onda maggiori, fino alla regione del vicino infrarosso (NIR). Quest'ultima coincide con la cosiddetta finestra biologica, un intervallo spettrale in cui i tessuti biologici presentano un assorbimento ridotto e risultano quindi relativamente trasparenti alla radiazione incidente.

1.1.2. Nanostelle d'oro (GNS)

Come anticipato, un esempio particolarmente rilevante di nanoparticelle anisotropiche è rappresentato dalle nanostelle d'oro (*gold nanostar*, GNS). Questi nano-oggetti hanno suscitato grande interesse grazie alla possibilità di modulare con elevata precisione le loro proprietà plasmoniche, controllando la posizione delle bande LSPR attraverso la progettazione della loro morfologia. In particolare, la lunghezza, il numero e l'architettura delle punte che si sviluppano attorno al *core* consentono di regolare efficacemente la risposta ottica della nanostruttura.¹⁸

I classici metodi di sintesi delle GNS seguono approcci di tipo *seed-growth*, nei quali una popolazione iniziale di nanoparticelle sferiche di pochi nanometri di diametro viene impiegata come nucleo per la successiva crescita anisotropica della struttura.¹⁹ I *seed* vengono infatti poi introdotti in una soluzione contenente il precursore aurico insieme ad un blando agente riducente, che promuove una riduzione lenta e controllata degli ioni metallici, favorendo la crescita attorno al nucleo preformato invece di promuovere nuova nucleazione. In presenza di

opportuni agenti riducenti, tensioattivi e/o ioni metallici direzionanti, la deposizione del metallo avviene in modo preferenziale lungo specifiche direzioni cristallografiche, promuovendo la formazione delle caratteristiche punte che si sviluppano attorno al core centrale. In questo elaborato di tesi è stata utilizzata una metodica di sintesi che vede come agente di crescita anisotropica il tensioattivo non ionico Triton X 100 il quale ricopre due ruoli fondamentali; infatti, oltre ad essere l'agente di crescita anisotropica è anche l'agente stabilizzante che attraverso il *coating* stabilizza termodinamicamente le nanostelle.²⁰

Le GNS ottenute utilizzando il Triton X-100 presentano tipicamente 3 bande LSPR. La prima, tra 530 e 560 nm è tipicamente correlata alla LSPR trasversale delle braccia della stella o alla presenza di eventuali particelle rimaste sferiche che non sono andate incontro al processo di accrescimento; la seconda (tra 600 e 900 nm) e la terza banda LSPR (quella più intensa e che comunemente cade tra 1100 e 1600 nm) sono rispettivamente associate alle oscillazioni degli elettroni localizzati su un singolo braccio e lungo le due braccia collineari delle GNS. Il posizionamento nello spettro di estinzione di queste due bande dipende fortemente dalle proprietà dimensionali della nanostella. Sperimentalmente è stato dimostrato

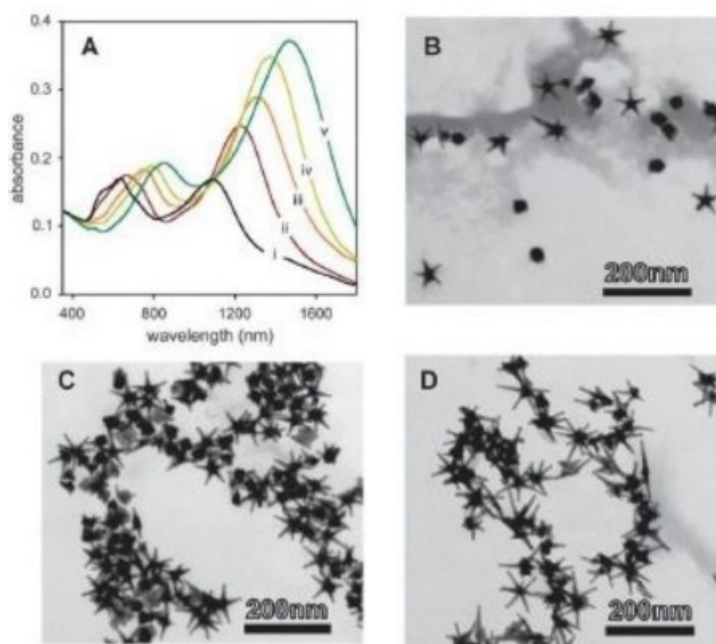


Figura 1: A) Spettri di estinzione di GNS ottenute utilizzando concentrazioni crescenti di acido ascorbico. B- D) Corrispondenti immagini TEM.²⁰

come l'incremento nella lunghezza delle braccia delle nanostelle comporti un maggiore *red shift* associato alle due bande LSPR e come la loro dimensione possa essere regolata variando la concentrazione di acido ascorbico all'interno della soluzione di crescita (**Figura 1**).²⁰

1.2. Spettroscopia Raman

La Spettroscopia Raman è una tecnica vibrazionale in grado di identificare diverse molecole grazie alla loro cosiddetta “impronte digitale” vibrazionale. I segnali Raman sono il risultato dello *scattering* anelastico dei fotoni da parte delle molecole. Si tratta di un processo che si sviluppa quando, in seguito all'interazione con una radiazione incidente (sorgente laser monocromatica), la molecola viene temporaneamente portata in uno stato energetico virtuale. Una volta eccitata, la molecola può tornare al suo stato fondamentale attraverso diversi meccanismi ma affinché il processo sia Raman-attivo, il moto vibrazionale deve comportare una variazione della polarizzabilità molecolare; in questo caso, il fotone viene riemesso con energia diversa da quella iniziale, generando il segnale Raman.²¹ La differenza in energia tra il fotone assorbito e quello emesso coincide con l'energia di uno specifico livello energetico vibrazionale della molecola. È possibile schematizzare questi concetti con il diagramma di Jablonski (**Figura 2**).²²

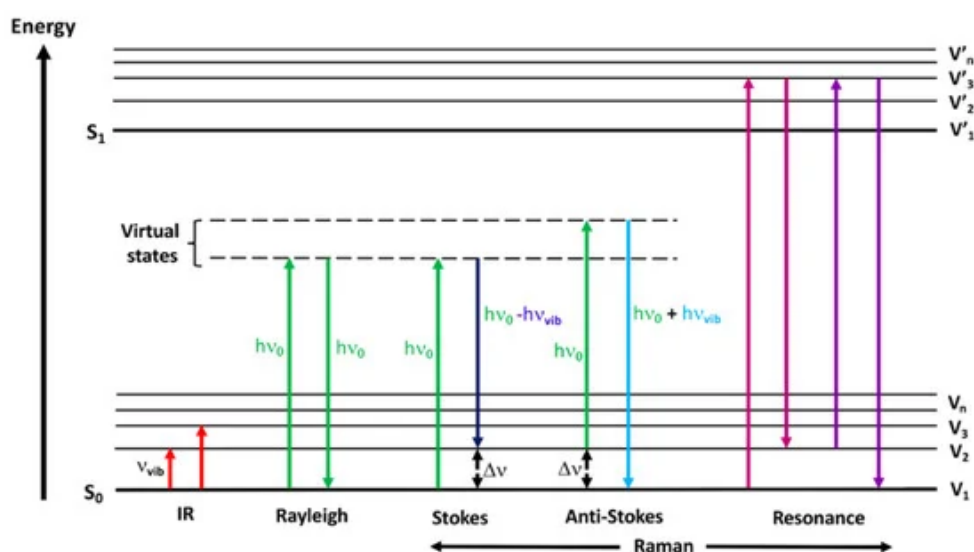


Figura 2: Diagramma di Jablonski.²²

La posizione spettrale dei picchi Raman è caratteristica della struttura chimica dell'analita, mentre l'intensità del segnale è correlata a quanto intensamente varia la polarizzabilità della molecola a seguito della vibrazione molecolare.²³

Per via della sua natura non distruttiva e dell'elevata risoluzione spaziale, la spettroscopia Raman rappresenta una delle tecniche più versatili per la caratterizzazione di materiali allo stato solido.²⁴ Il segnale Raman è però di sua natura poco intenso: larga parte della radiazione elettromagnetica che viene effettivamente diffusa dalle molecole è di tipo Rayleigh, solo una ristretta frazione è in grado di subire diffusione Raman Stokes e Anti-Stokes (**Figura 3**).²⁵

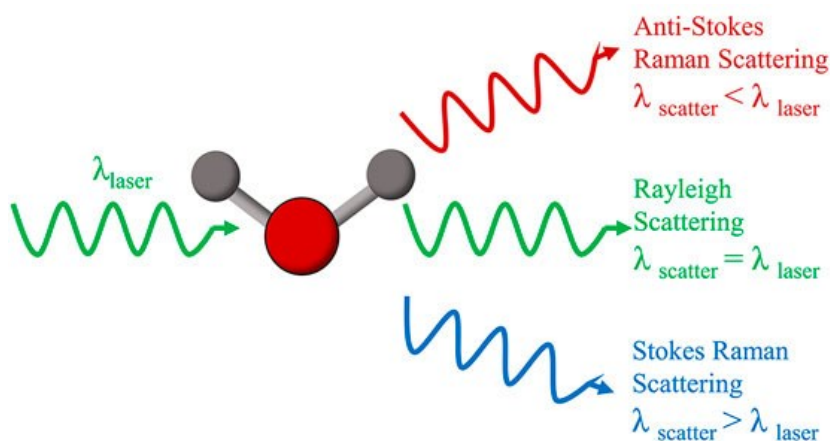


Figura 3: schematizzazione grafica dell'interazione tra analita e radiazione laser evidenziando i due principali meccanismi di diffusione: Rayleigh e Raman stokes e Anti-Stokes.²⁵

La scarsa probabilità di osservazione di un fenomeno Raman è riconducibile alla sezione d'urto (*cross section*) Raman delle molecole, nell'ordine dei 10^{-29} cm^2 .²¹ Questo rappresenta uno dei principali limiti dell'impiego della spettroscopia Raman in applicazioni di *sensing*. Per tale motivo negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche Raman amplificate, con l'obiettivo di sfruttare l'elevato contenuto informativo dello *scattering* Raman e, al tempo stesso, superarne la sensibilità intrinsecamente limitata.

1.3. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

Come evidenziato nella sezione precedente, una delle principali limitazioni della tecnica Raman è l'intrinseca debolezza dell'intensità del segnale. La spettroscopia

Raman amplificata da superficie (SERS) è in grado di risolvere il problema, sfruttando la amplificazione del campo elettromagnetico locale ad opera di nano-superfici plasmoniche, fenomeno che, in pratica, aumenta la sezione d'urto Raman di un dato analita, risultando in un forte incremento dell'intensità del segnale Raman.

Sebbene il fenomeno della SERS sia stato osservato un prima volta nel 1973 da Martin Fleischmann, Paul J.W.F. Hendra e A. James McQuillan,²⁶⁻²⁷ fu solo a partire dal 1977 che la nostra conoscenza sull'origine dell'*enhancement* Raman è stata approfondita scoprendo la correlazione tra presenza di superfici metalliche rugose e l'*enhancement* Raman.²⁸ Nel 1978 Moskovits correlò l'amplificazione del segnale Raman osservato in SERS all'eccitazione dei plasmoni superficiali sulle superfici metalliche indotta da una sorgente di radiazione elettromagnetica esterna.²⁹ È fondamentale evidenziare come l'*enhancement* elettromagnetico sia in realtà il risultato di differenti meccanismi chimico-fisici: l'*enhancement* elettromagnetico e l'*enhancement* chimico dove il primo incide in modo determinante nell'amplificazione del segnale Raman con un fattore di incremento di 10^6 - 10^{12} mentre l'*enhancement* chimico incrementa l'intensità del segnale Raman di un fattore 10-100.³⁰⁻³¹ È importante precisare che l'*enhancement* elettromagnetico può essere scomposto in due distinti contributi: l'amplificazione del campo elettromagnetico incidente, strettamente legata alle proprietà plasmoniche del nanomateriale, e l'amplificazione del campo diffuso, relativa alla capacità della superficie plasmonica di interagire con il segnale Raman e potenziarne l'intensità.²⁹

1.3.1. Dipendenza dell'*enhancement* SERS dalle proprietà del substrato.

La capacità di un substrato plasmonico nanostrutturato di generare un efficace *enhancement* Raman è strettamente correlata alle sue proprietà chimiche, dimensionali e morfologiche. Per quanto riguarda la scelta del metallo da utilizzare

per la realizzazione di un substrato SERS, è fondamentale considerarne le proprietà dielettriche. La risonanza plasmonica superficiale, infatti, si verifica quando la parte reale della costante dielettrica assume valori negativi, mentre la parte immaginaria deve essere quanto più possibile prossima allo zero. A causa di ciò, tra i materiali più adatti per la realizzazione di substrati SERS attivi rientrano oro, argento e rame.³² Dimensione e morfologia di nano-oggetti plasmonici inoltre costituiscono parametri fondamentali per la manipolazione delle proprietà ottiche e dunque per l'efficienza degli *enhancement* SERS ottenibili da questi substrati. Per quanto concerne le dimensioni, è fondamentale che la nanoparticella metallica presenti dimensioni inferiori rispetto la lunghezza d'onda della radiazione incidente in modo da rendere possibile ed efficace l'eccitazione dei modi plasmonici dipolari. Aumentando le dimensioni del nano-oggetto possiamo eccitare modi multipolari di ordine superiore, come quadrupolari o ottupolari, i quali però presentano una minore efficienza nell'attivazione Raman. Ridurre invece eccessivamente le dimensioni delle nanoparticelle ha come conseguenza una diminuzione dell'efficienza plasmonica dovuta ad una minore capacità di fare avvenire lo *scattering* della radiazione incidente. Esiste un range dimensionale ottimale per quanto riguarda la progettazione di substrati SERS e prevede di realizzare nano-oggetti di dimensioni comprese tra 10 e 100 nm.³³ Anche la forma delle nanoparticelle gioca un ruolo chiave. Oggetti anisotropici come *nanorod* e nanostelle presentano una morfologia nella quale sono presenti elementi come punte, bordi e spigoli. In prossimità di questi siti strutturali è stato dimostrato come si generino amplificazioni del campo elettromagnetico locale significativamente superiori rispetto al caso delle nanoparticelle sferiche.³³⁻³⁵ Questo comportamento è dovuto al grande accumulo di densità di carica ed una forte concentrazione del campo elettromagnetico in prossimità delle regioni superficiali caratterizzate da un'elevata curvatura (**Figura 4**).³³ Queste regioni vengono comunemente indicate come *hot spots*.³⁶⁻³⁷ Infine, la distanza tra la molecola analizzata e la superficie metallica è un altro parametro fondamentale che determina l'efficienza della SERS. Il campo elettromagnetico generato dai fenomeni LSPR, dal quale dipende

la risposta SERS, è infatti fortemente localizzato in prossimità della superficie metallica e decade come l'inverso della terza potenza della distanza dalla superficie plasmonica: è quindi fondamentale minimizzare la distanza tra analita e substrato.

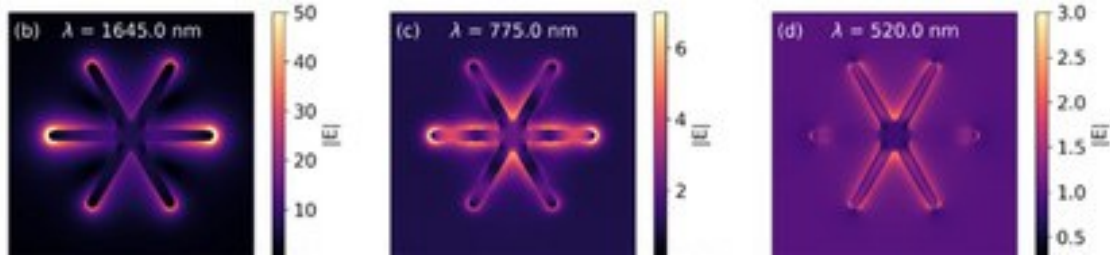


Figura 4: Mappe del campo locale associate alla risonanza dipolare principale a $\lambda = 1645 \text{ nm}$ e $\lambda = 850 \text{ nm}$; (c) risonanza di secondo ordine a $\lambda = 775 \text{ nm}$ e $\lambda = 600 \text{ nm}$; (d) risonanze del core d'oro a $\lambda = 520 \text{ nm}$.³³

1.3.2. L'Efficienza SERS: l'Enhancement Factor

L'efficienza di un substrato SERS viene comunemente valutata mediante l'Enhancement Factor (EF), definito come il rapporto tra l'intensità del segnale Raman misurato in condizioni SERS e, per lo stesso analita, quello ottenuto in condizioni di Raman convenzionale.³⁸ L'EF quantifica dunque l'incremento dell'intensità Raman indotto dalla presenza del substrato SERS e normalizzato per il numero di molecole, indicando un parametro utile per caratterizzarne le prestazioni. Una classica formula per il suo calcolo è la seguente:

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{SERS}}{I_{Raman}/N_{Raman}} \quad \text{Eqn. 1}$$

dove I_{SERS} è l'intensità SERS del singolo analita, I_{Raman} l'intensità Raman media, N_{SERS} è il numero di molecole che contribuisce in maniera effettiva alla produzione del segnale SERS e la loro distribuzione superficiale e N_{Raman} è il numero di molecole presenti nel volume Raman che sono state analizzate.

1.4. Biopolimeri catecolamminici: la polidopamina

La modificazione delle proprietà chimiche superficiali di un substrato solido mediante la realizzazione di un *coating* polimerico è un campo di notevole interesse nella moderna chimica dei materiali.³⁹ In questo contesto, i biopolimeri catecolamminici, e in particolare la polidopamina, rivestono un ruolo di grande interesse grazie alle loro peculiari proprietà chimico-fisiche.⁴⁰ Negli ultimi anni, questi materiali hanno infatti attirato crescente attenzione per la funzionalizzazione di superfici, grazie alla loro capacità di formare rivestimenti sottili e aderenti su un'ampia varietà di substrati.

1.4.1. Proprietà della Polidopamina

La polidopamina presenta delle proprietà che la rendono particolarmente adatta per essere utilizzata come materiale di rivestimento per una vasta gamma di substrati solidi.⁴⁰ La presenza di diversi gruppi funzionali nella sua struttura chimica consente alla polidopamina di interagire efficacemente con materiali di diversa natura, favorendone l'adesione su numerose superfici.⁴⁰⁻⁴¹ Questa capacità, unita alla possibilità di modulare ulteriormente la superficie tramite funzionalizzazioni successive, rende la polidopamina un materiale estremamente versatile per la preparazione di rivestimenti funzionali.⁴²⁻⁴³ Il processo di ricopertura di un substrato solido con polidopamina è di semplice realizzazione e può essere ottenuto attraverso diverse strategie sintetiche. Tra queste, una delle strategie più note e ampiamente impiegate prevede l'auto-ossidazione della dopamina in soluzione. In condizioni lievemente basiche, la dopamina va incontro a un processo di auto-polimerizzazione ossidativa, favorito dall'ossigeno disciolto e da quello naturalmente presente nell'aria.⁴⁰ Controllando il tempo di polimerizzazione e il pH della soluzione è anche possibile esercitare controllo sullo spessore dello strato polimerico adesivo localizzato sul substrato a livello nanometrico.⁴⁴

Una delle caratteristiche più interessanti della polidopamina è la sua capacità di modificare la propria carica superficiale, e di conseguenza il potenziale ζ , in funzione del pH del mezzo.⁴⁵ Come illustrato in **Figura 5**, sulla superficie del biopolimero sono espresse funzionalità organiche catecoliche ed amminiche, le quali, in funzione del pH di lavoro possono comportarsi come acidi/basi di Bronsted, risultando così in una carica complessiva superficiale netta positiva o negativa.

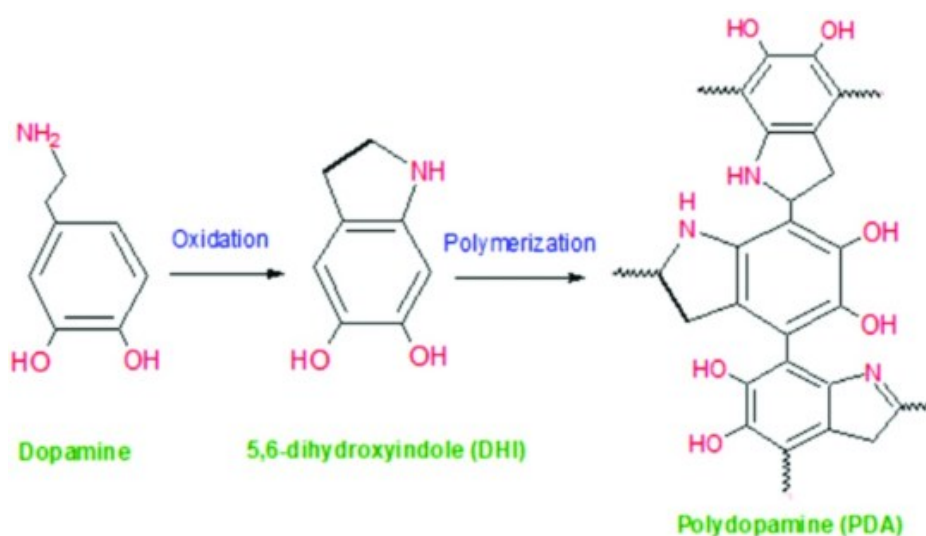


Figura 5: illustrazione schematica della struttura della dopamina e del processo di polimerizzazione a formare la polidopamina.⁴⁶

La modulazione del potenziale superficiale della polidopamina è quindi principalmente riconducibile a processi acido-base di Brønsted che coinvolgono le funzionalità amminiche, indoliche e catecoliche presenti nella sua struttura. In ambiente acido, ad esempio a pH intorno a 3, la protonazione dei gruppi amminici e indolici favorisce la formazione di una densità di carica positiva sulla superficie del polimero. Al contrario, spostandosi verso condizioni meno acide, indicativamente a pH superiori a 4, la progressiva deprotonazione delle funzionalità catecoliche contribuisce all'inversione del segno della carica superficiale, rendendo la superficie della polidopamina complessivamente negativa.⁴⁵ Questa capacità di modulare la carica superficiale si integra con le note proprietà adesive della polidopamina, che derivano dalla presenza di diversi gruppi

funzionali in grado di instaurare molteplici interazioni con materiali di diversa natura. Tra queste rientrano interazioni π - π , legami di coordinazione con centri metallici, legami a idrogeno e, appunto, interazioni elettrostatiche.⁴⁰ Proprio la combinazione tra adesività, versatilità chimica e risposta superficiale dipendente dal pH rende la polidopamina un materiale particolarmente interessante per la funzionalizzazione di substrati solidi. Come verrà discusso più dettagliatamente nelle sezioni successive della Tesi, l'insieme di queste proprietà chimico-fisiche possono essere sfruttate nello sviluppo di sistemi in grado di catturare e pre-concentrare nanoplastiche, allo scopo di eliminarle dai campioni acquosi (*remediation*) o di rilevarne la presenza.

1.5. Micro- e nano-plastiche

Negli ultimi decenni la produzione mondiale di plastiche ha conosciuto un esorbitante incremento. In virtù delle loro uniche proprietà chimico fisiche, i materiali polimerici plastici sono stati largamente impiegati in molti settori, dall'industria farmaceutica alla produzione alimentare. Recenti studi hanno dimostrato che entro il 2050 il tonnellaggio metrico di rifiuti plastici raggiungerà le 12000 tonnellate.⁴⁷ La problematica di maggior rilevanza è associata alla loro scarsa biodegradabilità, fatto che le rende particolarmente persistenti. L'elevata persistenza, abbinata alla dispersione nell'ambiente, fa sì che le plastiche siano oggetto di una serie di meccanismi di lenta degradazione che portano all'introduzione di micro- e nano-plastiche nell'ambiente. Tra questi meccanismi di degradazione i principali sono la degradazione mediante erosione, la fotolisi, (associata all'esposizione alla radiazione solare) e la degradazione meccanica.⁴⁸

La *National Oceanic and Atmospheric Administration* definisce microplastiche piccole particelle polimeriche di dimensioni inferiori a 5 mm in una dimensione.⁴⁹ Per quanto concerne le nanoplastiche, ad oggi ancora non vi è una definizione universalmente accettata, sebbene quella maggiormente utilizzata sia stata formulata dalla *European Food Safety Authority* e prevede di classificare come

nanoplastiche particelle solide costituite da polimeri sintetici o semisintetici insolubili in acqua, con almeno una dimensione compresa tra 1 e 1000 nm.⁵⁰

La presenza di micro- e nano-plastiche è stata rinvenuta non solo ed esclusivamente nei mari, nell'acqua potabile o nei campi destinati alla produzione agricola ma anche negli alimenti e nei prodotti cosmetici. Inoltre, a causa delle ridotte dimensioni, le nanoplastiche possono oltrepassare le barriere biologiche ed accumularsi all'interno degli esseri viventi⁵¹ e ciò può portare a problematiche quali abrasioni o occlusioni interne, ma anche infiammazione intestinale e danni cellulari negli esseri umani.⁵²⁻⁵³

La necessità odierna è dunque quella di concepire delle strategie mediante le quali separare questi piccoli residui plastici dalle fasi acquose in cui si disperdono.⁵⁴ Attualmente esistono diversi metodi che consentono di rimuovere microplastiche dalle acque reflue, come i bioreattori a membrana,⁵⁵ dispositivi basati su fanghi attivati,⁵⁶ la fotocatalisi,⁵⁷ e la flocculazione, il cui il meccanismo d'azione è basato sull'incentivare l'aggregazione delle plastiche nano e micro-strutturate.⁵⁸ Questi approcci industriali però evidenziano delle limitazioni non solo associate alla complessità di fabbricazione dei dispositivi e negli effettivi costi di produzione, ma anche alla loro inadeguatezza nel separare efficacemente plastiche dal diametro inferiore ai 10 µm.

1.5.1. Separazione di micro- e nano-plastiche mediante assorbimento: l'uso della polidopamina – stato dell'arte

L'assorbimento di micro e nano-plastiche su appositi dispositivi assorbenti è una strategia di bonifica delle acque che si sta affermando come valida alternativa alle metodologie precedentemente elencate. Sfruttare l'assorbimento è sicuro, semplice, economico, chimicamente versatile, energeticamente conveniente e consente di pre-concentrare e recuperare inquinanti di vario tipo e natura.

La ricerca scientifica negli ultimi anni ha prodotto diversi studi relativi alla progettazione di dispositivi assorbenti in grado di separare e pre-concentrare micro- e nano-plastiche da matrici acquose. La chimica alla base di questi substrati

assorbenti è molto variabile sia in termini composizionali che di architettura, ma è possibile riconoscere alcune proprietà comuni come l'elevata area superficiale specifica ottenuta mediante l'impiego di materiali nanostrutturati oppure microstrutture ad elevato grado di porosità. Un'ulteriore caratteristica comune risulta essere la necessità di apportare ulteriori modificazioni in grado di ridefinire le proprietà chimico fisiche superficiali con lo scopo di rendere il dispositivo assorbente particolarmente affine verso specifici agenti inquinanti. Una trattazione esaustiva di questi sistemi, tuttavia, esula dallo scopo di questa introduzione, ma può essere recuperata da una delle numerose *review* apparse negli ultimi anni.⁵⁹ È importante qui notare, invece, come la polidopamina stia assumendo in questi anni un ruolo sempre maggiore in questo contesto, grazie alle sue efficaci interazioni con gli inquinanti plastici.

Il primo studio nel quale viene introdotta la polidopamina per assorbimento efficace di micro- e nano-plastiche risale al 2021, dove *H. Zhou et al.* mostrano lo sviluppo di un substrato basato su nanoparticelle magnetiche a base di Fe_3O_4 .⁶⁰ Le particelle sono state poi funzionalizzate con polidopamina e sulla sua superficie sono stati localizzati enzimi lipasi in grado di degradare, in una fase successiva, gli inquinanti adsorbiti. Negli anni successivi sono stati progettati substrati di assorbimento basati su aerogel e materiali porosi come nello studio di *Zhang et al.*, dove è stato sviluppato un materiale composito assorbente per nanoplastiche basato sull'alga *Chlorella* funzionalizzata successivamente con polidopamina per incrementarne le prestazioni di caricamento delle nanoplastiche e nanoparticelle di Fe_3O_4 per operarne il recupero sfruttandone le proprietà magnetiche.⁶¹ *Zheng et al.* hanno proposto un sistema assorbente di tipo aerogel basato su un materiale composito, chitosano magnetico, e anche in questo caso per incrementare le proprietà di ritenzione delle nanoplastiche si è funzionalizzata la superficie del mezzo assorbente con polidopamina.⁶² *Xu et al.* hanno recentemente proposto un substrato adsorbente a base di diatomite funzionalizzata con polidopamina e ZIF-8 per la rimozione di coloranti anionici e nanoplastiche dall'acqua. In questo sistema, la polidopamina favorisce il caricamento uniforme e stabile dello ZIF-8

sulla superficie porosa della diatomite, migliorando le prestazioni adsorbenti del materiale nei confronti di nanoparticelle di polistirene.⁶³ Un'altra categoria di substrati adsorbenti attualmente studiata per la rimozione di micro- e nanoplastiche è basata su idrogel e matrici polimeriche porose. In questo ambito, *Han et al.* hanno sviluppato un materiale adsorbente costituito da alginato di sodio, responsabile della formazione di una rete polimerica ad elevata area superficiale, successivamente modificato con polidopamina.⁶⁴ Tale substrato ha mostrato buone capacità di ritenzione nei confronti delle nanoplastiche disperse in fase acquosa. *Qin et al.* hanno invece proposto un dispositivo adsorbente basato su sferoidi di cellulosa batterica, impiegati come supporto poroso e funzionalizzati con polidopamina al fine di incrementare l'efficienza di ritenzione verso micro- e nano-plastiche.⁶⁵ Un aspetto particolarmente interessante di questo lavoro è rappresentato dall'integrazione del dispositivo in una prospettiva di economia circolare, poiché il materiale, dopo il sequestro delle particelle plastiche da matrici acquose, può essere ulteriormente valorizzato. *Rezvani et al.* hanno infine sviluppato un sistema adsorbente per micro- e nanoplastiche basato su spugne polimeriche di melammina modificate superficialmente con polidopamina; anche questi materiali hanno evidenziato una buona capacità di cattura nei confronti di particelle plastiche disperse in acqua.⁶⁶

Nel complesso, questi recentissimi studi evidenziano come la combinazione tra matrici porose e funzionalizzazione superficiale con polidopamina rappresenti una strategia promettente per lo sviluppo di sistemi adsorbenti efficienti. In questo contesto si inserisce il lavoro di tesi proposto, che mira a sfruttare le proprietà adesive, chimiche e superficiali della polidopamina per la realizzazione di piattaforme capaci non solo di catturare e pre-concentrare nanoplastiche, ma anche di facilitarne la successiva rilevazione spettroscopica.

1.6. Progetto di Tesi

Questo progetto di tesi si propone di sviluppare dispositivi porosi rivestiti di polidopamina, capaci di catturare e pre-concentrare nano-plastiche di diversa

dimensione, carica e natura chimica (polistirene e polimetilmetacrilato). L'approccio si basa sulla realizzazione di materiali adsorbenti con proprietà superficiali controllate, ottenuti mediante una procedura preparativa semplice e potenzialmente utilizzabili in strategie di cattura e rimozione di nano-plastiche da matrici acquose. Un aspetto centrale del progetto è la capacità del rivestimento di polidopamina di interagire con nano-plastiche costituite da materiali differenti, rendendo il sistema il più possibile versatile. La possibilità di favorire l'interazione tra substrato e nanoplastiche è ovviamente fondamentale per ottenere una pre-concentrazione efficace, requisito essenziale, come discusso nella sezione introduttiva, per la successiva rilevazione mediante spettroscopia Raman convenzionale e SERS.

Il seguente progetto di tesi muove da un precedente studio preliminare condotto nel nostro laboratorio di ricerca, che espone chiaramente la logica alla base del presente elaborato: l'introduzione della polidopamina come fattore chiave per promuovere la pre-concentrazione e la successiva rilevazione Raman e/o SERS di nanoplastiche (**Figura 6**).³

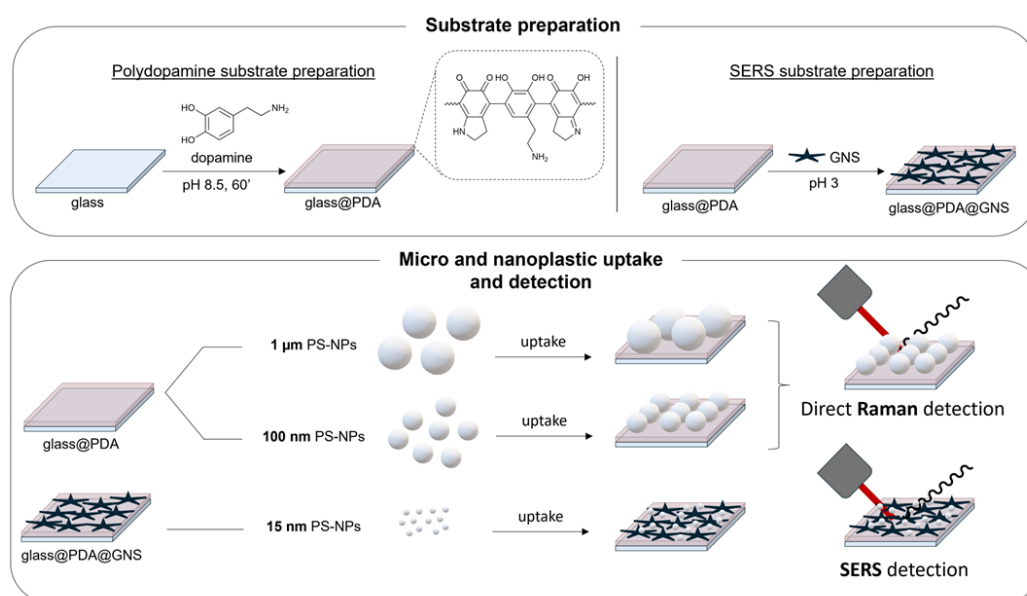


Figura 6: Rappresentazione schematica della pre-concentrazione e successiva rivelazione Raman/SERS di nanoplastiche mediante vetri copri-oggetto rivestiti di polidopamina e funzionalizzati con nanostelle d'oro.³

In tale studio è stato dimostrato come substrati bidimensionali modello, costituiti da vetrini coprioggetto rivestiti con un sottile strato di polidopamina, possano favorire l'interazione con nanoparticelle di polistirene. Su questi sistemi è stato quindi investigato l'effetto del pH sulle proprietà adesive della polidopamina nei confronti di nanoplastiche di polistirene caratterizzate da diverse funzionalizzazioni superficiali, evidenziando il ruolo predominante delle interazioni elettrostatiche nel processo di immobilizzazione. L'indagine è stata estesa a particelle di polistirene con dimensioni comprese tra 1 μm e 15 nm, al fine di valutare l'efficacia della piattaforma in funzione della scala dimensionale delle particelle. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, per particelle di diametro di 1 μm e 100 nm, la pre-concentrazione a formare un monostrato su vetro mediata dalla polidopamina consente la successiva rilevazione mediante spettroscopia Raman convenzionale. Nel caso delle nanoplastiche di dimensioni inferiori, pari a 15 nm, si è invece reso necessario introdurre un' amplificazione del segnale attraverso la realizzazione di un substrato SERS, ottenuto funzionalizzando la superficie del vetro rivestito di polidopamina con le già citate nanostelle d'oro, In questo modo il substrato mantiene le sue capacità adesive permettendo la formazione di un monostrato di nanoparticelle di polistirene, che vengono rilevate nonostante l'esiguità dello spessore del monostrato stesso (15 nm) grazie agli effetti SERS forniti dalle GNS.

A partire da queste premesse, nel presente elaborato di tesi il substrato solido bidimensionale in vetro viene sostituito con un supporto tridimensionale poroso, rappresentato da una membrana filtrante MF-Millipore™ da 0.22 μm in esteri misti di cellulosa. L'idea era quella di trasferire il ruolo adesivo e funzionale della polidopamina a un dispositivo filtrante tridimensionale e macroscopico in grado di promuovere la cattura efficace e quantificabile delle nanoplastiche da matrici acquose e di funzionare quindi da prototipo di sistemi utili sia per la *remediation* che per il *sensing* Raman e/o SERS (**Figura 7**).

In primo luogo, l'obiettivo era verificare l'efficacia di ritenzione delle nanoplastiche da parte dei dispositivi filtranti e verificare che il processo fosse

direttamente correlato all'instaurarsi di interazioni deboli, tra le quali le elettrostatiche rivestono un ruolo essenziale, tra il biopolimero e le particelle, come

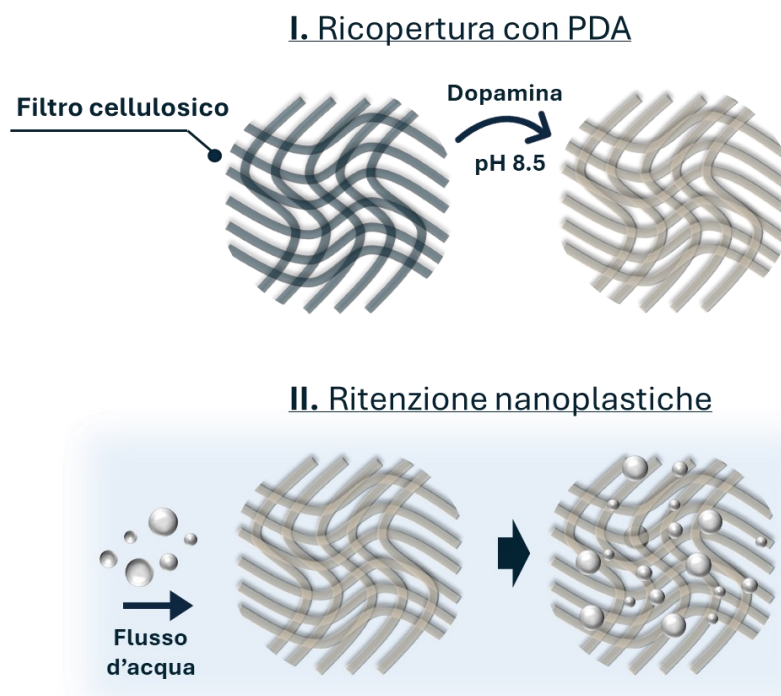


Figura 7: schema della preparazione dei substrati filtranti funzionalizzati con polidopamina e del processo di ritenzione delle nanoplastiche in matrice acquosa.

già mostrato sulle superfici modello. A tale scopo, si è pensato di condurre prove di filtrazione in diverse condizioni di pH utilizzando nanoparticelle di polistirene caratterizzate rispettivamente da carica superficiale positiva e negativa.

Si è pensato di misurare la capacità di ritenzione dei filtri, con e senza ricopertura di polidopamina, mediante Multi-Angle Dynamic Light Scattering (MADLS), in particolare stimando la concentrazione del colloide di nanoplastiche delle sospensioni prima e dopo il processo di filtrazione, utilizzando la sua variazione come parametro comparativo dell'efficienza di trattenimento delle particelle da parte dei diversi supporti filtranti. Analisi di *imaging* SEM sono state previste per confermare i risultati ottenuti dagli studi in DLS.

La valutazione dell'efficacia del substrato e del processo di filtrazione è stata successivamente estesa sia a nanoplastiche di dimensioni inferiori, sia a particelle

costituite da un materiale diverso dal polistirene, il polimetilmetacrilato (PMMA). Tale approccio ha lo scopo di verificare la versatilità della piattaforma filtrante e la sua capacità di trattenere nanoplastiche con differenti caratteristiche dimensionali e chimico-fisiche in matrice acquosa.

Contestualmente sono state previste analisi Raman per valutare la possibilità di rilevare la presenza delle nanoplastiche di dimensioni maggiori (polistirene con diametro di 100 nm e PMMA con diametro di 120 nm) opportunamente pre-concentrate sui filtri funzionalizzati con polidopamina. Come già descritto in precedenza per il caso dei modelli bidimensionali, per particelle plastiche inferiori ai 100 nm, nonostante le ottime capacità di ritenzione della polidopamina, la ridotta *cross section* dei materiali in questione unita alle dimensioni ridotte lasciava prevedere l'impossibilità della rivelazione tramite Raman convenzionale. Per questo motivo, nel presente progetto di tesi si è previsto di funzionalizzare il substrato con GNS, con l'obiettivo di ottenere un sistema non solo capace di adsorbire efficacemente di nanoplastiche di diametro inferiore ai 100 nm, ma anche di consentire la rivelazione tramite SERS.

2. Materiali e metodi

2.1. Reagenti e materiali

Di seguito sono elencati tutti i reagenti e solventi utilizzati nel corso degli esperimenti senza ulteriori processi di purificazione. L'acqua utilizzata in tutti gli esperimenti è acqua ultra-pura prodotta da un sistema per la purificazione dell'acqua Milli-Q® EQ7 (Merck Life Science S.r.l.).

Merck Life Science S.r.l.

- Acido Tetracloroaurico, HAuCl_4 (30% m/m in HCl 99,99%)
- 2-[4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il)fenossi]etanolo, TRITON X-100
- Sodio boroidruro, NaBH_4 ($\geq 98\%$)
- Nitrato d'argento, AgNO_3 ($\geq 99\%$)
- Acido cloridrico, HCl ($\geq 37\%$ v/v, per regia e aggiustamenti di pH)
- Citrato di sodio diidrato
- Trizma base (2-ammino-2-idrossimetil-1,3-propandiolo)
- Membrana filtrante MCE-Millipore™ da $0.22\ \mu\text{m}$, esteri misti di cellulosa.
- Micro particles based on polystyrene (size 100nm)
- Portafiltri Swinnex per filtri MCE

Carlo Erba

- Acido L-ascorbico ($\geq 99\%$)
- Acido nitrico, HNO_3 ($\geq 65\%$ v/v, per regia)
- Siringhe sterili, luer-lock, 5mL

Thermo Scientific

- Dopamina Cloridrato

KF Technology Sil

- Transparent PMMA Nanobeads (size 120nm)

Micromode Partikeltechnologie GmbH

- Nanoparticelle di Polistirene funzionalizzate NR_3^+ 100nm (micromer® codice prodotto 1-05-102)
- Nanoparticelle di Polistirene 50 nm (micromer® codice prodotto 01-00-501)

2.2. Strumentazione

Spettroscopia Uv-Vis: Gli spettri Uv-Vis delle sospensioni colloidali sono stati registrati mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro a scansione *Varian Cary 60* utilizzando cuvette in vetro ottico speciale e con cammino ottico di 1 cm.

Lettura del pH: per la lettura del pH dei campioni analizzati è stato utilizzato un pH-metro da banco XS instrument, modello pH 50 con elettrodo a vetro combinato Thermo Scientific Orion 9102 BNWP. Lo strumento è stato tarato ogni giorno prima del suo utilizzo con standard a pH 7, 4 e 10.

Potenziale ζ e diametro idrodinamico: per la determinazione del potenziale ζ e del diametro idrodinamico delle sospensioni colloidali analizzate è stato utilizzato lo strumento DLS, *Dynamic Light Scattering*, modello Zetasizer Nano ZS9, di Malvern Instrument. Per le misure di potenziale ζ è stata utilizzata un'apposita cella capillare (DTS1070, Malvern).

Particle concentration: le misurazioni di *particle concentration* (particelle/mL) sono state ottenute mediante analisi MADLS (multi Angle dynamic light scattering) a 25°C utilizzando uno strumento Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) equipaggiato con un laser a 633 nm a 10 mW. La misura di *particle concentration* sfrutta la modalità di rilevazione a tre angoli *backscatter* (173°), *side scatter* (90°) e *forward scatter* (13°). Ciascun valore è stato ottenuto mediando tre analisi consecutive.

Sonicazione: la pulizia della vetreria e lo scioglimento di soluti sono stati effettuati tramite un sonicatore *Bandelin Sonorex*.

Imaging SEM: le immagini SEM sono state acquisite utilizzando lo strumento Tescan Mira XMU Field Emission Scanning Electron Microscope-FEG SEM, Tescan USA Inc., presente nel laboratorio CISRiC, Pavia previo *sputtering* di uno strato conduttivo di Pt.

Imaging TEM: le immagini TEM (microscopio elettronico a Trasmissione) sono state ottenute utilizzando lo strumento Joel JEM-1200 Ex II Instrument presso il Centro Grandi Strumenti. I campioni sono stati depositati su grid di Nichel (300 mesh) rivestite con strato sottile di Collodion.

Microscopia Raman: Gli spettri Raman delle nanoplastiche originali opportunamente seccate e di quelle caricate sui substrati dopo pre-concentrazione sono stati registrati utilizzando lo strumento Xplora Plus (HORIBA Scientific), spettrofotometro confocale integrato equipaggiato con microscopio Olympus BX43 con stage xy motorizzato. Il Detector è una Open Electrode CCD Camera. Le sorgenti di eccitazione laser utilizzate sono state laser 532 nm e 638 nm (potenza nominale 100 mV).

2.3. Procedure

2.3.1. Lavaggio vetreria

La vetreria che utilizziamo quando si devono realizzare sintesi di nanomateriali dev'essere sottoposta ad un opportuno lavaggio con acqua regia. Il motivo alla base di questa necessità risiede nella notevole sensibilità che queste tipologie di sintesi presentano verso agenti inquinanti di varia natura. L'acqua regia è una miscela di acidi concentrati in specifiche proporzioni: tre parti di acido nitrico (≥ 65 % v/v) e una parte di acido cloridrico (≥ 37 % v/v). Questa soluzione presenta notevole potere ossidante in grado di rimuovere con successo eventuali tracce di metalli presenti all'interno della vetreria. La metodica di lavaggio prevede di riempire la vetreria con acqua regia e lasciar reagire per circa 15 minuti. Successivamente la regia viene rimossa e la vetreria viene riempita con acqua bidistillata MilliQ e posta all'interno di un sonicatore per un ciclo di tre minuti. Questa operazione viene ripetuta per 3 volte. L'acqua bidistillata è fondamentale per la rimozione di eventuali specie anioniche mentre l'effetto della sonicazione risulta determinante nell'allontanamento di eventuali specie cationiche adsorbite. Una volta terminati i cicli di lavaggio con acqua bidistillata la vetreria viene posta in stufa a 140 °C fino a completa asciugatura.

2.3.2. Rivestimento dei filtri con polidopamina (filtri@PDA)

Il *coating* della superficie dei filtri con polidopamina è stato ottenuto per *dip-coating* sfruttando l'auto-polimerizzazione della dopamina in soluzione. Per procedere con la ricopertura i filtri sono stati posti all'interno di una *multiwell* da 24 pozzetti. Separatamente sono stati preparati 100 mL di tampone TRIS (Trizma base (2-ammino-2-idrossimetil-1,3-propandiolo) 10 mM portato a pH debolmente alcalino (8.5-8.6). Al tampone vengono aggiunti, sotto agitazione, 200 mg di dopamina, in accordo con un protocollo standard che prevede l'impiego del monomero a una concentrazione di 2.0 mg/mL per il rivestimento generico di superfici.⁴⁰ Una volta completata l'aggiunta della dopamina al tampone, la

soluzione viene immediatamente trasferita nei pozzetti della *multiwell*, avendo cura di riempirli completamente. La *multiwell* viene quindi posta su una piastra basculante e lasciata in agitazione per 5 ore senza coperchio. Al termine del processo di polimerizzazione, la soluzione viene rimossa dai pozzetti e i campioni vengono lavati ripetutamente con acqua bidistillata, fino alla completa rimozione dei residui di polimero presenti in soluzione. Dopo il lavaggio, i filtri ricoperti di polidopamina (filtri@PDA) vengono lasciati asciugare per una notte.

2.3.3. Sintesi nanostelle d'oro (GNS)

Come anticipato nella sezione relativa all'introduzione nel seguente elaborato di tesi la sintesi delle GNS segue una metodologia di tipo *Seed-Growth*.²⁰ È possibile schematizzare il processo di sintesi in due distinte fasi, nella prima vengono preparati i piccoli *seeds* di oro e nella seconda avviene la crescita anisotropica dei *seeds* in un'opportuna soluzione di crescita.

Preparazione dei Seeds: 5.0 ml di una soluzione acquosa 0.50 mM di HAuCl_4 vengono aggiunti a 5.0 mL di una soluzione 0.2 M di Triton X-100. Si aggiungono poi rapidamente 600 μL di una soluzione di NaBH_4 10 mM. La formazione dei *seed* si può direttamente osservare dalla variazione della colorazione della soluzione contenuta nella vial, la quale assume un colore arancio-bruno, tipica colorazione associata alla produzione di nanoparticelle d'oro sferiche dal diametro di 4-5 nm. Appena sintetizzati i *seeds* sono posti nuovamente in ghiaccio sino all'utilizzo. Tutte le soluzioni utilizzate per la sintesi dei *seeds* sono state raffreddate in ghiaccio per circa 30 minuti prima di essere usate.

Crescita anisotropica dei seeds in soluzione di crescita: la soluzione di crescita viene preparata ponendo all'interno di una beuta 50 mL di una soluzione 0.20 M di Triton X-100 in agitazione fino a completa dissoluzione. Successivamente vengono aggiunti nel seguente ordine: 2.5 mL di AgNO_3 e 50 mL di una soluzione di HAuCl_4 1 mM. Dopo aver lasciato omogeneizzare la soluzione vengono aggiunti molto rapidamente e consecutivamente 1.7 mL di una soluzione 78.8 mM

di Acido Ascorbico e 120 μL della sospensione colloidale di *seed* precedentemente sintetizzata. Una volta terminate le aggiunte si mantiene l'agitazione magnetica della soluzione e se ne osservano le variazioni cromatiche sino al raggiungimento di una colorazione grigio/bluastro indicativa della buona riuscita della sintesi delle GNS.

2.3.4. Filtrazione nanoplastiche

La filtrazione delle nanoplastiche su filtro (tal quale) e filtro@PDA è stata effettuata secondo una procedura analoga per tutte le sospensioni analizzate. Il filtro (**Figura 8A**) è stato inserito in un apposito supporto bicomponente per membrane filtranti (**Figura 8B**). Successivamente, 3.0 mL della sospensione di nanoplastiche precedentemente preparata al pH opportuno sono stati prelevati mediante una siringa monouso Luer-lock (**Figura 8C**) e filtrati attraverso il dispositivo. Analisi di *particle concentration* sono state effettuate sia sulle sospensioni iniziali che sulle aliquote prelevate al termine della filtrazione. Al termine della filtrazione i filtri sono stati asciugati prima di procedere con le successive caratterizzazioni.

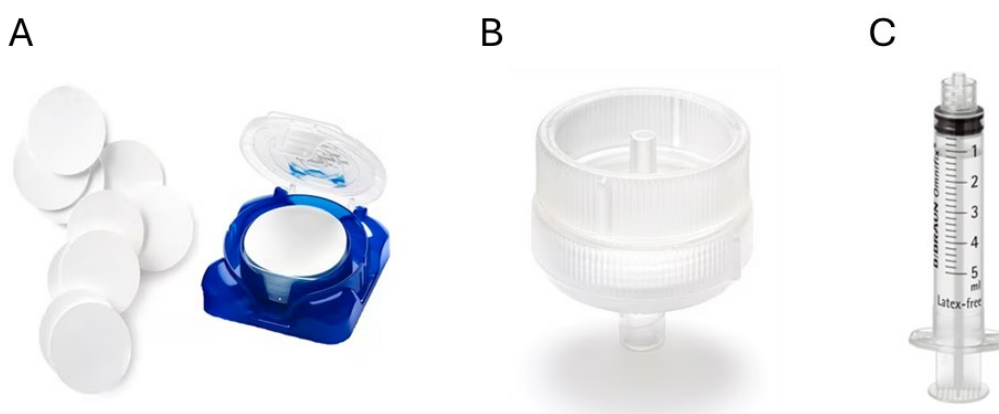


Figura 8: A) filtri a membrana MCE 0.22 μm ; B) portafiltri Swinnex; C) Siringa sterile luer-lock, capacità 5mL.

2.3.5. Preparazione dei substrati plasmonici

Una volta ottenuti i filtri@PDA come descritto nella **sezione 2.3.2**, 3.0 mL della sospensione di GNS sintetizzate, come descritto nella **sezione 2.3.3**, sono state immobilizzate sui filtri procedendo sempre tramite filtrazione. Il caricamento dei nano-oggetti è stato effettuato utilizzando il colloide tal quale, senza ulteriori modifiche di pH o step di purificazione.

2.4. Caratterizzazioni

2.4.1. Caratterizzazione filtri@PDA

2.4.1.1. Variazione cromatica

Una prima valutazione dell'avvenuta funzionalizzazione dei filtri con polidopamina è fornita osservando macroscopicamente e confrontando la variazione di colorazione della superficie dei filtri prima e dopo modificazione con PDA.

2.4.1.2. *Imaging* SEM

La morfologia superficiale dei filtri prima e dopo il rivestimento con polidopamina è stata valutata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), confrontando le immagini dei filtri tal quali con quelle dei filtri funzionalizzati. Per poter acquisire le immagini è stato necessario depositare tramite *sputtering* un sottile strato di Pt sulla superficie per renderla conduttiva. Le immagini sono state acquisite in modalità *Back Scattered*, a 30 kV.

2.4.2. Caratterizzazione sospensioni colloidali di nanoplastiche

2.4.2.1. Analisi al DLS

Prima di procedere con le valutazioni della capacità di ritenzione dei filtri@PDA ciascuna sospensione di nanoplastiche presa sotto esame è stata caratterizzata mediante analisi DLS, valutandone il diametro idrodinamico medio e il potenziale ζ ai diversi valori di pH utilizzati per gli esperimenti di filtrazione.

Potenziale ζ : per le misure di potenziale ζ è stata prelevata un'aliquota di 1.0 mL di sospensione colloidale ed è stata posta in un'apposita cuvetta capillare monouso in plastica con due elettrodi integrati (DTS1070). Ciascuna misura è il risultato di tre ripetizioni condotte a temperatura ambiente (25°C).

Diametro idrodinamico: per la valutazione del diametro idrodinamico medio è stata prelevata un'aliquota di 1.0 mL dalla sospensione colloidale ed è stata posta

in un'apposita cuvetta monouso in polistirene (DTS0012). Anche in questo caso l'analisi della dimensione media è il risultato di tre ripetizioni.

2.4.3. Valutazione della ritenzione di nanoplastiche sui filtri

Per valutare e dimostrare l'avvenuto caricamento delle nanoplastiche sulla superficie dei filtri tal quali e sui filtri funzionalizzati con polidopamina sono state utilizzate differenti metodologie di caratterizzazione.

2.4.3.1. Analisi MADLS

Particle concentration: le misurazioni di *particle concentration* sono state realizzante mediante analisi MADLS utilizzando un DLS Zetasizer Ultra. Per queste analisi viene prelevata un'aliquota di 1 mL dalla sospensione colloidale pre-filtrata poi posta all'interno di una cuvetta (DTS0012). La misurazione del *particle concentration* avviene a temperatura ambiente ed è ripetuta per 3 volte. Una volta completato il processo di filtrazione su filtro tal quale e filtro@PDA, come descritto nella **sezione 2.3.4.**, la medesima analisi viene ripetuta sulle aliquote di sospensioni recuperate al termine dei processi di filtrazione.

2.4.3.2. Imaging SEM

Per dimostrare l'avvenuto caricamento dei filtri@PDA con le differenti nanoplastiche utilizzate, sono state acquisite immagini SEM. La modalità di acquisizione delle immagini SEM è stata già indicata nella **sezione 2.4.2.2.**

2.4.4. Caratterizzazione della sospensione colloidale di GNS

2.4.4.1. Caratterizzazione mediante spettroscopia Uv-Vis

La caratterizzazione della sospensione colloidale di GNS ottenute mediante sintesi *Seed-growth*, descritta nella **sezione 2.3.3.**, è stata effettuata mediante Spettroscopia Uv-Vis. Il colloide è stato caratterizzando utilizzando una cuvetta in vetro ottico speciale (cammino ottico 1 cm) utilizzando acqua per acquisire il bianco.

2.4.4.2. Caratterizzazione mediante Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)

Per ottenere le immagini TEM, 10 μL di sospensione colloidale di GNS diluiti 1:100 sono stati depositati su griglie in nickel o rame (300 mesh) rivestite da uno strato di collodio. La diluizione è uno step fondamentale in quanto ci consente di preservare l'integrità del film di collodio nonostante la presenza del Triton X-100. Dopo le deposizioni i campioni vengono lasciati asciugare per una notte prima di procedere con l'acquisizione.

2.4.4.3. Misure di potenziale ζ

La misurazione del potenziale ζ della sospensione colloidale di GNS ottenute mediante sintesi *Seed-Growth* è avvenuta mediante analisi al DLS seguendo il protocollo già descritto nella **sezione 2.4.2.1**.

2.4.5. Caratterizzazione substrato plasmonico

La caratterizzazione dei filtri@PDA funzionalizzate con le GNS sono stati caratterizzati con diverse tecniche.

2.4.5.1. *Imaging* SEM

Per dimostrare l'avvenuta funzionalizzazione dei filtri@PDA con le GNS, sono state acquisite immagini SEM. La modalità di acquisizione delle immagini SEM è stata già indicata nella **sezione 2.4.2.2**

2.4.5.2. Variazione cromatica

L'avvenuto caricamento delle GNS sulla superficie del filtro@PDA, in seguito al processo di filtrazione del colloide descritto nella **sezione 2.3.4.**, è osservabile qualitativamente siccome causa una variazione cromatica che interessa la superficie del filtro, la quale passa da una colorazione marroncino chiaro a grigio/blu scuro.

2.4.5.3. Analisi Uv-Visibile

L'avvenuto caricamento dei filtri@PDA con GNS è stata anche valutata utilizzando la spettroscopia Uv-Vis andando a confrontare i profili di estinzione della sospensione colloidale di GNS pre-filtrazione e post-filtrazione su filtro tal quale filtro@PDA. La metodologia di acquisizione degli spettri Uv-Vis è la stessa presentata nella **sezione 2.4.1.1.**

2.4.6. Analisi Raman

Gli spettri Raman dei filtri@PDA dopo adsorbimento delle diverse nanoplastiche sono stati registrati utilizzando sorgente laser 532 nm, potenza 1% e acquisendo ciascun punto per 10 secondi, accumulando 10 spettri per ciascuna misura. Gli spettri medi riportati sono stati ottenuti mediando 10 misure ottenute su punti diversi e random del campione per valutarne la riproducibilità della risposta. Ciascuno spettro dopo l'acquisizione è stato corretto andando a sottrarre lo spettro Raman del solo filtro e sottraendo infine la *baseline*.

Gli spettri Raman delle sospensioni stock concentrate di PS100nm (10% v/v) e PMMA120nm (1% v/v) sono stati acquisiti depositando 10 μ L della sospensione su un substrato di silicio. Gli spettri sono stati successivamente registrati sul *coffee ring* formatosi dopo la completa evaporazione della goccia.

3. Risultati e discussione

3.1. Preparazione filtri@PDA

Seguendo la procedura riportata nel **paragrafo 2.3.2.** è stato possibile rivestire la superficie dei filtri con uno strato nanometrico di PDA, sfruttando il meccanismo di auto-polimerizzazione della dopamina in fase acquosa in condizioni di pH debolmente basiche. Per garantire la riproducibilità della preparazione dei filtri@PDA, tutti i filtri appartenenti alla stessa preparazione sono stati immersi nella medesima soluzione di TRIS-dopamina e mantenuti in agitazione su piastra basculante per 5 ore. L'avvenuta ricopertura della superficie dei filtri con PDA è già evidente a occhio nudo al termine dei lavaggi dei filtri con acqua bidistillata, come mostrato in **Figura 9**. Si può infatti osservare come dopo il passaggio di ricopertura i filtri assumano una colorazione marroncina, tipica proprio dell'avvenuta deposizione del polimero.

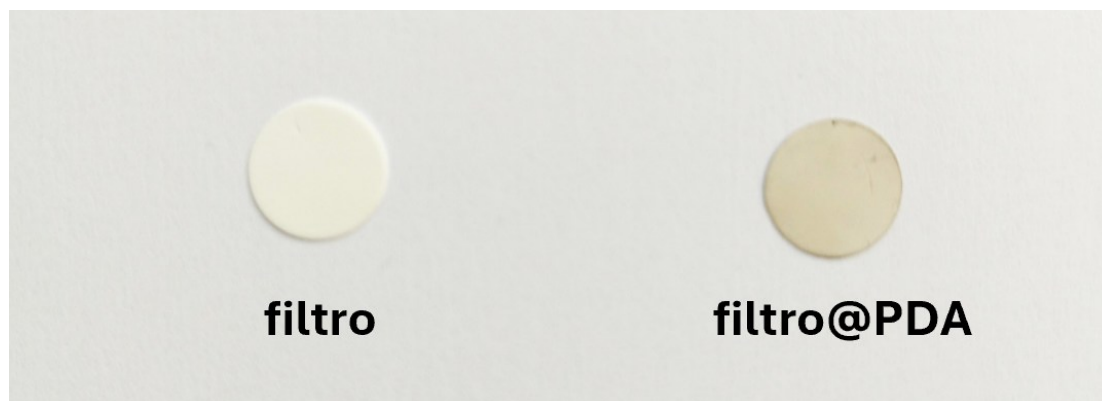


Figura 9: *l'immagine mostra la variazione cromatica del Filtro in seguito al processo di funzionalizzazione con polidopamina dopo 5h di immersione.*

Da letteratura è noto che la variazione dello spessore dello strato di polidopamina è dipendente dal tempo di immersione.⁴⁰ Possiamo quindi stimare uno spessore medio del rivestimento polimerico di circa 10 nm nelle condizioni sperimentali utilizzate. Questo valore è coerente anche con precedenti analisi di ellissometria condotte nel nostro laboratorio su film di PDA formati a diversi tempi su superfici modello di quarzo (*unpublished data*).

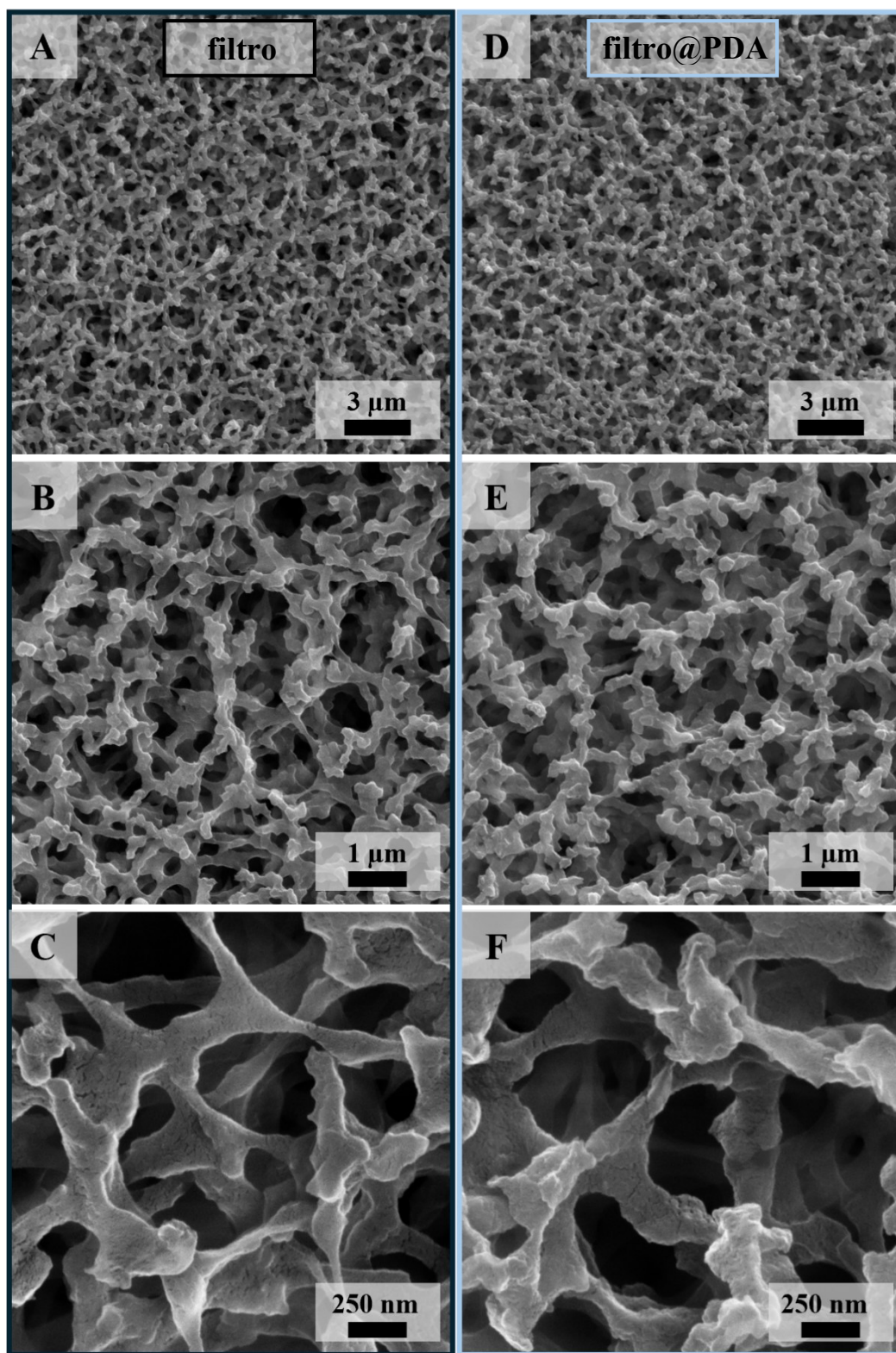


Figura 10: immagini SEM di un filtro (A-C) e di un filtro@PDA (D-F) acquisite a differenti ingrandimenti.

Quanto risulta dalle immagini è particolarmente rilevante, poiché sembra indicare che il rivestimento di PDA si deposita in modo conformale sulle superfici delle

filbre che costituiscono il filtro senza alterare significativamente le caratteristiche geometriche dei pori. Assumendo quindi che il rivestimento di PDA possa essere approssimato come conformale e considerando uno spessore medio di circa 10 nm depositato sulle pareti del poro, la riduzione massima della dimensione media dei pori può essere stimata in circa 20 nm. In questo scenario semplificato, la porosità nominale di 220 nm risulterebbe ridotta a circa 200 nm dopo il *coating*. Tale osservazione è fondamentale, poiché consente di attribuire l'eventuale pre-concentrazione delle nanoplastiche alle interazioni con il biopolimero, piuttosto che a un semplice effetto di restringimento massivo dei pori.

3.1.1. Analisi capacità di ritenzione dei Filtri – *particle concentration*

Nella seguente sezione è stata valutata la diversa capacità di ritenzione delle nanoplastiche da parte di filtri non modificati e filtri@PDA. L'obiettivo è dimostrare come la presenza di un rivestimento nanometrico di PDA sulla superficie del filtro possa promuovere un significativo effetto di adsorbimento delle nanoplastiche. La nostra ipotesi, supportata da precedenti risultati sperimentali,³ è che la capacità di ritenzione dei filtri@PDA possa dipendere strettamente dalle condizioni di pH in cui avviene il processo di filtrazione: il meccanismo di adsorbimento delle nanoplastiche è infatti governato da diversi tipi di interazioni che si instaurano tra la superficie della PDA e le nanoplastiche, tra le quali quelle elettrostatiche giocano un ruolo predominante. Per verificare tale ipotesi sono stati progettati esperimenti basati sulla determinazione della concentrazione di particelle (*particle concentration*) mediante analisi MADLS.

Per ciascuna tipologia di nanoplastica analizzata, sono state preparate due sospensioni colloidali da 10 mL alla concentrazione di 100 ppm, ottenute mediante diluizione da una soluzione *stock* concentrata dello *standard*. Le due sospensioni sono state successivamente portate rispettivamente a pH circa 3 e pH circa 6 mediante piccole aggiunte di HCl 0.1 M, al fine di investigare due condizioni limite di pH ai lati del punto isoelettrico della PDA ($\text{pH} \approx 4$). Come precedentemente dimostrato su superfici rivestite con PDA,^{3,5} in corrispondenza di tale valore il

biopolimero subisce un'inversione del segno della carica superficiale, che passa da positiva a pH acido a negativa a pH prossimo alla neutralità. Prima di procedere con gli esperimenti di filtrazione, ciascuna sospensione colloidale preparata ai due valori di pH è stata caratterizzata mediante analisi DLS, al fine di determinarne il diametro idrodinamico medio e il potenziale- ζ , e mediante analisi MADLS per la determinazione della *particle concentration*. Successivamente, aliquote da 3.0 mL di ciascuna sospensione colloidale, volume scelto per garantire una gestione sperimentale agevole e riproducibile, sono state filtrate attraverso filtri non modificati e filtri@PDA. La capacità di ritenzione è stata quindi valutata confrontando i valori di *particle concentration* delle sospensioni prima e dopo filtrazione.

3.1.2. Nanoplastiche di polistirene da 100 nm non modificate (PS-100nm)

La prima tipologia di nanoplastiche oggetto degli esperimenti è quella delle nanoplastiche standard di polistirene dal diametro di 100 nm (PS-100nm). In **Tabella 1** vengono riportati i risultati delle analisi condotte al DLS in acqua bidistillata.

Tabella 1: Caratterizzazione DLS delle PS100-nm in acqua bidistillata

100 nm PS – 100 ppm (in dd H ₂ O)		
Size (nm)	Potenziale- ζ (mV)	PDI
114.1 $\pm$ 0.1	-40 $\pm$ 2	0.013 $\pm$ 0.002

La sospensione colloidale di PS-100nm a 100 ppm in acqua bidistillata presenta caratteristiche compatibili con un sistema colloidale stabile, ben disperso e altamente monodisperso. Il valore di potenziale ζ pari a -40 $\pm$ 2 mV indica un'elevata stabilizzazione elettrostatica e una conseguente ridotta tendenza all'aggregazione. L'analisi DLS mostra inoltre un diametro idrodinamico medio di 114.1 $\pm$ 0.1 nm, in buon accordo con la dimensione nominale delle particelle, e un

valore di PDI estremamente basso (0.013), indicativo di una distribuzione dimensionale molto stretta. Quest'ultimo parametro riveste un ruolo fondamentale per le successive analisi MADLS di *particle concentration*, poiché la pressoché completa monodispersione del campione rappresenta una condizione ideale per ottenere una stima accurata del parametro, minimizzando l'errore intrinseco associato alla misura.

Successivamente, come descritto nel **paragrafo 3.2**, sono state preparate due aliquote da 10 mL e portate rispettivamente a pH 3 e pH 6. In **Tabella 2** sono riportati i valori di potenziale- ζ delle sospensioni ai rispettivi valori di pH.

Tabella 2: potenziali- ζ delle soluzioni di PS100nm a differenti pH

Condizioni di pH	Potenziale- ζ (mV)
pH 6	-40 ± 2
pH 3	-31 ± 1

La determinazione del potenziale- ζ delle sospensioni colloidali di PS-100nm a pH 6 e pH 3 è fondamentale per valutare la stabilità colloidale dei sistemi nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate per i processi di filtrazione su filtro non modificato e filtro@PDA. Possiamo quindi affermare che i valori di potenziale ζ riportati in **Tabella 2** indicano una buona stabilità colloidale delle sospensioni di PS100nm, escludendo la tendenza delle particelle ad andare incontro a fenomeni di aggregazione nelle condizioni sperimentali analizzate.

Tabella 3: Analisi capacità di ritenzione di PS100nm su filtro e Filtro@PDA

PS-100nm	Pre-filtrato (part. /mL)	Post-filtrato (part. /mL) filtro@PDA	% trattenuta filtro@PDA	Post-filtrato (part. /mL) filtro	% trattenuta filtro
pH 6	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^{10}$	< 5 %	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^{10}$	< 5 %
pH 3	$(3.50 \pm 0.04) \times 10^{10}$	$(5 \pm 2) \times 10^7$	> 95 %	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	< 5 %

In **Tabella 3** sono invece riportati i valori di *particle concentration* ottenuti sulle sospensioni a pH 3 e pH 6 rispettivamente pre- e post- filtrazione su filtro non modificato e su filtro@PDA.

I dati ottenuti evidenziano che il filtro non modificato non mostra un apprezzabile effetto di ritenzione nei confronti delle PS-100nm ad entrambi i valori di pH presi in considerazione. Le variazioni di *particle concentration* osservate prima e dopo la filtrazione risultano infatti prossime allo zero e confrontabili con la normale variabilità della misura. Come indicato nelle linee guida Malvern per le misure di *particle concentration* mediante MADLS, l'accuratezza del parametro dipende fortemente dalla qualità della distribuzione dimensionale. Nel nostro caso, l'elevata monodispersione della sospensione di PS-100nm, confermata dal basso valore di PDI, rappresenta una condizione favorevole per una stima affidabile del *particle concentration*. Pertanto, in assenza di un apprezzabile decremento della *particle concentration* dopo filtrazione, la ritenzione è stata riportata (cautelativamente) come inferiore al 5%, tenendo conto dell'incertezza intrinseca associata alla determinazione del parametro.

Analogamente, il filtro@PDA non mostra una capacità di ritenzione significativa a pH circa 6, mentre in condizioni acide si osserva un marcato incremento dell'adsorbimento delle nanoplastiche. In particolare, a pH circa 3 la ritenzione può essere considerata pressoché quantitativa. Tenendo conto dell'incertezza intrinseca associata alla determinazione della *particle concentration*, il valore di ritenzione in queste condizioni è stato quindi riportato come superiore al 95%. Per una più immediata visualizzazione dei risultati ottenuti, la **Figura 11** riporta un grafico a colonne che mette chiaramente in evidenza la marcata capacità di ritenzione del filtro@PDA a pH 3 rispetto a tutte le altre condizioni sperimentali investigate.

Possiamo a questo punto trarre alcune conclusioni. In primo luogo, abbiamo dimostrato come il solo filtro commerciale usato non sia in grado di ritenere

efficacemente le PS100nm. Allo stesso modo anche le filtrazioni condotte su filtro@PDA a pH 6 non hanno mostrato significativo adsorbimento di plastiche. L'assenza di una ritenzione significativa a pH 6 da parte del filtro@PDA conferma

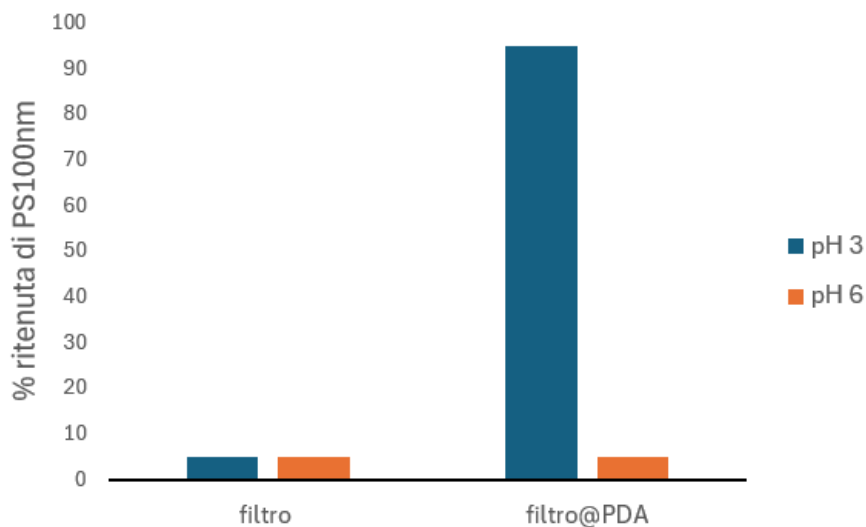


Figura 11: Grafico a colonne che mostra la capacità di ritenzione di PS100nm su filtro e filtro@PDA in differenti condizioni di pH

che il parziale restringimento dei pori indotto dal *coating* di PDA non rappresenta, di per sé, un fattore sufficiente a promuovere il trattenimento delle nanoplastiche. Osserviamo invece una modifica radicale nelle capacità di ritenzione delle PS100nm quando operiamo a pH 3. La modifica del pH, come già anticipato nelle sezioni precedenti, influenza significativamente la carica superficiale della PDA, determinando un'inversione del segno in prossimità del suo punto isoelettrico. In particolare, a pH 3 è stato dimostrato che la superficie della PDA sviluppa una marcata carica positiva. I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che il processo di adsorbimento delle PS-100nm sulla superficie dei filtri@PDA sia prevalentemente guidato dalle interazioni elettrostatiche che si instaurano tra il rivestimento di PDA e le nanoplastiche.

Un'ulteriore conferma di quanto già osservato dalle misure di *particle concentration* è fornita dalle immagini SEM acquisite sui filtri@PDA dopo l'adsorbimento delle PS100nm a pH 3 e pH 6 (**Figura 12**).

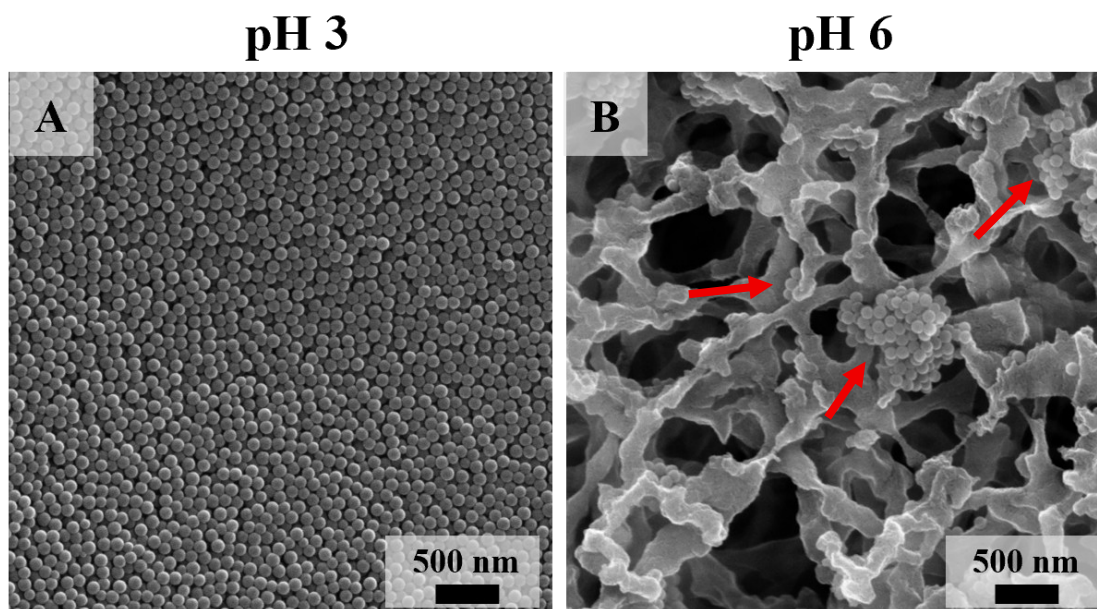


Figura 12: immagini SEM rispettivamente del filtro@PDA dopo processo di filtrazione delle PS-100nm a pH 3 (A) e del filtro@PDA dopo filtrazione delle PS-100nm a pH 6.

In **Figura 12A** è possibile osservare la formazione di uno strato compatto di nanoplastiche sulla superficie del filtro@PDA quando il processo di filtrazione avviene a pH 3. Fenomeno invece assente se il processo di filtrazione viene operato a pH 6 (**Figura 12B**). Quanto succede è facilmente comprensibile riferendoci alla porosità media nominale dei filtri@PDA, sopra stimata come inferiore ai 200 nm. Risulta evidente come la adesione progressiva di nano-oggetti di 100 nm di diametro in pori con dimensione media di 200 nm possa facilmente promuovere l'ostruzione dei pori stessi, con formazione, nel corso della filtrazione, di uno strato compatto di PS100nm. A pH 6 invece possiamo osservare la presenza di pochi aggregati di nanoparticelle sulla superficie del filtro@PDA. Questo risultato è coerente con la nota capacità della PDA di instaurare, oltre alle interazioni di natura elettrostatica, ulteriori interazioni deboli, quali ad esempio le interazioni π - π *stacking*. Interazioni che seppur presenti, non sono da sole sufficienti a

promuovere un adsorbimento quantitativo delle nanoplastiche sulla superficie della PDA, soprattutto in regime di forte repulsione elettrostatica, quando sia le nanoplastiche che la superficie di PDA sono “cariche” negativamente.

Un ultimo esperimento è stato condotto sulle PS100nm per valutare la capacità di ritenzione del filtro@PDA processando un volume maggiore di campione a una concentrazione più bassa di nanoplastiche. A questo scopo, è stata filtrata una sospensione di PS100nm a 10 ppm, quindi dieci volte più diluita rispetto agli esperimenti precedenti, in un volume complessivo di 30 mL. Tale condizione è stata selezionata per verificare la capacità del filtro@PDA di mantenere una ritenzione quantitativa anche in condizioni di campionamento più estese.

Tabella 4: Analisi capacità di ritenzione di PS100nm, 10ppm, su Filtro@PDA

PS-100nm	Pre-filtrato (part. /mL)	Post-filtrato (part. /mL) filtro@PDA	% trattenuta filtro@PDA
pH 3	$(3.5 \pm 0.4) \times 10^9$	<i>n.d.</i>	> 95 %

I risultati ottenuti dimostrano che il filtro@PDA mantiene un'elevata capacità di ritenzione anche processando volumi di campione significativamente maggiori e sospensioni più diluite (**Tabella 4**). La completa rimozione delle PS100nm osservata anche dopo la filtrazione di 30 mL di sospensione a 10 ppm evidenzia come il volume di 3.0 mL adottato negli esperimenti precedenti rappresenti principalmente una scelta operativa, piuttosto che un limite delle prestazioni del sistema. Questi risultati suggeriscono inoltre che il filtro@PDA possieda una capacità di adsorbimento sufficientemente elevata da consentire il trattamento di volumi di campione più estesi senza una perdita apprezzabile dell'efficienza di ritenzione, aspetto di particolare interesse in vista di future applicazioni su campioni ambientali reali.

3.1.3. Nanoplastiche di polistirene 100 nm positive (PS@NR₃⁺-100nm)

La seconda tipologia di nanoplastiche oggetto dei nostri esperimenti sono le PS100nm@NR₃⁺.

Tabella 5: Caratterizzazione DLS delle PS100nm@NR₃⁺ in acqua bidistillata

100 nm PS@NR ₃ ⁺ – 100 ppm (in dd H ₂ O)		
Size (nm)	Potenziale- ζ (mV)	PDI
101 $\pm$ 1	31.5 $\pm$ 0.5	0.03 $\pm$ 0.01

La sospensione colloidale di PS100nm@NR₃⁺ a 100 ppm in acqua bidistillata presenta caratteristiche compatibili con un sistema stabile, ben disperso e monodisperso. Il valore positivo di potenziale ζ (+31.5 mV) indica una buona stabilizzazione elettrostatica della sospensione, mentre il diametro idrodinamico medio e il basso valore di PDI confermano la presenza di una popolazione omogenea di nano-oggetti con dimensioni prossime a 100 nm. Anche in questo caso, la bassa polidispersione rappresenta una condizione favorevole per le successive analisi MADLS di *particle concentration*.

Prima di procedere con gli esperimenti di filtrazione, è stato determinato il potenziale ζ delle sospensioni colloidali di PS100nm@NR₃⁺ a pH 6 e pH 3, al fine di valutarne la stabilità colloidale nelle stesse condizioni sperimentali impiegate durante il processo di filtrazione. I valori ottenuti sono riportati in **Tabella 6**.

Tabella 6: potenziali ζ delle soluzioni di PS100nm@NR₃⁺ a differenti valori di pH

Condizioni di pH	Potenziale- ζ (mV)
pH 6	32 $\pm$ 1
pH 3	40 $\pm$ 2

I valori di potenziale ζ riportati in **Tabella 6** confermano la stabilità colloidale delle sospensioni di PS100nm@NR₃⁺ in entrambe le condizioni di pH investigate. In particolare, le particelle mantengono una carica superficiale positiva sia a pH 3 (+32 ± 1 mV) sia a pH 6 (+40 ± 2 mV), con valori sufficientemente elevati da indicare una buona stabilizzazione elettrostatica e una ridotta tendenza all'aggregazione durante gli esperimenti di filtrazione.

Anche in questo caso, la capacità di ritenzione dei filtri non modificati e dei filtri@PDA è stata valutata confrontando i valori di *particle concentration* delle sospensioni prima e dopo il processo di filtrazione. I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 7**.

Tabella 7: Analisi capacità di ritenzione di PS100nmNR₃⁺ su filtro e Filtro@PDA

PS@NR ₃ ⁺ 100nm	Pre-filtrato (part. /mL)	Post-filtrato (part. /mL) filtro@PDA	% trattenuta filtro@PDA	Post-filtrato (part. /mL) filtro	% trattenuta filtro
pH 6	$(5.6 \pm 0.7) \times 10^{10}$	$(5 \pm 5) \times 10^8$	> 95 %	$(5.3 \pm 0.2) \times 10^{10}$	< 5 %
pH 3	$(5.6 \pm 0.7) \times 10^{10}$	$(6.1 \pm 0.6) \times 10^{10}$	< 5 %	$(5.5 \pm 0.4) \times 10^{10}$	< 5 %

Analogamente a quanto osservato per le PS-100nm, il filtro non modificato non mostra una ritenzione significativa delle PS100nm@NR₃⁺ nelle condizioni investigate. Diversamente, il filtro@PDA evidenzia una ritenzione pressoché quantitativa solo a pH 6, mentre a pH 3 la ritenzione rimane trascurabile. Questo comportamento è coerente con la carica superficiale positiva delle PS100nm@NR₃⁺ e conferma il ruolo centrale delle interazioni elettrostatiche nel processo di adsorbimento sulla superficie della PDA.

Per una più immediata visualizzazione dei risultati ottenuti, la **Figura 13** riporta un grafico a colonne che confronta le percentuali di ritenzione nelle diverse condizioni sperimentali, evidenziando come, in questo caso, l'adsorbimento quantitativo delle PS100nm@NR₃⁺ si osservi esclusivamente per il filtro@PDA a pH 6. Questi risultati, se combinati con quelli osservati nell'esperimento

precedente con le PS100nm, mostrano l'inadeguatezza del filtro non modificato nella ritenzione delle nanoplastiche evidenziando la necessità di una modificazione delle sue proprietà superficiali. Il diverso comportamento osservato per PS100nm e PS100nm@NR₃⁺ conferma, inoltre, il ruolo determinante delle interazioni elettrostatiche nel processo di adsorbimento su PDA. In particolare, per nanoplastiche con carica superficiale positiva, la ritenzione quantitativa osservata a pH 6 suggerisce la possibilità di impiegare i filtri@PDA in processi di *remediation* operando in condizioni prossime alla neutralità, compatibili con matrici acquose ambientali.

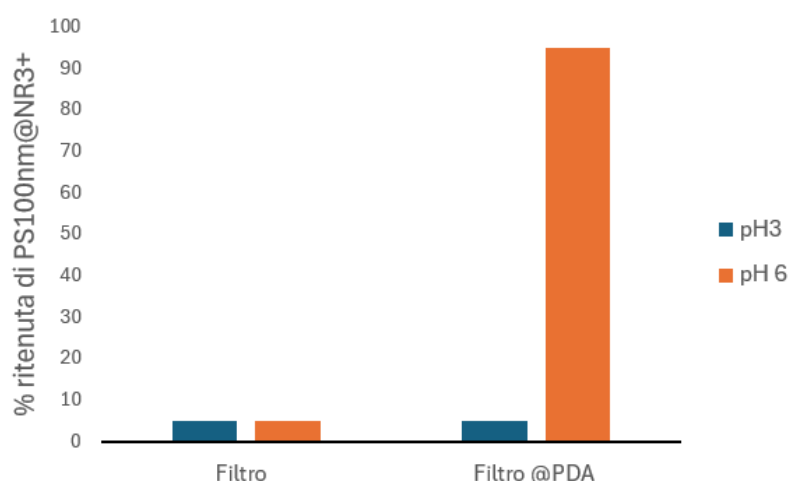


Figura 13: Grafico a colonne che mostra la capacità di ritenzione di PS@NR₃⁺100nm su filtro e filtro@PDA in differenti condizioni di pH

3.1.4. Nanoplastiche di polistirene 50 nm

Nella seguente sezione sperimentale sono state valutate le prestazioni di ritenzione del filtro non modificato e del filtro@PDA nei confronti di nanoplastiche di polistirene di dimensioni inferiori, pari a 50 nm. L'obiettivo è verificare se il rivestimento di PDA sia in grado di promuovere la ritenzione anche di nano-oggetti significativamente più piccoli, per i quali il contributo della filtrazione meccanica risulta ancora meno rilevante.

Tabella 8: Caratterizzazione DLS di PS50nm in acqua bidistillata

50 nm PS – 100 ppm (in dd H₂O)		
Size (nm)	Potenziale-ζ (mV)	PDI
52.9 $\pm$ 0.1	-37 $\pm$ 3	0.02 $\pm$ 0.01

La caratterizzazione preliminare riportata in **Tabella 8** conferma che la sospensione di PS50nm a 100 ppm in acqua bidistillata presenta un'elevata stabilità colloidale. Le analisi DLS evidenziano una popolazione di nano-oggetti con dimensioni coerenti con il valore nominale di 50 nm e una distribuzione dimensionale molto stretta, come indicato dal basso valore di PDI. Inoltre, l'elevato valore in modulo del potenziale ζ conferma la buona stabilizzazione elettrostatica della sospensione.

Tabella 9: potenziali ζ delle soluzioni di PS50nm a differenti valori di pH

Condizioni di pH	Potenziale-ζ (mV)
pH 6	-37 $\pm$ 1
pH 3	-30.4 $\pm$ 0.5

I valori di potenziale ζ riportati in **Tabella 9** confermano che le sospensioni di PS50nm mantengono una buona stabilità colloidale in entrambe le condizioni di pH investigate. In particolare, le particelle conservano una carica superficiale negativa sia a pH 3 sia a pH 6, indicando una ridotta tendenza all'aggregazione durante gli esperimenti di filtrazione.

Tabella 10: Analisi capacità di ritenzione di PS50nm su filtro e filtro@PDA

PS-50nm	Pre-filtrato (part. /mL)	Post-filtrato (part. /mL) filtro@PDA	% trattenuta filtro@PDA	Post-filtrato (part. /mL) filtro	% trattenuta filtro
pH 6	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{12}$	$(1.1 \pm 0.4) \times 10^{12}$	< 5 %	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^{12}$	< 5 %
pH 3	$(1 \pm 1) \times 10^{12}$	$(5.8 \pm 0.2) \times 10^7$	> 95 %	$(1 \pm 1) \times 10^{12}$	< 5 %

I risultati riportati in **Tabella 10** confermano quanto osservato per le PS100nm. Il filtro non modificato e il filtro@PDA a pH 6 non mostrano una ritenzione significativa delle PS50nm, mentre il filtro@PDA a pH 3 evidenzia una ritenzione pressoché quantitativa. Anche in questo caso, il comportamento osservato conferma il ruolo determinante delle interazioni elettrostatiche tra la superficie della PDA e le nanoplastiche, indipendentemente dalla riduzione delle dimensioni delle particelle. La stessa tendenza è riportata graficamente in **Figura 14**, dove il

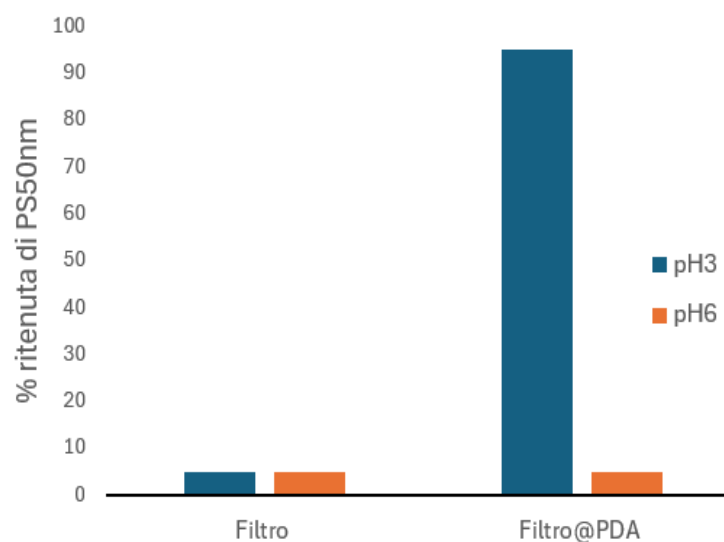


Figura 14: Grafico a colonne che mostra la capacità di ritenzione di PS50nm su filtro e filtro@PDA in differenti condizioni di pH

grafico a colonne permette una visualizzazione più immediata delle diverse percentuali di ritenzione osservate.

In **Figura 15** sono riportate le immagini SEM acquisite a differenti ingrandimenti del filtro@PDA in seguito al processo di filtrazione delle PS50nm a pH 3.

A differenza delle nanoplastiche di dimensioni maggiori, le PS50nm non danno origine a uno strato superficiale compatto sul filtro. Le immagini SEM mostrano infatti come i nano-oggetti siano distribuiti non solo sulla superficie esterna, ma anche lungo la superficie interna dei pori. Tale comportamento è attribuibile alle dimensioni ridotte delle particelle, che non provocano la ostruzione dei pori e consentono loro di permeare la struttura porosa del filtro. Il rivestimento conformale di PDA risulta tuttavia in grado di adsorbirle efficacemente lungo l'intera architettura tridimensionale del substrato, garantendo una ritenzione pressoché quantitativa.

3.1.5. Nanoplastiche di PMMA 120 nm

Nel seguente paragrafo sono state valutate le capacità di ritenzione dei substrati filtranti nei confronti di nanoparticelle di PMMA con diametro pari a 120 nm. L'obiettivo è dimostrare che il filtro@PDA è in grado di pre-concentrare non solo nanoplastiche di PS di diversa dimensione, quali PS100nm e PS50nm, ma anche

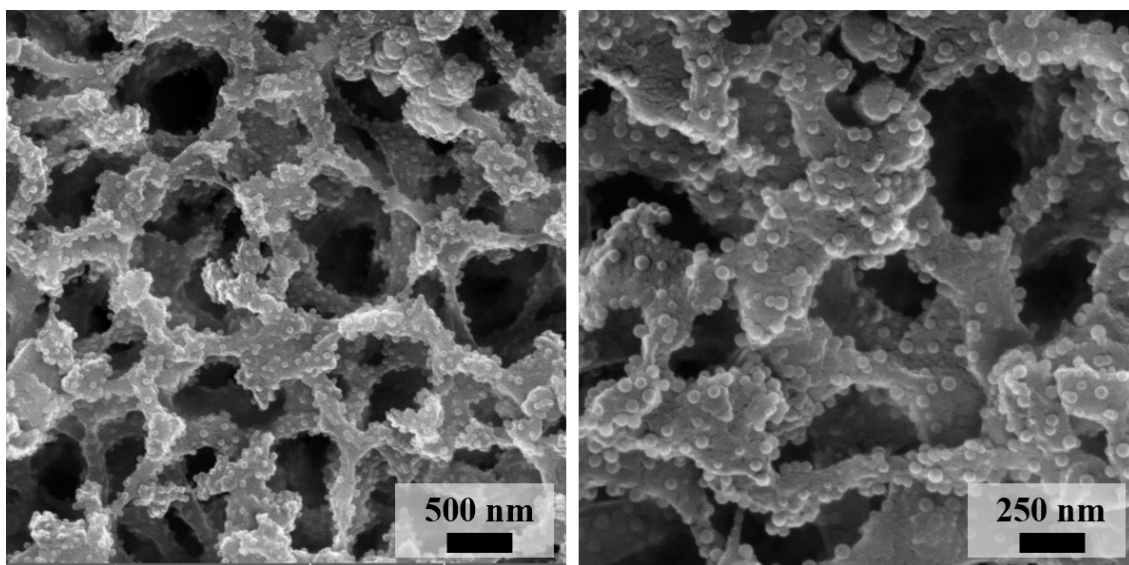


Figura 15: Immagini SEM del filtro@PDA dopo la filtrazione di PS50nm a pH 3.

particelle di PMMA, evidenziando così la versatilità del rivestimento di PDA nell'interazione con inquinanti polimerici di diversa natura chimica.

Tabella 4: Caratterizzazione DLS di PMMA120nm in acqua bidistillata

120 nm PMMA – 100 ppm (in dd H ₂ O)		
Size (nm)	Potenziale- ζ (mV)	PDI
123 $\pm$ 2	-32 $\pm$ 1	0.10 $\pm$ 0.02

La caratterizzazione preliminare della sospensione di PMMA120nm, riportata in **Tabella 11**, evidenzia una buona stabilità colloidale nelle condizioni sperimentali investigate. Il diametro idrodinamico medio risulta in accordo con la dimensione nominale delle particelle, mentre il basso valore di PDI indica una distribuzione dimensionale ristretta e una sospensione sostanzialmente monodispersa. Inoltre, il valore negativo del potenziale ζ conferma una buona stabilizzazione elettrostatica del colloide, rendendolo idoneo alle successive analisi di *particle concentration* mediante MADLS.

Tabella 52: potenziali ζ delle soluzioni di PMMA120nm a differenti valori di pH

Condizioni di pH	Potenziale- ζ (mV)
pH 6	-31 $\pm$ 1
pH 3	-31 $\pm$ 2

La **Tabella 12** riporta i valori di potenziale ζ delle soluzioni di PMMA120 nm 100 ppm a differenti valori di pH. Anche per questo materiale è possibile confermare che le sospensioni colloidali di PMMA120nm risultano essere termodinamicamente stabili nel range di pH investigato.

Analogamente a quanto fatto per le altre plastiche anche in questo caso sono stati condotti gli esperimenti di filtrazione valutando la capacità di ritenzione sui filtri

analizzando i pre- e i post-filtrati tramite analisi MADLS e i risultati sono riportati in **Tabella 13**.

Tabella 6: Analisi capacità di ritenzione di PMMA120nm su filtro e filtro@PDA

PS-50nm	Pre-filtrato (part. /mL)	Post-filtrato (part. /mL) filtro@PDA	% trattenuta filtro@PDA	Post-filtrato (part. /mL) filtro	% trattenuta filtro
pH 6	$(3.8 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(3.9 \pm 0.7) \times 10^{10}$	< 5 %	$(3.1 \pm 0.4) \times 10^{10}$	< 5 %
pH 3	$(2.20 \pm 0.08) \times 10^{10}$	$(4.8 \pm 0.3) \times 10^7$	> 95 %	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^{10}$	< 5 %

I risultati di *particle concentration* confermano che il filtro@PDA mantiene una ritenzione pressoché quantitativa anche nei confronti delle nanoparticelle di PMMA120nm, mentre il filtro non modificato non mostra un apprezzabile effetto di trattenimento. Questo risultato è particolarmente rilevante poiché dimostra che l'efficacia del rivestimento di PDA non è limitata alle nanoplastiche di PS, ma si estende anche a particelle di diversa natura chimica. Inoltre, analogamente alle PS100nm e PS50nm, le particelle di PMMA120nm presentano una carica superficiale negativa, suggerendo che anche in questo caso la ritenzione sia principalmente guidata dalle interazioni elettrostatiche con la superficie protonata

della PDA. Anche in questo caso abbiamo riportato il grafico a colonne con le % di plastiche trattenute nei alle diverse condizioni di pH (**Figura 16**).

In **Figura 17** sono riportate le immagini SEM acquisite a diversi ingrandimenti del

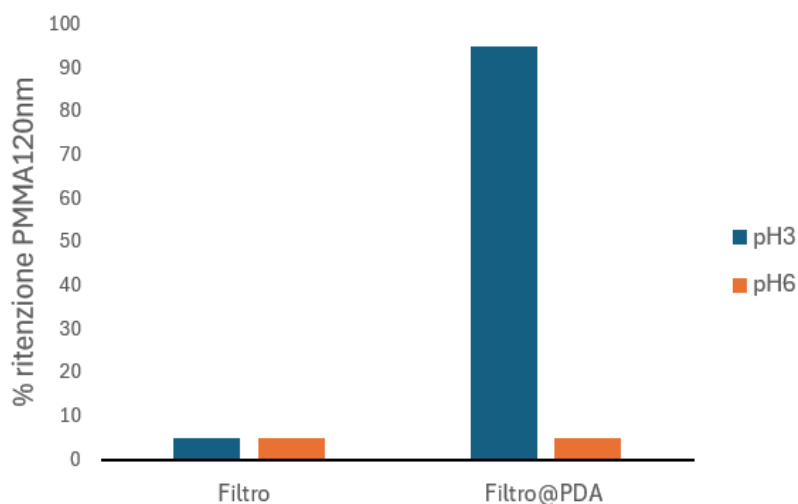


Figura 16: Grafico a colonne che mostra la capacità di ritenzione di PMMA120nm su filtro e filtro@PDA in differenti condizioni di pH.

filtro@PDA dopo l'adsorbimento delle nanoparticelle di PMMA a pH 3.

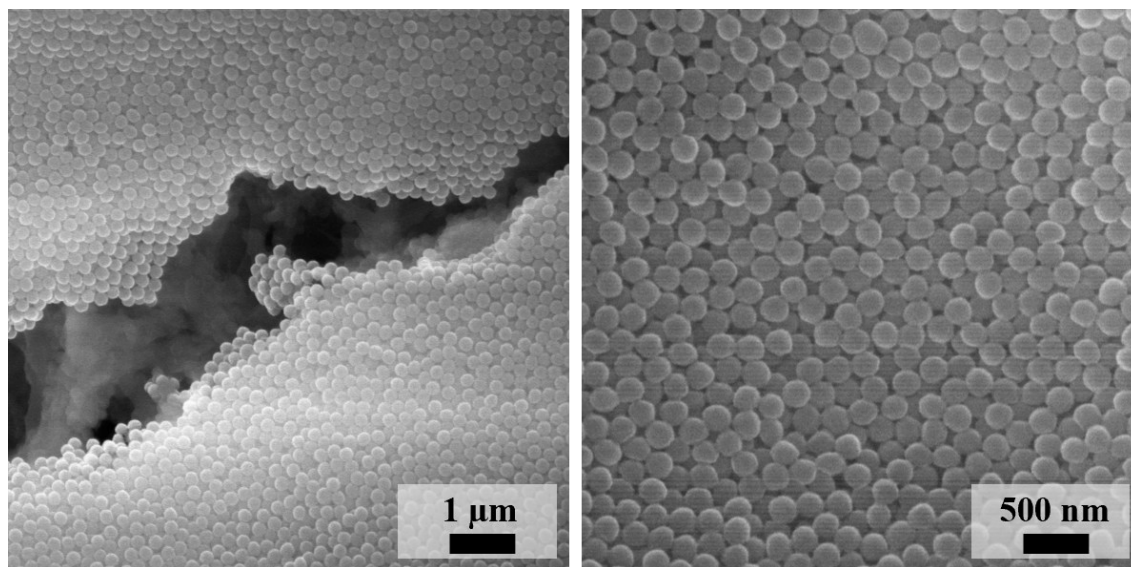


Figura 17: Immagini SEM del filtro@PDA dopo la filtrazione di PS50nm a pH 3.

Dalle immagini SEM è possibile confermare qualitativamente quanto emerso dalle analisi MADLS di *particle concentration*, osservando un'elevata presenza di nanoparticelle di PMMA sulla superficie del filtro@PDA. Il comportamento risulta analogo a quello osservato per le PS100nm: anche in questo caso, le

particelle aderiscono ai pori sulla superficie del filtro ostruendoli e formando uno strato compatto di nanoplastiche. Di nuovo, notiamo come questo risultato si differenzi da quanto osservato per le PS50nm, che, a causa delle dimensioni più ridotte, tendono a distribuirsi anche all'interno della struttura porosa del filtro senza generare un film superficiale continuo. Tale diversa organizzazione spaziale delle nanoplastiche sul substrato avrà importanti implicazioni nelle successive analisi Raman.

3.2. Analisi Raman di nanoplastiche pre-concentrate su Filtri@PDA

3.2.1. PS 100 nm

Nella **Sezione 3.2.1** è stato dimostrato, mediante analisi MADLS di *particle concentration* e *imaging* SEM, che il processo di filtrazione delle PS100nm in condizioni di pH acido determina un adsorbimento pressoché quantitativo delle nanoplastiche sulla superficie del filtro@PDA. L'obiettivo di questa sezione è verificare se tale processo di pre-concentrazione sia sufficiente a consentire la rivelazione e l'identificazione delle nanoplastiche mediante spettroscopia Raman. A tal fine, i campioni sono stati preparati filtrando 30 mL di una sospensione di PS100nm a 10 ppm, così da simulare condizioni di analisi maggiormente rappresentative di un campione reale. La **Figura 18** confronta lo spettro Raman dello standard di PS100nm ad alta concentrazione depositato su substrato solido (**Figura 18a**) con lo spettro acquisito sul filtro@PDA dopo la filtrazione di 30 mL di una sospensione di PS100nm a 10 ppm (**Figura 18b**). Il confronto evidenzia una sostanziale sovrapposizione tra le principali bande vibrazionali del polistirene, confermando che il processo di filtrazione consente una pre-concentrazione delle nanoplastiche sufficiente alla loro identificazione mediante convenzionale spettroscopia Raman. In particolare, nello spettro acquisito sul filtro@PDA sono chiaramente riconoscibili le bande caratteristiche del PS a circa 616, 795, 1001, 1031, 1150, 1193, 1443 e 1590 cm^{-1} , tutte in buon accordo con lo spettro di riferimento. Tra queste, il picco a 1001 cm^{-1} , attribuito al *breathing mode* dell'anello benzenico, rappresenta la banda più intensa e diagnostica del polistirene. Le vibrazioni associate alle altre bande sono attribuite come riportato in **Tabella 14**.

Sebbene lo spettro acquisito sul filtro presenti un rapporto segnale/rumore inferiore rispetto allo standard concentrato, come atteso considerando la concentrazione circa quattro ordini di grandezza più bassa del campione analizzato e la presenza del substrato filtrante, la corrispondenza delle principali bande vibrazionali

consente un'identificazione univoca delle nanoplastiche di polistirene. Questo risultato dimostra che il processo di filtrazione su filtro@PDA è in grado di pre-concentrare efficacemente le PS100nm fino a renderne possibile la rivelazione mediante spettroscopia Raman convenzionale.

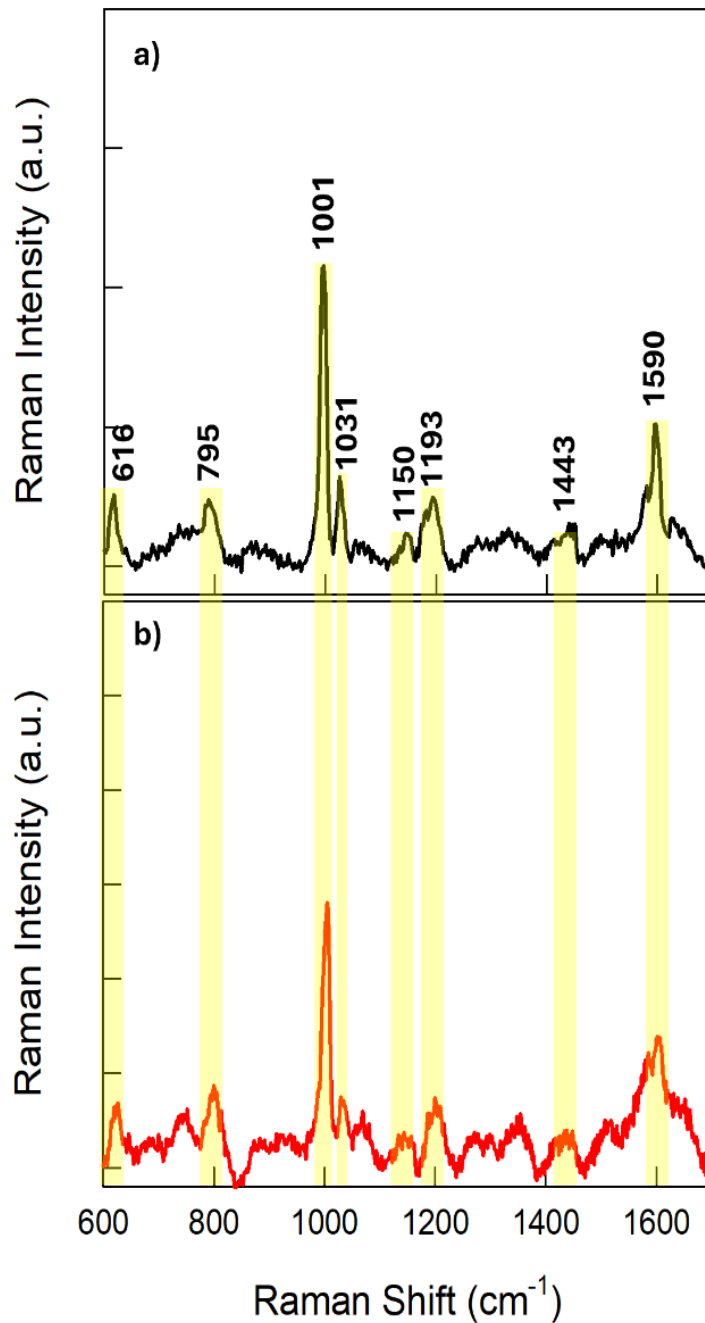


Figura 18: Confronto tra lo spettro Raman di riferimento del polistirene (a) e lo spettro acquisito sul filtro@PDA dopo la filtrazione di una sospensione di PS100nm (10 ppm).

Tabella 14: Assegnazione dei modi vibrazionali Raman del polistirene individuati negli spettri acquisiti in Figura X.⁶⁷⁻⁶⁸

Banda Raman (cm⁻¹)	Modo Vibrazionale	Intensità relativa
616	Deformazione anello aromatico	Debole
795	Deformazione C-H fuori dal piano	Debole
1001	Respirazione anello aromatico	Molto intensa
1031	Deformazione C-H nel piano	Media
1150-1155	Stretching C-C	Debole Media
1193	Stretching C-C e contr. Bending aromatico	Debole
1443	Scissoring C-H ₂	<i>Debole Media</i>
1590	Stretching C=C anello aromatico	Media

Poiché le immagini SEM mostrano che le PS100nm non permeano in modo significativo all'interno della struttura porosa del filtro, ma tendono piuttosto a formare uno strato compatto sulla superficie del filtro@PDA, è possibile stimare in modo semiquantitativo il numero di *layer* di particelle responsabili del segnale Raman osservato. Considerando il volume filtrato, la concentrazione iniziale della sospensione e un diametro effettivo di filtrazione pari a circa 11 mm, il numero totale di particelle trattenute risulta compatibile con la formazione di pochi strati sovrapposti di PS100nm sulla superficie del filtro. In particolare, assumendo una distribuzione omogenea delle particelle sull'area effettivamente attraversata dalla sospensione, si può stimare la formazione di circa cinque *layer* equivalenti di nanoplastiche. Tale stima, pur essendo approssimata e basata su un modello semplificato di impacchettamento delle particelle, è coerente con l'osservazione

SEM di un rivestimento superficiale compatto e contribuisce a spiegare la chiara identificazione Raman delle PS100nm dopo il processo di pre-concentrazione.

Dopo aver dimostrato che la spettroscopia Raman consente di identificare le nanoplastiche di polistirene PS100nm adsorbite sulla superficie del filtro@PDA dopo filtrazione di una sospensione a 10 ppm, è stata condotta un'indagine semiquantitativa per valutare la correlazione tra l'intensità del segnale Raman e la concentrazione iniziale delle nanoplastiche in sospensione. A partire dalla condizione a 10 ppm già descritta, sono state quindi analizzate sospensioni a concentrazioni progressivamente decrescenti, pari a 5 e 2.5 ppm, mantenendo invariato il volume filtrato di 30 mL e le condizioni sperimentali di filtrazione. Gli spettri Raman acquisiti sui filtri@PDA dopo filtrazione e riportati nella **Figura 19a** sono stati utilizzati per costruire una curva di taratura, correlando l'intensità della banda caratteristica a 1001 cm^{-1} del polistirene con la concentrazione iniziale della sospensione filtrata, come riportato in **Figura 19b**.

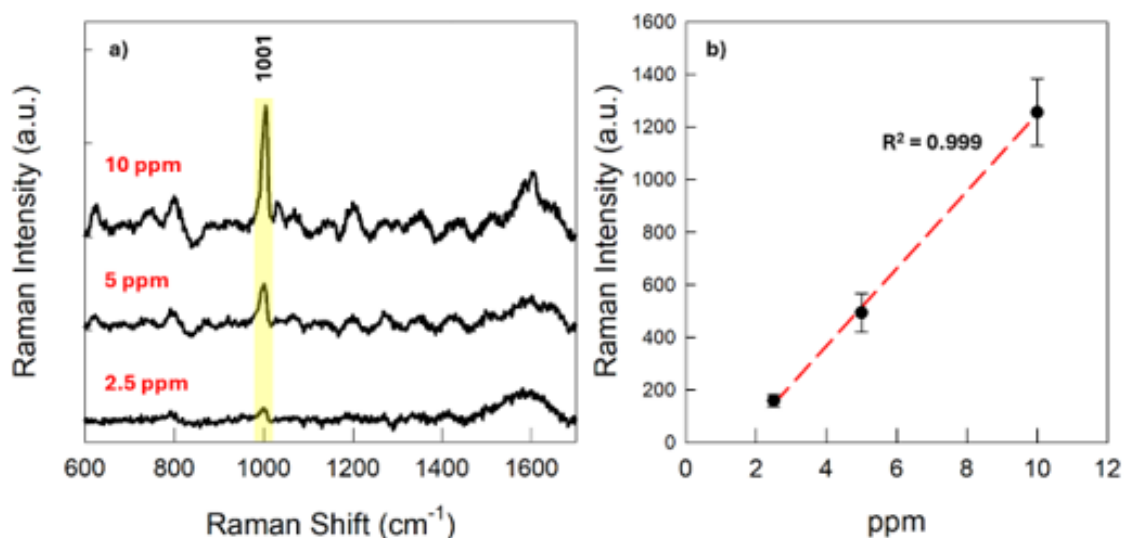


Figura 19: A) Spettri Raman di Polistirene calcolati nelle differenti condizioni sperimentali di filtrazione di PS100nm (10,5,2.5ppm); B) Retta di calibrazione

La **Figura 19a** mostra un progressivo incremento dell'intensità della banda Raman a 1001 cm^{-1} , selezionata come banda caratteristica del polistirene, all'aumentare della concentrazione iniziale delle sospensioni colloidali di PS100nm. Tale segnale

risulta già distinguibile alla concentrazione più bassa analizzata, pari a 2.5 ppm, e aumenta progressivamente passando a 5 e 10 ppm.

La **Figura 19b** evidenzia una correlazione lineare tra l'intensità del segnale Raman e la concentrazione iniziale della sospensione filtrata, con un valore di R^2 pari a 0.999. Questo risultato indica che, nell'intervallo di concentrazioni studiato, l'intensità della banda Raman selezionata è direttamente proporzionale alla quantità di PS100nm pre-concentrate sul filtro@PDA, e cioè in certa misura allo spessore degli strati accumulati sulla superficie dei filtri. Le barre di errore riportate nel grafico corrispondono alla deviazione standard calcolata su 10 spettri Raman acquisiti in posizioni casuali del filtro. La buona riproducibilità del segnale è ulteriormente confermata dalla **Figura 20**, in cui sono mostrati i 10 spettri acquisiti sul filtro@PDA dopo filtrazione della sospensione a 10 ppm. La sovrapposizione dei profili spettrali e il valore di RSD pari al 10%, calcolato sull'intensità della banda a 1001 cm^{-1} , confermano l'omogeneità del segnale Raman e la riproducibilità della misura.

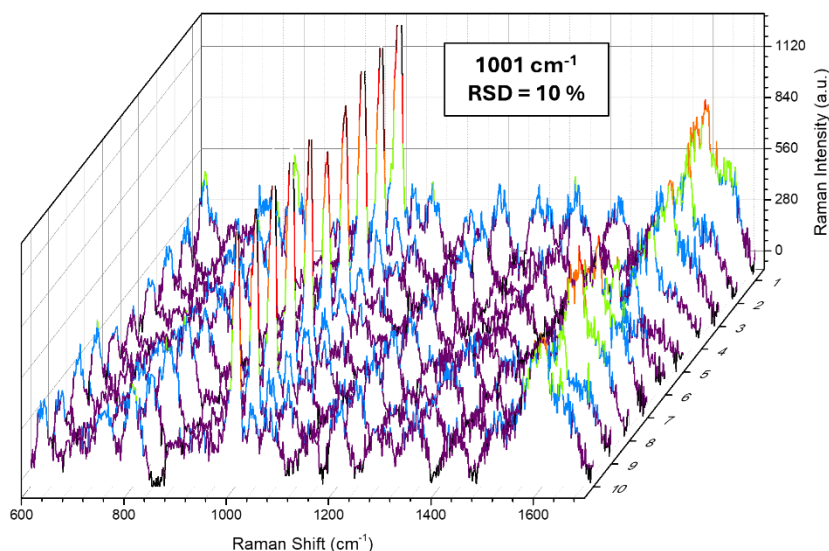


Figura 20: Spettri Raman acquisiti in 10 posizioni casuali del filtro@PDA dopo filtrazione di PS100nm a 10 ppm. RSD = 10% sulla banda a 1001 cm^{-1} .

3.2.2. PMMA 120 nm

Dopo aver dimostrato la capacità del filtro@PDA di trattenere quantitativamente nanoparticelle di PMMA120nm, è stata valutata la possibilità di identificare il materiale polimerico adsorbito mediante spettroscopia Raman. Questa analisi consente di verificare la versatilità del dispositivo non solo nella pre-concentrazione, ma anche nella successiva rivelazione Raman di nanoplastiche di diversa natura chimica rispetto al polistirene. In **Figura 21** è riportato il confronto tra lo spettro Raman dello standard di PMMA120nm depositato su substrato solido tra lo spettro Raman dello standard di PMMA120nm depositato su substrato solido

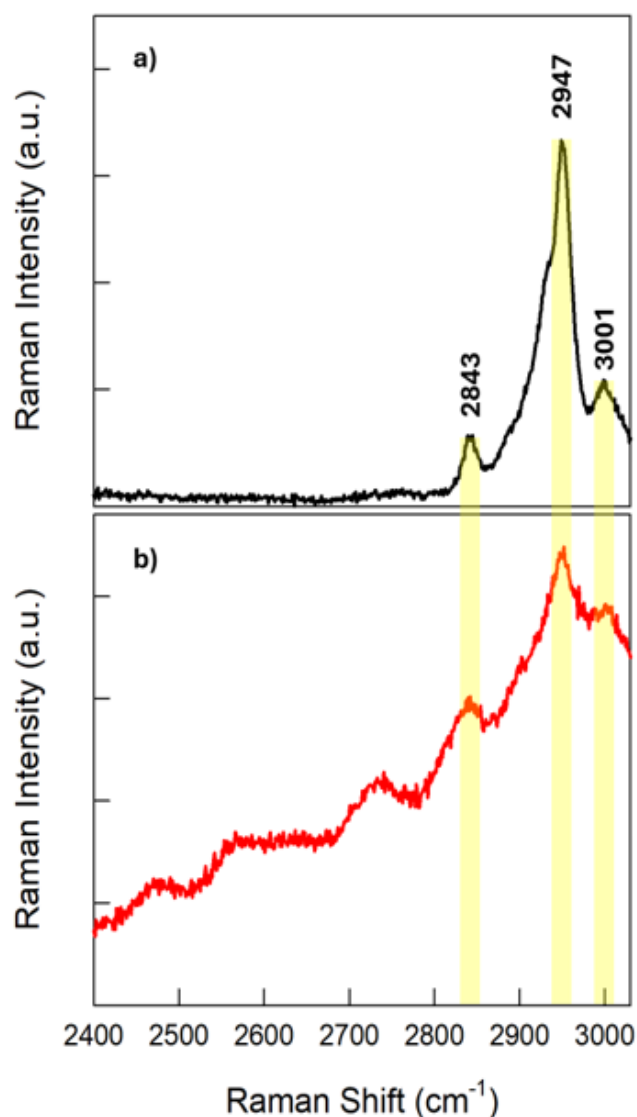


Figura 21: Confronto tra lo spettro Raman dello standard di PMMA120nm depositato su substrato solido (a) e lo spettro acquisito sul filtro@PDA dopo filtrazione della sospensione di PMMA120nm (b).

e lo spettro acquisito sul filtro@PDA dopo filtrazione di 30 mL di sospensione a 10 ppm. La sovrapposizione delle principali bande vibrazionali consente di verificare se il materiale adsorbito sulla superficie del filtro possa essere attribuito alle nanoparticelle di PMMA pre-concentrate durante il processo di filtrazione.

Tabella 15: Principali bande del PMMA osservate nella regione spettrale 2400-3050 cm^{-1}

Banda Raman (cm^{-1})	Modo Vibrazionale	Intensità relativa
2843	Stiramento simmetrico C-H dei gruppi $-\text{OCH}_3$ e CH_2	Debole
2947	Stiramento asimmetrico C-H dei gruppi CH_3	Molto Intensa
3001	Stiramento C-H associato al gruppo metile ($\nu(\text{CH}_3)$)	Media

Nella **Tabella 15** sono riportate le principali bande Raman del PMMA osservate nella regione spettrale compresa tra 2400 e 3050 cm^{-1} , intervallo in cui ricadono alcuni dei segnali più intensi del polimero. In particolare, la banda più intensa, osservata a 2947 cm^{-1} , è attribuita allo stiramento asimmetrico dei gruppi metilici (CH_3), mentre il segnale a 2843 cm^{-1} è associato principalmente allo stiramento simmetrico dei gruppi metossilici e metilenici. La banda osservata a 3001 cm^{-1} può invece essere ricondotta a ulteriori modi di stiramento C-H dei gruppi metilici. L'assegnazione di queste bande risulta in accordo con quanto riportato in letteratura per il PMMA.)⁶⁹

La rivelazione delle PMMA120nm mediante spettroscopia Raman rappresenta un risultato preliminare, ma di particolare interesse. È noto, infatti, che il PMMA presenta una sezione d'urto Raman inferiore rispetto al polistirene, rendendone l'identificazione spettroscopica più complessa. Nonostante ciò, gli spettri acquisiti sul filtro@PDA mostrano la presenza delle bande caratteristiche del PMMA,

dimostrando come il processo di pre-concentrazione proposto sia efficace anche per nanoplastiche caratterizzate da una risposta Raman meno intensa.

Questo risultato assume ulteriore rilevanza se confrontato con quanto osservato in un precedente studio sviluppato nel nostro laboratorio e recentemente pubblicato su *Nanoscale* (2025), in cui le PMMA120nm venivano adsorbite su un substrato vetroso bidimensionale funzionalizzato con polidopamina. Nel presente lavoro, il diverso approccio sperimentale, basato sulla filtrazione attraverso uno scaffold tridimensionale rivestito con PDA, consente di aumentare la quantità di nanoplastiche pre-concentrate nell'area analizzata. Questo favorisce un maggiore volume di materiale interrogato dal laser Raman e, di conseguenza, un incremento dell'intensità del segnale, rendendo possibile l'identificazione delle PMMA120nm sul dispositivo filtrante.

3.2.3. PS 50 nm

Come dimostrato nella **Sezione 3.2.3** mediante analisi della *particle concentration* ottenuta con MADLS, la filtrazione di una sospensione colloidale di PS50nm su filtro@PDA in condizioni di pH acido consente di trattenere oltre il 95% delle nanoparticelle. Anche su questi campioni sono state condotte analisi Raman con lo scopo di rilevare la presenza delle PS50nm, acquisendo gli spettri nelle stesse condizioni sperimentali già riportate per le PS100nm. In questo caso, tuttavia, le PS50nm non sono state rilevate, nonostante l'elevata capacità del filtro@PDA di trattenere le nanoparticelle. Tale risultato non è del tutto inatteso, ma può essere interpretato come una conseguenza del diverso modello di adsorbimento delle nanoplastiche di differente dimensione su filtro@PDA, come schematizzato in **Figura 22**. Le nanoparticelle PS100nm in seguito al processo di assorbimento su filtro@PDA formano uno strato compatto di nanoplastiche sugli strati superficiali del filtro (vedi SEM riportate in **Figura 12**). Le PS50nm, presentando dimensioni inferiori, si distribuiscono su tutta la superficie interna del filtro@PDA, penetrando all'interno della struttura dei pori, e distribuendosi così complessivamente su un volume maggiore (vedi SEM **Figura 15**). In queste condizioni il volume di

campionamento del Raman è in grado di intercettare esclusivamente una ridotta frazione di PS50nm. È questa la causa dell'incapacità della spettroscopia Raman nel rilevare le PS50nm.

Con le condizioni sperimentali impiegate, ovvero obiettivo 50×, laser verde e aperture di 200 e 500 μm , la profondità assiale del volume di campionamento Raman è stimabile nell'ordine di pochi micrometri. Come rappresentato in **Figura 22**, a parità di concentrazione in massa, le PS50nm risultano maggiormente disperse lungo il volume del filtro rispetto alle PS100nm. Di conseguenza, solo una frazione delle nanoparticelle ricade all'interno del volume di campionamento Raman, determinando un'intensità di segnale insufficiente per la loro rilevazione. Al contrario, la formazione di uno strato più compatto costituito da alcuni *layer* di nanoparticelle da 100 nm, stimabile in circa 0.5 μm di spessore nelle condizioni di volume e concentrazione sopra riportati (30 mL di sospensione 10 ppm) favorisce la localizzazione dell'analita nel volume di campionamento Raman quando questo è posizionato, come di norma, sulla superficie dei campioni, spiegando quindi la più facile rilevazione spettroscopica. La mancata rilevazione delle PS50nm mediante Raman convenzionale evidenzia la necessità di incrementare la sensibilità della tecnica. A questo scopo, nel capitolo successivo verrà descritto lo sviluppo di un substrato plasmonico basato su AuGNS, finalizzato alla rilevazione SERS di nanoplastiche di dimensioni inferiori.

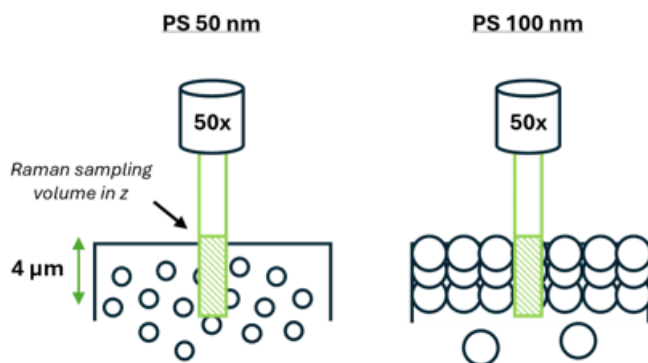


Figura 22: Schema illustrativo del differente modello di distribuzione delle nanoparticelle di PS50 e PS100nm all'interno del dispositivo filtro@PDA. La diversa profondità di assorbimento rispetto al volume di campionamento della misura Raman influenza la capacità di rilevazione o meno dei nostri analiti

3.3. Funzionalizzazione plasmonica del substrato per rilevazione SERS

Nella sezione precedente è stato dimostrato come la spettroscopia Raman convenzionale non sia in grado di rilevare le PS50nm trattenute su filtro@PDA. Per superare tale limite, è stato progettato un substrato SERS ottenuto mediante funzionalizzazione della superficie del filtro@PDA con nanoparticelle plasmoniche. In questo lavoro sono state impiegate le GNS, scelte per le loro elevate proprietà di amplificazione del segnale Raman. La sintesi delle GNS è stata eseguita secondo il protocollo descritto nella **Sezione 2.3.3**. In **Figura 23** è riportato lo spettro di estinzione del colloide ottenuto.

Dal profilo di estinzione delle GNS sono riconoscibili due bande caratteristiche della sintesi condotta in presenza di Triton X-100 come surfattante. La prima banda, centrata intorno ai 510 nm, è attribuibile al plasmon del core sferico delle GNS o alla possibile presenza in soluzione di nano-oggetti sferici. La seconda banda, localizzata intorno a 900 nm, è invece associata al modo plasmonico dei singoli bracci delle GNS. Una terza banda caratteristica, generalmente più intensa, ricade nel NIR (Near InfraRed), tra 1200 e 1600 nm, e si trova quindi al di fuori del *range* spettrale indagabile con lo strumento utilizzato.

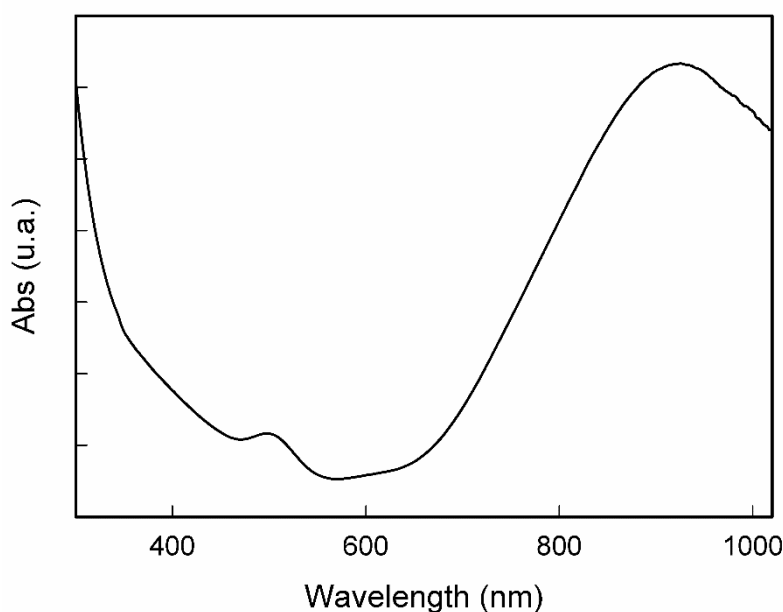


Figura 23: Spettro di estinzione della sospensione colloidale di GNS

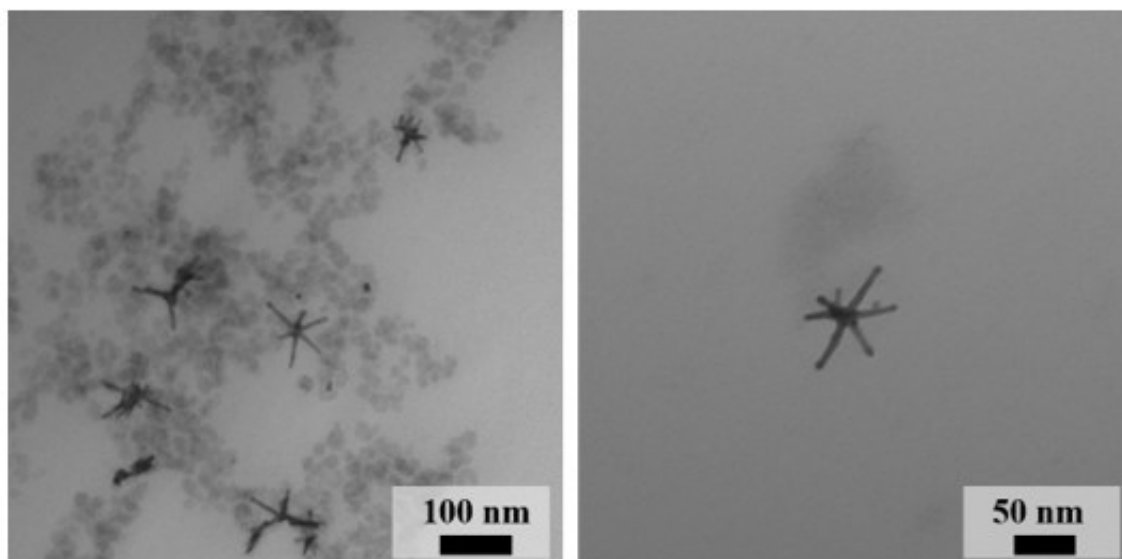


Figura 24: immagini TEM a diversi ingrandimenti delle GNS ottenute mediante sintesi *seed-growth*.

Le immagini TEM (**Figura 24**) confermano l'avvenuta sintesi di nanostelle d'oro con morfologia anisotropa ben definita. Le GNS mostrano un core centrale da cui si diramano bracci appuntiti, responsabili delle proprietà plasmoniche caratteristiche di questa tipologia di nano-oggetti. In particolare, la lunghezza dei bracci risulta intorno ai 50 nm, confermando la formazione di strutture idonee all'impiego come amplificatori SERS. È stato inoltre misurato il potenziale ζ delle GNS nella sospensione colloidale ottenuta al termine della sintesi, caratterizzata da pH acido pari a circa 3. Tale parametro è di particolare interesse ai fini della successiva funzionalizzazione del filtro@PDA con le GNS, poiché può influenzare le interazioni tra le nanoparticelle plasmoniche e la superficie polimerica. Data la carica superficiale negativa delle GNS, si può quindi ipotizzare che, durante il processo di filtrazione descritto nella **Sezione 2.3.5.**, l'adsorbimento delle GNS sulla superficie del filtro@PDA sia favorito dallo sviluppo di interazioni elettrostatiche. Tale meccanismo di *grafting* è già stato dimostrato dal nostro gruppo di ricerca in un recente lavoro condotto su superfici modello di vetro funzionalizzate con PDA.⁵

In **Figura 25** sono riportate le immagini dei substrati filtro e filtro@PDA dopo filtrazione della sospensione colloidale di GNS. Nel caso del filtro non funzionalizzato, la colorazione del substrato risulta poco evidente, indicando una limitata ritenzione delle nanoparticelle plasmoniche. Al contrario, il filtro@PDA mostra una colorazione grigio-nera intensa e omogenea, attribuibile all'adsorbimento efficiente e uniforme delle GNS sulla superficie funzionalizzata. Questo risultato conferma il ruolo del rivestimento in PDA nel favorire l'interazione tra le GNS e il supporto filtrante.

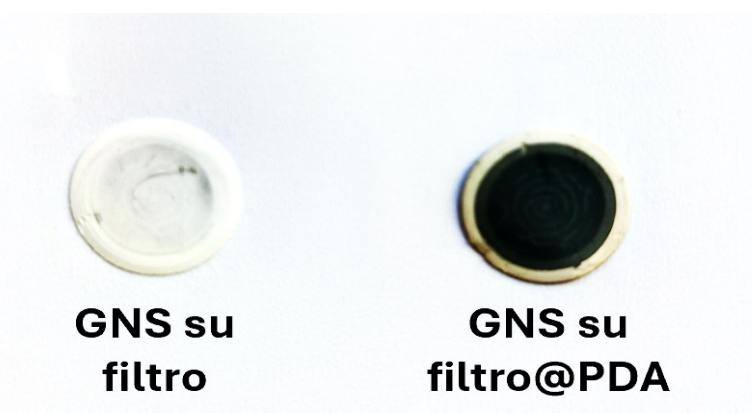


Figura 25: Fotografie del filtro e del filtro@PDA dopo la filtrazione di 3 mL di sospensione colloidale di GNS tal quale.

Un'ulteriore conferma del diverso comportamento dei substrati è fornita dagli spettri UV-vis del pre-filtrato e del post-filtrato riportati in **Figura 26**. Sul filtro non funzionalizzato si osserva una parziale riduzione del profilo di estinzione delle GNS, che indica una ridotta ritenzione, dovuta ragionevolmente alle dimensioni delle nanostelle, sensibilmente più piccole rispetto ai pori dei filtri. Al contrario, nel caso del filtro@PDA, il segnale del post-filtrato risulta completamente abbattuto, indicando una ritenzione pressoché completa delle GNS. Questo comportamento conferma il ruolo determinante del rivestimento in PDA, che

favorisce l'adsorbimento delle nanoparticelle plasmoniche sul substrato attraverso interazioni non covalenti.

L'elevata capacità del filtro@PDA di trattenere le GNS è ulteriormente confermata dalle immagini SEM riportate in **Figura 27**. A diversi ingrandimenti è possibile osservare come le nanoparticelle plasmoniche risultino distribuite in modo omogeneo sull'intera superficie delle fibre del filtro, formando un rivestimento

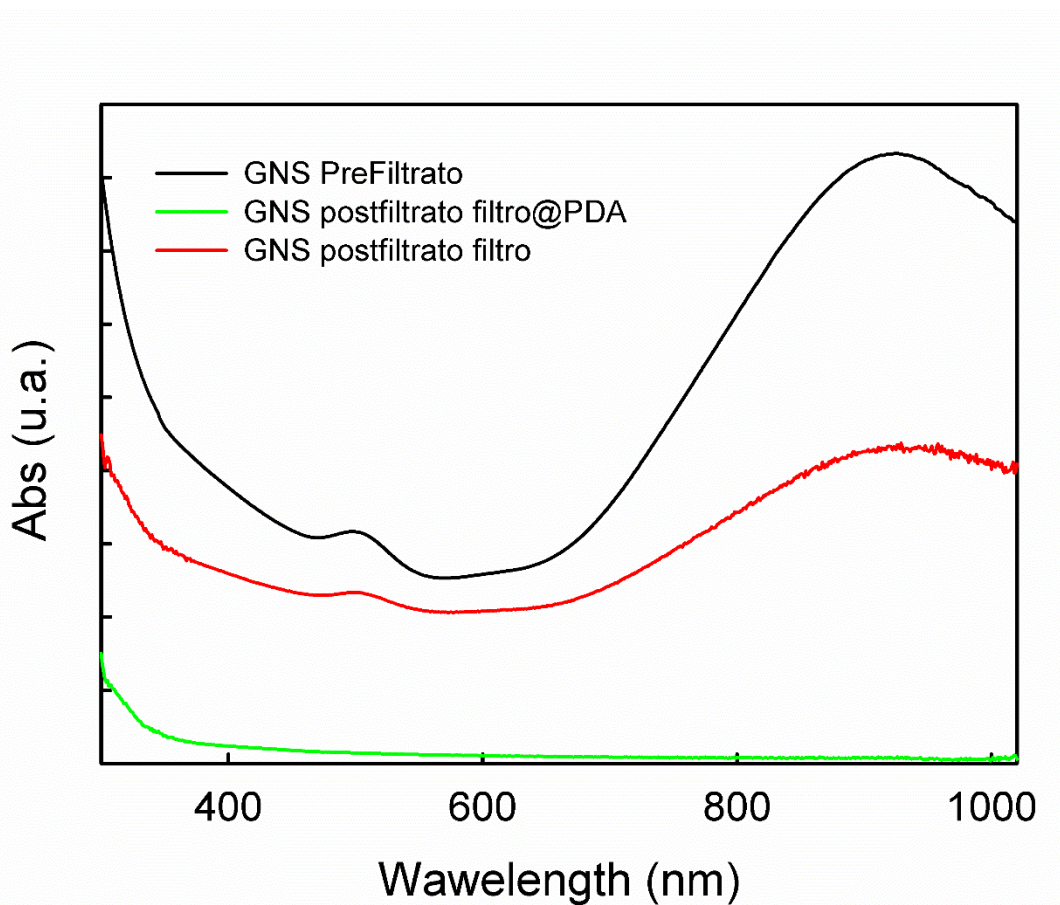


Figura 26: Spettri di estinzione Uv-Vis delle sospensioni colloidali pre-filtrato, post-filtrato su filtro e post-filtrato filtro@PDA

uniforme senza evidenti fenomeni di aggregazione. In particolare, all'aumentare dell'ingrandimento si distinguono chiaramente le singole GNS adsorbite sulla superficie del filtro@PDA, confermando l'efficacia della funzionalizzazione, ottenuta semplicemente mediante il processo di filtrazione al pH opportuno. Tale distribuzione omogenea rappresenta un requisito fondamentale per ottenere un

substrato SERS riproducibile ed efficiente, garantendo la presenza diffusa di *hotspot* plasmonici sull'intera superficie del dispositivo.

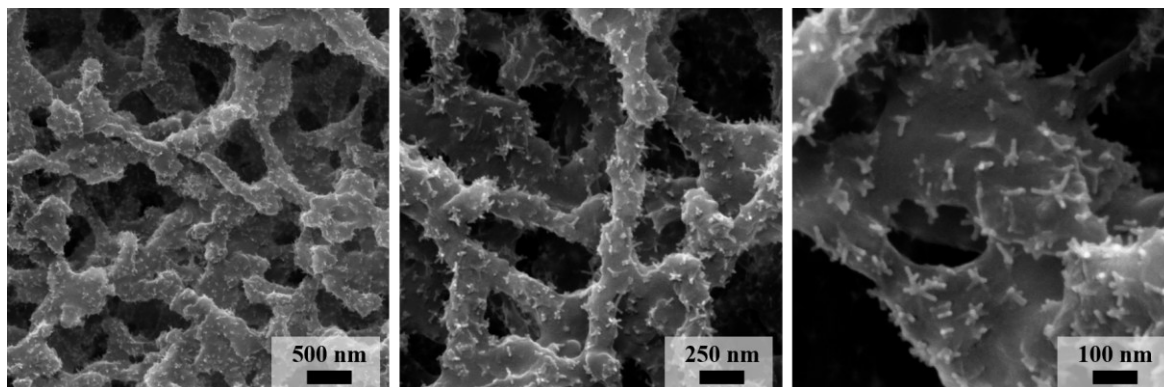


Figura 27: Immagini SEM a differenti ingrandimenti delle GNS caricate su filtro@PDA tramite filtrazione di 3 mL di colloide.

Dopo aver confermato l'avvenuta preparazione del substrato SERS, lo studio si è concentrato sulla filtrazione delle PS50nm su filtro@PDA@GNS in condizioni di pH acido, seguendo la procedura descritta nella **Sezione 2.3.5**. Anche in questo caso, la capacità di ritenzione del substrato nei confronti delle PS50nm è stata valutata mediante analisi della *particle concentration* ottenuta tramite MADLS (**Tabella 16**).

Tabella 16: Analisi capacità di ritenzione di PS50nm da parte del substrato SERS

Pre-filtrato (part. /mL)	Post-filtrato (part. /mL) filtro@PDA	% trattenuta filtro@PDA
$(9.4 \pm 0.8) \times 10^{11}$	$(9.0 \pm 0.6) \times 10^{11}$	< 5%

Le analisi di *particle concentration* mediante MADLS hanno evidenziato che il substrato SERS non è in grado di pre-concentrare efficacemente le PS50nm, mostrando capacità di ritenzione inferiori al 5%. Questo risultato suggerisce che la presenza delle GNS sulla superficie del filtro@PDA ostacoli l'adsorbimento delle PS50nm, probabilmente a causa dello sviluppo di interazioni elettrostatiche

repulsive tra le GNS e le nanoparticelle di polistirene, entrambe caratterizzate da carica superficiale negativa. La funzionalizzazione del filtro@PDA con le GNS sembra quindi modificare le proprietà superficiali complessive del substrato, rimuovendo l'affinità nei confronti delle PS50nm.

Per verificare questa ipotesi, è stato progettato un nuovo esperimento di preparazione del substrato SERS invertendo l'ordine delle filtrazioni. In una prima fase, una sospensione colloidale di PS50nm a pH acido è stata filtrata su filtro@PDA, seguendo la procedura descritta nella **Sezione 2.3.4**. Successivamente, sullo stesso substrato è stata filtrata la sospensione colloidale di GNS, con l'obiettivo di favorire prima la ritenzione delle nanoplastiche e solo in seguito la deposizione delle nanoparticelle plasmoniche.



***Figura 28:** immagine del filtro@PDA caricato con una sospensione di PS50 nm e poi funzionalizzata successivamente con una sospensione di nanostelle.*

La **Figura 28** mostra la fotografia del filtro@PDA caricato con nanoplastiche di PS50nm sul quale successivamente abbiamo filtrato la sospensione colloidale di GNS. Com'è possibile notare, seguendo questa preparazione non è stato possibile ottenere una distribuzione omogenea delle nanostelle sulla superficie del substrato. Questo dato sperimentale, pur se qualitativo, conferma quanto ipotizzato precedentemente. Sono proprio le interazioni elettrostatiche repulsive che si instaurano tra le GNS e le PS50nm non permettono la adesione “contemporanea” delle stesse sui filtri funzionalizzati con PDA.

4. Conclusioni e prospettive

La ricopertura con PDA di filtri commerciali consente la pre-concentrazione di nanoplastiche di PS e PMMA quando vengono adottate condizioni di pH tali da favorire le interazioni elettrostatiche tra le nanoparticelle e la superficie funzionalizzata. Oltre al contributo elettrostatico, la struttura chimica della PDA può promuovere ulteriori interazioni con nanoparticelle polimeriche, tra cui legami a idrogeno, interazioni π - π e interazioni di *van der Waals*: i risultati mostrati indicano comunque che le interazioni elettrostatiche sono quelle che influenzano maggiormente le capacità di adsorbimento delle nanoplastiche nelle condizioni dei nostri esperimenti. Questa capacità di pre-concentrazione ha permesso la rilevazione Raman di nanoplastiche intorno ai 100 nm di diametro per PS e PMMA, a concentrazioni nell'ordine dei ppm, campionando volumi inferiori a 50 mL.

La spettroscopia Raman convenzionale, tuttavia, non è risultata sufficientemente sensibile per la rilevazione delle nanoplastiche di dimensioni inferiori, nelle quantità testate, principalmente a causa della loro distribuzione lungo l'intero volume del filtro@PDA dopo la filtrazione, che, nelle condizioni degli esperimenti mostrati, implica una bassa concentrazione nel volume complessivo del filtro. Come previsto dal progetto di tesi, si è provato quindi a incrementare la sensibilità della tecnica sfruttando l'effetto SERS, funzionalizzando il filtro@PDA con nano-oggetti plasmonici anisotropi. In particolare, è stato dimostrato che, in opportune condizioni sperimentali, le GNS possono essere immobilizzate sul substrato in modo rapido, semplice, uniforme e riproducibile. Tuttavia, si è verificato che la presenza delle GNS modifica le proprietà superficiali del filtro@PDA, ostacolando la successiva adesione delle nanoplastiche. Questo effetto è attribuibile alla repulsione elettrostatica tra le GNS e le nanoparticelle investigate (PS50nm), entrambe caratterizzate da carica superficiale negativa, fatto che limita fortemente la ritenzione delle nanoplastiche.

Sebbene nel corso del presente lavoro di tesi non sia stato possibile sviluppare un substrato SERS in grado di rilevare particelle di polistirene di diametro inferiore ai 100 nm, i risultati ottenuti hanno comunque permesso di ipotizzare che il meccanismo di repulsione tra GNS e PS50nm sia il principale responsabile dell'insuccesso, e questo permette di immaginare possibili strategie alternative.

Possiamo dedurre, da quanto sopra, che i prossimi passi dovrebbero orientarsi verso l'impiego di nano-oggetti plasmonici anisotropi con carica superficiale opposta a quella delle nanoplastiche in esame, in modo da ridurre i fenomeni di repulsione elettrostatica osservati. Questo approccio consentirebbe di promuovere l'immobilizzazione delle nanoplastiche in prossimità degli *hotspot* plasmonici, aumentando così la probabilità di rilevazione mediante Raman-SERS.

Infine, è importante sottolineare che *scaffold* porosi come quelli descritti in questo lavoro possono rappresentare modelli di materiali per la *remediation* di nanoplastiche da acque ambientali. Nel caso di nanoplastiche a carica superficiale positiva, a causa delle proprietà acido-base dei gruppi funzionali nella superficie di PDA, il sistema risulta efficace a valori di pH prossimi alla neutralità, quindi compatibili con quelli tipici delle acque ambientali.

Diverso è il caso delle nanoplastiche a carica negativa, generalmente più diffuse, la cui ritenzione risulta favorita solo a pH inferiori a 4, cioè a valori non facilmente riscontrabili nelle acque ambientali. In questa prospettiva, sviluppi futuri potrebbero essere orientati a modulare la carica superficiale della PDA mediante complessazione con cationi metallici, come Cu^{2+} , Al^{3+} o Fe^{3+} (sfruttando i gruppi amminici e catecolici presenti) con l'obiettivo di ridurre le interazioni repulsive e favorire l'adsorbimento delle nanoplastiche anche a pH tipici delle acque ambientali.

5. Riferimenti

1. Kochanek, A.; Graż, K.; Potok, H.; Gronba-Chyła, A.; Kwaśny, J.; Wiewiórska, I.; Ciula, J.; Basta, E.; Łapiński, J. Micro- and Nanoplastics in the Environment: Current State of Research, Sources of Origin, Health Risks, and Regulations—A Comprehensive Review. *Toxics* **2025**, *13* (7), 564. <https://doi.org/10.3390/toxics13070564>
2. Schiavi, S.; Parmigiani, M.; Galinetto, P.; Albini, B.; Taglietti, A.; Dacarro, G. Plasmonic Nanomaterials for Micro- and Nanoplastics Detection. *Appl. Sci.* **2023**, *13* (16), 9291. <https://doi.org/10.3390/app13169291>
3. Schiavi, S.; Taglietti, A.; Galinetto, P.; Albini, B.; Prakash, O. Polydopamine-Coated Flat Glass Surfaces for Nanoplastics Uptake and Raman-Based Detection: A Case Study with Polystyrene. *Nanoscale* **2025**, *17* (46), 26855–26867. <https://doi.org/10.1039/D5NR02834E>
4. Schiavi, S.; Taglietti, A.; Magni, A.; Galinetto, P.; Albini, B. Increasing SERS Performance of Silver Nanoparticles with Nanometric Coating of Polydopamine: A Novel Approach for Methylene Blue Detection. *Appl. Surf. Sci.* **2025**, 687, 162223. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2024.162223>
5. Ghidoni, L.; Schiavi, S.; Pallavicini, P.; Doveri, L.; Diaz Fernandez, Y. A.; Taglietti, A.; Dacarro, G. Effect of Surface Zeta Potential on the Deposition of Inorganic Nanoparticles on Polydopamine (PDA) Grafting Layers. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2025**, 727, 138460. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.138460>
6. Kolahalam, L. A.; Kasi Viswanath, I. V.; Diwakar, B. S.; Govindh, B.; Reddy, V.; Murthy, Y. L. N. Review on Nanomaterials: Synthesis and Applications. *Mater. Today Proc.* **2019**, *18*, 2182–2190. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.371>
7. Lines, M. G. Nanomaterials for Practical Functional Uses. *J. Alloys Compd.* **2008**, *449* (1–2), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2006.02.082>

8. Gade, A.; Ingle, A.; Whiteley, C.; Rai, M. Mycogenic Metal Nanoparticles: Progress and Applications. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32* (5), 593–600. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0197-9>.
9. Hansard, R.; Maher, B. A.; Kinnersley, R. K. Biomagnetic Monitoring of Industry-Derived Particulate Pollution. *J. Environ. Monit.* **2011**, *13* (5), 1135–1144. <https://doi.org/10.1039/C0EM00741A>. Alivisatos, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science* 1996, **271** (5251), 933–937. <https://doi.org/10.1126/science.271.5251.933>
10. Sau, T. K.; Rogach, A. L. Nonspherical Noble Metal Nanoparticles: Colloid-Chemical Synthesis and Morphology Control. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (16), 1781–1804. <https://doi.org/10.1002/adma.200901271>
11. Mubeen, B.; Ansar, A. N.; Rasool, R.; Ullah, I.; et al. Plasmonic Nanomaterials: An Emerging Avenue in Biomedical and Biomedical Engineering Opportunities. *J. Adv. Res.* **2022**, *39*, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.003>
12. Moon, S.-Y.; Kim, J.-M. Chemistry of Photolithographic Imaging Materials Based on the Chemical Amplification Concept. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2007**, *8* (4), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2007.12.001>
13. El-Baz, Y. G.; Moustafa, A.; Ali, M. A.; El-Desoky, G. E.; Wabaidur, S. M.; Faisal, M. An Analysis of the Toxicity, Antioxidant, and Anti-Cancer Activity of Cinnamon Silver Nanoparticles in Comparison with Extracts and Fractions of *Cinnamomum cassia* at Normal and Cancer Cell Levels. *Nanomaterials* **2023**, *13* (5), 945. <https://doi.org/10.3390/nano13050945>
14. Farmakidis, N.; Youngblood, N.; Li, X.; Tan, J.; Swett, J. L.; Cheng, Z.; Wright, C. D.; Pernice, W. H. P.; Bhaskaran, H. Plasmonic Nanogap Enhanced Phase-Change Devices with Dual Electrical-Optical Functionality. *Sci. Adv.* **2019**, *5* (11), eaaw2687. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw2687>

15. Wang, H.; Wang, T.; Yuan, X.; Wang, Y.; Yue, X.; Wang, L.; Zhang, J.; Wang, J. Plasmonic Nanostructure Biosensors: A Review. *Sensors* **2023**, *23* (19), 8156. <https://doi.org/10.3390/s23198156>
16. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>
17. Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (29), 13857–13870. <https://doi.org/10.1021/jp0516846>
18. Khoury, C. G.; Vo-Dinh, T. Gold Nanostars for Surface-Enhanced Raman Scattering: Synthesis, Characterization and Optimization. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (48), 18849–18859. <https://doi.org/10.1021/jp807113v>
19. Becerril-Castro, I. B.; Calderon, I.; Pazos-Perez, N.; Guerrini, L.; Schulz, F.; Feliu, N.; Chakraborty, I.; Giannini, V.; Parak, W. J.; Alvarez-Puebla, R. A. Gold Nanostars: Synthesis, Optical and SERS Analytical Properties. *Analysis Sensing* **2022**, *2* (3), e202200005. <https://doi.org/10.1002/anse.202200005>
20. Pallavicini, P.; Donà, A.; Casu, A.; Chirico, G.; Collini, M.; Dacarro, G.; Falqui, A.; Milanese, C.; Sironi, L.; Taglietti, A. Triton X-100 for Three-Plasmon Gold Nanostars with Two Photothermally Active NIR (Near IR) and SWIR (Short-Wavelength IR) Channels. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (56), 6265–6267. <https://doi.org/10.1039/C3CC42999G>
21. Jones, R. R.; Hooper, D. C.; Zhang, L.; Wolverson, D.; Valev, V. K. Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14* (1), 231. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3039-2>
22. Galdes, C. F. G. C. Introduction to Infrared and Raman-Based Biomedical Molecular Imaging and Comparison with Other Modalities. *Molecules* **2020**, *25* (23), 5547. <https://doi.org/10.3390/molecules25235547>

23. Orlando, A.; Franceschini, F.; Muscas, C.; Pidkova, S.; Bartoli, M.; Rovere, M.; Tagliaferro, A. A Comprehensive Review on Raman Spectroscopy Applications. *Chemosensors* **2021**, *9* (9), 262. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9090262>.
24. Eberhardt, K.; Stiebing, C.; Matthäus, C.; Schmitt, M.; Popp, J. Advantages and Limitations of Raman Spectroscopy for Molecular Diagnostics: An Update. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15* (6), 773–787. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1036744>
25. Liu, K.; Zhao, Q.; Li, B.; Zhao, X. Raman Spectroscopy: A Novel Technology for Gastric Cancer Diagnosis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 856591. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.856591>
26. Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. Raman Spectra from Electrode Surfaces. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, (3), 80–82. <https://doi.org/10.1039/C39730000080>
27. Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26* (2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1)
28. Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P. Surface Raman Spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84* (1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6).
29. Moskovits, M. Surface Roughness and the Enhanced Intensity of Raman Scattering by Molecules Adsorbed on Metals. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69* (9), 4159–4161. <https://doi.org/10.1063/1.437095>
30. Zhao, P.; Kiriya, D.; Azcatl, A.; Zhang, C.; Tosun, M.; Liu, Y.-S.; Hettick, M.; Kang, J. S.; McDonnell, S.; Santosh, K. C.; Guo, J.; Cho, K.; Wallace, R. M.; Javey, A. Air Stable *p*-Doping of WSe₂ by Covalent Functionalization. *ACS Nano* **2014**, *8* (10), 10808–10814. <https://doi.org/10.1021/nn5047844>.
31. Pan, L.; Wang, L.; Song, Y. Advances in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Aquatic Environmental Pollutants. *Anal. Sens.* **2025**. <https://doi.org/10.1002/anse.202500062>

32. Reguera, J.; Langer, J.; Jiménez de Aberasturi, D.; Liz-Marzán, L. M. Anisotropic Metal Nanoparticles for Surface Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (13), 3866–3885. <https://doi.org/10.1039/C7CS00158D>
33. Parmigiani, M.; Albini, B.; Pellegrini, G.; Genovesi, M.; De Vita, L.; Pallavicini, P.; Dacarro, G.; Galinetto, P.; Taglietti, A. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Chips Based on Silver Coated Gold Nanostars. *Nanomaterials* **2022**, *12* (20), 3609. <https://doi.org/10.3390/nano12203609>
34. Grand, J.; de la Chapelle, M. L.; Bijoon, J.-L.; Adam, P.-M.; Vial, A.; Royer, P. Role of Localized Surface Plasmons in Surface-Enhanced Raman Scattering of Shape-Controlled Metallic Particles in Regular Arrays. *Phys. Rev. B* **2005**, *72* (3), 033407. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.72.033407>
35. Joudeh, N.; Linke, D. Nanoparticle Classification, Physicochemical Properties, Characterization, and Applications: A Comprehensive Review for Biologists. *J. Nanobiotechnol.* **2022**, *20* (1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
36. Langer, J.; Jiménez de Aberasturi, D.; Aizpurua, J.; Alvarez-Puebla, R. A.; Auguie, B.; Baumberg, J. J.; Bazan, G. C.; Bell, S. E. J.; Boisen, A.; Brolo, A. G.; Choo, J.; Cialla-May, D.; Deckert, V.; Fabris, L.; Faulds, K.; García de Abajo, F. J.; Goodacre, R.; Graham, D.; Haes, A. J.; Haynes, C. L.; *et al.* Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2020**, *14* (1), 28–117. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04224>
37. Wei, H.; Xu, H. Hot Spots in Different Metal Nanostructures for Plasmon-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nanoscale* **2013**, *5* (22), 10794–10805. <https://doi.org/10.1039/C3NR02924G>
38. Stoner, A. M. K.; Eisenstein, O. On the Origin of the Substituent Effect. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (15), 5439–5453. <https://doi.org/10.1021/jp0687908>
39. Liu, Y.; Ai, K.; Lu, L. Polydopamine and Its Derivative Materials: Synthesis and Promising Applications in Energy, Environmental, and Biomedical Fields. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (9), 5057–5115. <https://doi.org/10.1021/cr400407a>.

40. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318* (5849), 426–430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>.
41. Liebscher, J.; Mrówczyński, R.; Scheidt, H. A.; Filip, C.; Hădăde, N. D.; Turcu, R.; Bende, A.; Beck, S. Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story? *Langmuir* **2013**, *29* (33), 10539–10548. <https://doi.org/10.1021/la4020288>.
42. Liu, J.; Wang, Y.; Zhang, L.; Chen, S.; Li, Y. Electrochemical and Surface Characterization of Polydopamine Films Formed on Gold Electrodes. *Langmuir* **2016**, *32* (19), 4935–4942. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00990>
43. Xu, L.-Q.; Yang, W.-J.; Neoh, K.-G.; Kang, E.-T.; Fu, G.-D. Dopamine-Induced Reduction and Functionalization of Graphene Oxide Nanosheets. *Macromolecules* **2010**, *43* (20), 8336–8339. <https://doi.org/10.1021/ma101526k>
44. Ball, V.; Del Frari, D.; Toniazio, V.; Ruch, D. Kinetics of Polydopamine Film Deposition as a Function of pH and Dopamine Concentration: Insights into the Polydopamine Deposition Mechanism. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *386* (1), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.030>
45. Caniglia, G.; Teuber, A.; Barth, H.; Mizaikoff, B.; Kranz, C. Atomic Force and Infrared Spectroscopic Studies on the Role of Surface Charge for the Anti-Biofouling Properties of Polydopamine Films. *Anal. Bioanal. Chem.* **2023**, *415* (11), 2059–2070. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04431-7>.
46. Abounahia, N.; Qiblawey, H.; Zaidi, S. J.; Membranes for Improving Membrane Performance: Progress for Co-Incorporation of Polydopamine and Nanoparticles. *Membranes* **2022**, *12* (7), 675. <https://doi.org/10.3390/membranes12070675>
47. Law, K. L.; Thompson, R. C. Microplastics in the Seas. *Science* **2014**, *345* (6193), 144–145. <https://doi.org/10.1126/science.1254065>
48. Zhang, X.; Chen, Y.; Liu, H.; Li, J.; Wang, X.; Zhang, Y.; Chen, X.; Wang, J. Sustainable Carbon-Based Electrocatalysts for Oxygen Reduction Reaction: A

- Review of Recent Advances and Perspectives. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, 8 (27), 10257–10278. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
49. National Oceanic and Atmospheric Administration Website. Available online: <https://oceanservice.noaa.gov/facts/microplastics.html> (accessed on 18 January 2023).
 50. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Presence of Microplastics and Nanoplastics in Food, with Particular Focus on Seafood. *EFSA J.* **2016**, 14 (6), 4501. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>
 51. Yee, M. S.-L.; Hii, L.-W.; Looi, C. K.; Lim, W.-M.; Wong, S.-F.; Kok, Y.-Y.; Tan, B.-K.; Wong, C.-Y.; Leong, C.-O. Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health. *Nanomaterials* **2021**, 11 (2), 496. <https://doi.org/10.3390/nano11020496>
 52. Cortés-Guzmán, D.; Bowler, D. E.; Haase, P. Spatial and Temporal Effects of Heat Waves on the Diversity of European Stream Invertebrate Communities. *Sci. Total Environ.* **2024**, 953, 176228. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176228>
 53. Ali, N.; Katsouli, J.; Marczylo, E. L.; Gant, T. W.; Wright, S.; Bernardino de la Serna, J. The Potential Impacts of Micro- and Nanoplastics on Various Organ Systems in Humans. *EBioMedicine* **2024**, 99, 104901. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104901>
 54. Osman, A. I.; Hosny, M.; Eltaweil, A. S.; Omar, S.; Elgarahy, A. M.; Farghali, M.; Yap, P.-S.; Wu, Y.-S.; Nagandran, S.; Batumalaie, K.; Gopinath, S. C. B.; John, O. D.; Sekar, M.; Saikia, T.; Karunanithi, P.; Hatta, M. H. M.; Akinyede, K. A. Microplastic Sources, Formation, Toxicity, and Remediation: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2023**, 21 (4), 2129–2169. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01593-3>
 55. Talvitie, J.; Mikola, A.; Koistinen, A.; Setälä, O. Solutions to Microplastic Pollution—Removal of Microplastics from Wastewater Effluent with Advanced Wastewater Treatment Technologies. *Water Res.* **2017**, 123, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.005>

56. Lares, M.; Ncibi, M. C.; Sillanpää, M.; Sillanpää, M. Occurrence, Identification and Removal of Microplastic Particles and Fibers in Conventional Activated Sludge Process and Advanced MBR Technology. *Water Res.* **2018**, *133*, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.049>
57. Zhou, G.; Xu, H.; Song, H.; Yi, J.; Wang, X.; Chen, Z.; Zhu, X. Photocatalysis toward Microplastics Conversion: A Critical Review. *ACS Catal.* **2024**, *14* (11), 8694–8719. <https://doi.org/10.1021/acscatal.4c01449>
58. Peydayesh, M.; Suta, T.; Usuelli, M.; Handschin, S.; Canelli, G.; Bagnani, M.; Mezzenga, R. Sustainable Removal of Microplastics and Natural Organic Matter from Water by Coagulation–Flocculation with Protein Amyloid Fibrils. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55* (13), 8848–8858. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01918>
59. Amparán, M. A. A.; Palacios, A.; Flores, G. M.; Castro Olivera, P. M. Review and Future Outlook for the Removal of Microplastics by Physical, Biological and Chemical Methods in Water Bodies and Wastewaters. *Environ. Monit. Assess.* **2025**, *197*, 429. <https://doi.org/10.1007/s10661-025-13883-0>
60. Zhou, H.; Mayorga-Martinez, C. C.; Pumera, M. Microplastic Removal and Degradation by Mussel-Inspired Adhesive Magnetic/Enzymatic Microrobots. *Small Methods* **2021**, *5* (9), 2100230. <https://doi.org/10.1002/smt.202100230>
61. Zhang, X.; Lv, D.; Li, B.; Liu, Z.; Yang, F.; et al. Polydopamine-Functionalized Magnetic Algae Composite for Efficient Removal of Polystyrene Microplastics: Mechanistic Insights and Performance. *Colloids Surf. A* **2025**, *725*, 137594. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.137594>
62. Zheng, B.; Li, B.; Wan, H.; Lin, X.; Cai, Y. Coral-Inspired Environmental Durability Aerogels for Micron-Size Plastic Particles Removal in the Aquatic Environment. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *424*, 128611. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128611>
63. Xu, K.; Pang, T.; Zhang, M.; Zhang, M.; Zhao, W.; Chen, Z. Polydopamine-Encapsulated Diatomite Composites Loaded with ZIF-8 for Efficient

- Adsorption of Anionic Dyes and Nanoplastics from Water. *Polyhedron* **2025**, 279, 117642. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2025.117642>
64. Han, M.; Wang, Z.; Xie, Z.; Hou, M.; Gao, Z. Polydopamine-Modified Sodium Alginate Hydrogel for Microplastics Removal: Adsorption Performance, Characteristics, and Kinetics. *Int. J. Biol. Macromol.* **2025**, 297, 139947. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139947>
65. Qin, X.; Wang, F.; Chang, D.; Zhong, C.; Wang, Y.; Xie, Y.; Zhong, C. Polydopamine-Coated Bacterial Cellulose Spheroids for Enhanced Micro/Nanoplastics Removal and Closed-Loop Upcycling. *Chem. Eng. J.* **2026**, 512, 176508. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2026.176508>
66. Zhang, Y.; Liu, H.; Wang, J.; Chen, X.; Li, L.; Zhao, Q. Enhanced Adsorption and Photocatalytic Degradation Performance of Modified Biochar-Based Composites for Emerging Contaminants Removal. *J. Environ. Chem. Eng.* **2025**, 13, 120459. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.120459>
67. Nava, V.; Frezzotti, M. L.; Leoni, B. Raman Spectroscopy for the Analysis of Microplastics in Aquatic Systems. *Appl. Spectrosc.* **2021**, 75 (11), 1341–1357. <https://doi.org/10.1177/00037028211043119>;
68. Mayorga, C.; Athalye, S. M.; Boodaghidizaji, M.; Sarathy, N.; Hosseini, M.; et al. Limit of Detection of Raman Spectroscopy Using Polystyrene Particles from 25 to 1000 nm in Aqueous Suspensions. *Anal. Chem.* **2025**, 97, 00182. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c00182>
69. Matsushita, A.; Ren, Y.; Matsukawa, K.; Inoue, H.; Minami, Y.; Noda, I.; Ozaki, Y. Two-Dimensional Fourier-Transform Raman and Near-Infrared Correlation Spectroscopy Studies of Poly(methyl methacrylate) Blends: 1. Immiscible Blends of Poly(methyl methacrylate) and Atactic Polystyrene. *Vib. Spectrosc.* **2000**, 24, 171–180. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(00\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(00)00062-X)