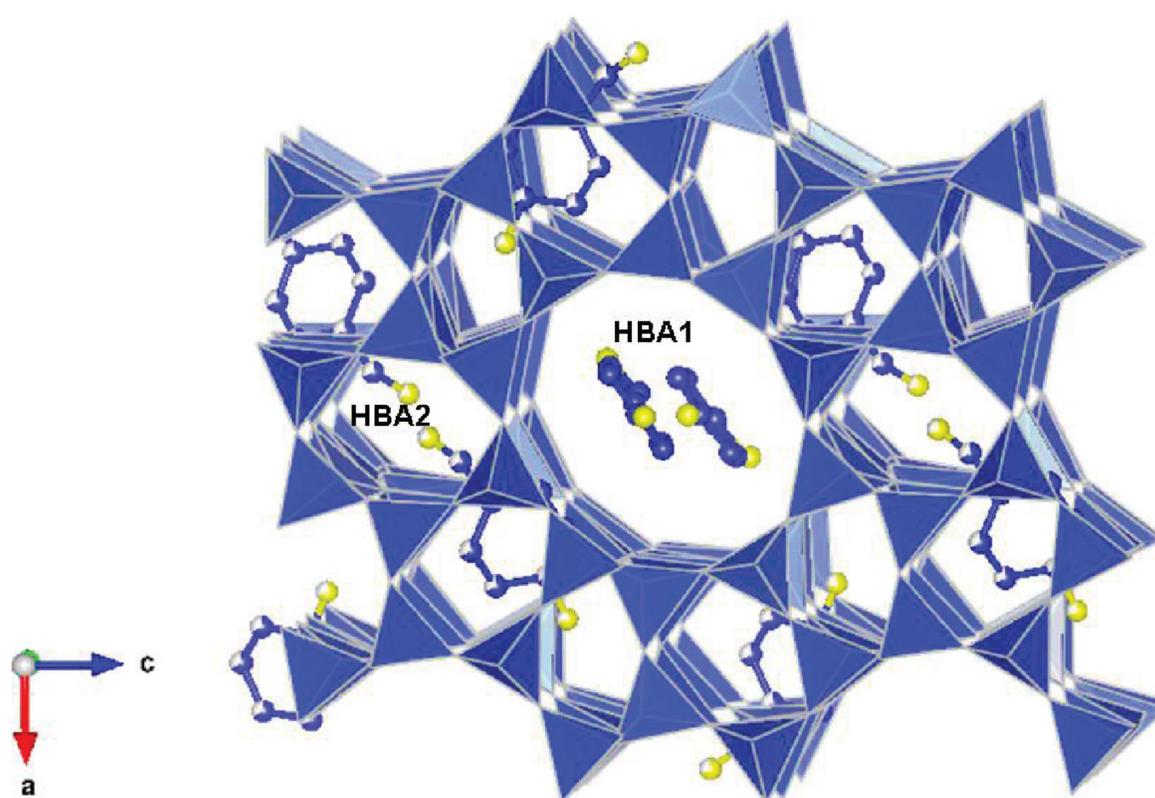


anno II - N° 3 - MAGGIO/GIUGNO 2018

 **La Chimica e l'Industria** online

 **Organo Ufficiale della Società Chimica Italiana**

**3**



**2018**

ISSN 2283-544X

**In questo numero si parla di:**  
nanotecnologie, Giornate di Chimica analitica in memoria del prof. Dondi



# Specialists in gaskets

# TEXPACK®

Richiedete il nuovo catalogo generale al nostro Customer Service

Texpack® srl - unipersonale

Azienda certificata UNI EN ISO 9001: 2008

Via Galileo Galilei, 24 - 25030 Adro (BS) Italia

Tel. +39 030 7480168 - Fax +39 030 7480201

info@texpack.it - www.texpack.it





## QUALI I MESSAGGI DEL REACH PER NOI ACCADEMICI DOPO 11 ANNI?



Il Reach è l'acronimo del Regolamento della Comunità Europea sulla "Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals and Restriction", però quest'ultima parola non è compresa nell'acronimo. Il Reach è entrato in vigore il 1° giugno nel 2007 ed io ho partecipato come direttore di questa rivista alla sua inaugurazione a Bruxelles.

Il compito del Reach è di tenere sotto controllo le sostanze chimiche prodotte in Europa o importate da Paesi extraeuropei in quantità superiori ad 1 t/a per assicurarne una molto bassa tossicità per le persone e gli animali ed un'elevata protezione verso l'ambiente e per mettere a punto nuove metodologie più efficaci in grado di valutarne il rischio chimico. Il Reach non copre le sostanze radioattive, i rifiuti e le sostanze che sono utilizzate per usi militari, i polimeri e i prodotti di raffinazione. È obbligo per il Reach che le sostanze chimiche prodotte in Europa o importate in quantità >1 t/a siano registrate dalle aziende per permettere all'ECHA (l'Agenzia Europea della Chimica che controlla l'applicazione del Reach) di effettuare verifiche per valutarne la tossicità. In particolare se le aziende producono o importano un prodotto

(che può essere una miscela, o un articolo), e questo contiene più sostanze chimiche, esse devono essere tutte registrate singolarmente.

Finora ci sono state già due scadenze di registrazione:

- il 30 novembre 2010 per le sostanze cancerogene (>1 t/a), altamente tossiche per gli organismi acquatici (>100 t/a) o prodotte in grandi quantità (>1.000 t/a);
- il 31 maggio 2013 per quelle prodotte in quantità fra 1.000 t/a e 100 t/a.

Il 31 maggio 2018 c'è stata la scadenza per la terza registrazione, quelle delle sostanze prodotte fra 1 e 100 t/a. Al 1° maggio 2018 sono state registrate 17.000 sostanze.

All'interno del Regolamento c'è il compito di individuare fra le sostanze registrate quelle che sono state definite SVHC (Substances of Very High Concern, ossia molto preoccupanti) e queste sono quelle che presentano una delle seguenti tossicità: noti o previsti effetti cancerogeni, o mutageni, o tossici per la riproduzione (quindi di categoria 1A o 1B), o PBT (persistenti, bioaccumulanti e tossiche), o vPvB (molto persistenti e molto bioaccumulanti), o tossiche equivalenti, ossia che possiedono proprietà equivalenti a quelle dei punti precedenti e che quindi costituiscono un rischio di pericolo per la salute umana o per l'ambiente (ad esempio, i perturbatori endocrini).

Attualmente sono state individuate 181 sostanze SVHC ed inserite nella "Candidate List". Fra queste ricordiamo: 25 composti del piombo, 14 del cromo, 9 del cadmio, 7 dell'arsenico, 7 del boro, 5 del cobalto, 2 alluminosilicati e 113 sostanze



organiche o metallorganiche con elementi diversi dai precedenti, fra le quali 8 poliaromatici con più di 3 anelli. È necessario conoscere per noi accademici queste sostanze perché sarà necessario nel prossimo futuro trovare sostanze alternative meno tossiche, perché molto probabilmente saranno messe fuori mercato.

Delle sostanze presenti nella Candidate List sono state finora trasferite nella Authorization List 43 sostanze per le quali sarà già necessario chiedere un'autorizzazione per il loro utilizzo. L'ECHA per adesso ha inserito nella "Authorization List" le sostanze SVHC presenti nel mercato europeo in una quantità significativa e che hanno un uso ampiamente dispersivo, dalla produzione, all'uso e/o alla messa in discarica, e quindi possiedono un elevato rischio chimico, oltre ad aver un elevato pericolo chimico, essendo già classificate SVHC. Gli utilizzatori a valle devono informare l'Agenzia del fatto che stanno impiegando una sostanza inserita in questo allegato e presentare una richiesta di autorizzazione per i propri usi. La Commissione Europea potrà dare l'autorizzazione all'uso, se il richiedente sarà in grado di dimostrare che il rischio derivante dall'uso della sostanza in questione sia adeguatamente controllato; ciò vale solo per le sostanze tossiche per il genere umano, per le quali c'è un limite di soglia, per tutte le altre, per le quali non c'è nessuna possibilità di controlli adeguati, non c'è possibilità di affermare che si possa controllare il rischio.

Allo stato attuale, fra le sostanze presenti nella "Authorization List" ci sono 3 composti di arsenico (cancerogeni), 14 composti del Cr (cancerogeni), 6 ftalati (tossici per la riproduzione), 19 sostanze organiche (con diversi tipi di tossicità) e un fosfato organico (tossico per la riproduzione). Per molte di queste sostanze il termine di scadenza è ormai già superato, per alcune avverrà prima della fine del 2020.

Esiste anche una lista delle restrizioni, ossia di sostanze che assolutamente non dovrebbero essere utilizzate. Questa lista comprende 68 sostanze o famiglie di sostanze, per la gran parte delle quali non è stata fatta la registrazione. È utile ricordare che sono inclusi tutti i composti a base di As, Cd e Hg, alcuni a base di Ni, alcuni ftalati, poliaromatici a più anelli, fibre di asbesto e molte sostanze clorate.

Altri aspetti positivi ed innovativi del Reach sono stati gli interventi per ridurre la sperimentazione animale. Quando il Reach è stato proposto è nata la critica che la sua attuazione avrebbe richiesto un grande numero di prove di tossicità, soprattutto di quelle a lungo termine, e ciò avrebbe condotto ad una carneficina di animali. Proprio per questo è stato fissato subito dall'ECHA il principio OSOR (One Substance One Registration) per il quale è obbligatorio che le aziende si consorzino per presentare una sola registrazione per ogni prodotto, riducendo così i costi e la sperimentazione animale. Inoltre l'ECHA è intervenuta accettando e promuovendo esperimenti alternativi per minimizzare la sperimentazione animale, soprattutto quella sui vertebrati. Tuttavia era stato evidenziato che le prove degli effetti a lungo termine erano quelle più impegnative da realizzare, per esempio quelle su cancerogenicità, mutagenicità, effetti sul sistema riproduttivo e sui distruttori del sistema endocrino. Le prove alternative attualmente proposte sono i metodi di simulazione numerici di correlazione quantitativa struttura-attività (metodi QSAR), le prove di tossicità su sostanze simili (*read across*) e le prove su invertebrati *in vitro* (*weight of evidence*).

Di queste sostanze almeno l'89% ha avuto un "end point", dove si è utilizzata una tecnica alternativa all'utilizzo di animali. La tecnica alternativa più utilizzata è stata la *read across*, ossia la raccolta di informazioni da sostanze simili, con il 63%, seguita dalla *weight of evidence*, ossia ottenere informazioni da sostanze diverse, con il 43% e poi dal QSAR con il 34%.

È principio base della regolamentazione Reach che le prove di tossicità sugli animali debbano essere realizzate solo come ultima risorsa, che occorra trovare metodi alternativi e che sia consentito non effettuare prove quando si dimostra che non vi è alcun impatto di una sostanza sugli esseri umani e sull'ambiente. La Commissione Europea ha fornito 40 milioni di euro/anno per supportare la ricerca su metodi alternativi alla sperimentazione animale dal 2012 al 2016.

# TRIBUNALE DI TREVISO

Invito ad offrire  
per l'acquisto di immobile e impianto industriale



## N. REG. FALL. N. 108/2015

Si rende noto che il Fallimento intende cedere tramite procedura competitiva in UNICO LOTTO il IMPIANTO INDUSTRIALE appreso al fallimento suddetto, sito in Comune di San Giorgio di Nogaro (UD), Via Torricelli n. 1, costituito da:

- piena proprietà di un capannone industriale e di fabbricati tecnici per c.a. 4000 mq e di terreni industriali pertinenziali per c.a. 35.000 mq;
- contratto di locazione finanziaria (leasing) dell'impianto fotovoltaico e subentro nelle due convenzioni sottoscritte con GSE S.P.A. e nell'atto di pegno su crediti.
- impianto per la produzione di glicerina e dei serbatoi per lo stoccaggio del prodotto.

OFFERTA MINIMA EURO 800.000,00 (ottocentomila/00).

Gli interessati dovranno far pervenire la propria offerta irrevocabile di acquisto entro e non oltre il giorno 10 AGOSTO 2018, depositandola presso lo Studio del Curatore previo appuntamento telefonico, completa delle generalità dell'offerente,

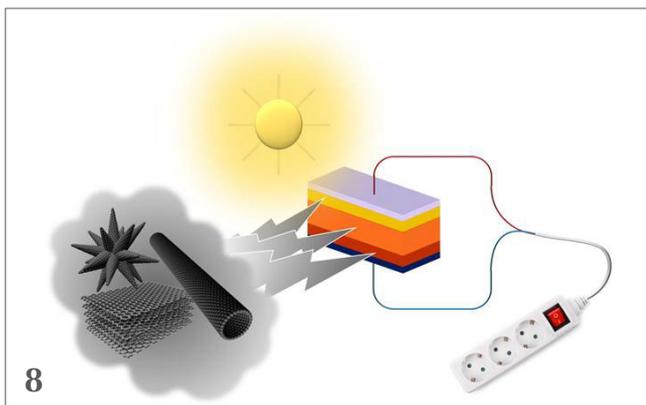
del prezzo offerto e di assegno circolare a cauzione di importo pari al 10% del prezzo offerto intestato alla procedura fallimentare.

L'offerta dovrà anche contenere l'impegno irrevocabile a partecipare alla procedura di vendita competitiva che il Curatore esperirà.

La pubblicazione del presente avviso non comporta alcun obbligo o impegno da parte della Procedura a contrarre, né alcun diritto o pretesa, per qualsiasi ragione o causa, in capo ai soggetti interessati all'acquisto.

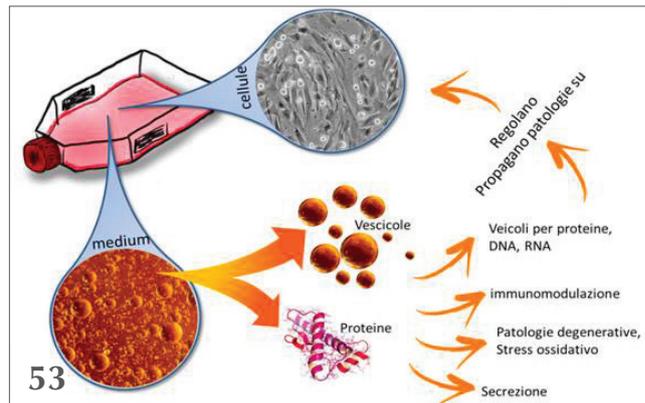
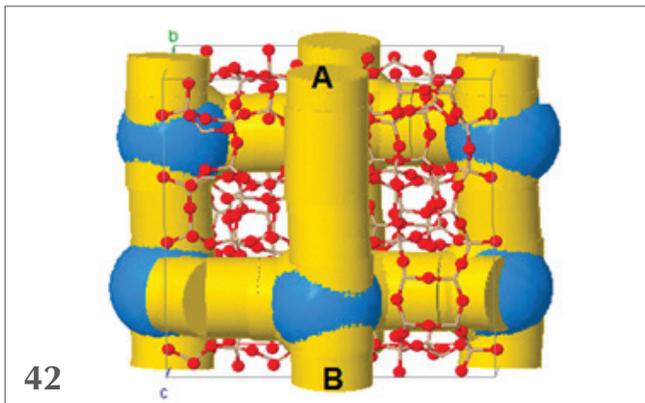
Per la descrizione dei beni e ulteriori specifiche per la presentazione delle offerte si rinvia alla perizia di stima e all'invito ad offrire integrale pubblicati su [www.fallimentitreviso.com](http://www.fallimentitreviso.com), [www.tribunale.treviso.it](http://www.tribunale.treviso.it), [www.asteannunci.it](http://www.asteannunci.it), [www.asteavvisi.it](http://www.asteavvisi.it), [www.rivistaastegiudiziarie.it](http://www.rivistaastegiudiziarie.it), [www.canaleaste.it](http://www.canaleaste.it), [www.asteonline.it](http://www.asteonline.it), [www.ivgtreviso.it](http://www.ivgtreviso.it), oppure contattare lo Studio del Curatore Dott. Massimo Vendramin, tel. 0422-490083 ed e-mail [studio@massimovendramin.191.it](mailto:studio@massimovendramin.191.it), pec: [f108.2015treviso@pecfallimenti.it](mailto:f108.2015treviso@pecfallimenti.it).

Copertina: Distribuzione di *p*-idrossibenzaldeide in una zeolite



- EDITORIALE**
- 3** QUALI I MESSAGGI DEL REACH PER NOI ACCADEMICI DOPO 11 ANNI?  
Ferruccio Trifirò
- CHIMICA & NANOTECNOLOGIE**
- 8** L'UTILIZZO DELLE NANOSTRUTTURE DI CARBONIO NEL FOTOVOLTAICO IBRIDO DI TERZA GENERAZIONE  
Teresa Gatti, Enzo Menna
- 16** NANOMATERIALI PER LO SVILUPPO DI SENSORI ELETTROCHIMICI  
Domenica Tonelli
- 24** MICROREATTORI E BIOCATALISI: COME MINIMIZZARE IL DIVARIO TRA RICERCA ACCADEMICA E INDUSTRIA  
Martina Letizia Contente, Lucia Tamborini
- 32** LE NANOTECNOLOGIE IN AIUTO DELL'ORGANIZZAZIONE PER LA DISTRUZIONE DELLE ARMI CHIMICHE, MA ANCHE SOTTO CONTROLLO PER LA TOSSICITÀ  
Ferruccio Trifirò
- CHIMICA & BREVETTI**
- 36** IL BREVETTO UNITARIO: QUALE OPPORTUNITÀ PER LE IMPRESE?  
Massimo Barbieri
- CHIMICA & ANALITICA**
- 42** MATERIALI ADSORBENTI PER LA RIMEDIAZIONE DI ACQUE  
Tatiana Chenet, Luisa Pasti, Annalisa Martucci
- 44** AMMINE BIOGENE NEI VINI  
Luca Rivoira

- 47** TEST MULTIANALITA COLORIMETRICI A FLUSSO LATERALE  
Fabio Di Nardo
- 50** DLLME PER L'ESTRAZIONE DI BDZ  
Maurizio Piergiovanni, Achille Capiello, Giorgio Famiglini, Veronica Termopoli, Pierangela Palma
- 53** STRATEGIE PER SEMPLIFICARE CAMPIONI ALTAMENTE COMPLESSI E CARATTERIZZARE VESCICOLE EXTRACELLULARI: ACCOPPIAMENTO DI TECNICHE ORTOGONALI E FRAZIONAMENTO IN CAMPO FLUSSO-FLUSSO A FIBRA TUBULARE POROSA  
Valentina Marassi, Barbara Roda, Andrea Zattoni, Pierluigi Reschiglian
- 56** LC-EI-MS: UN NUOVO APPROCCIO STRUMENTALE  
Veronica Termopoli, Giorgio Famiglini, Pierangela Palma, Maurizio Piergiovanni, Achille Capiello
- PAGINE DI STORIA**
- 60** FRANCESCO SELMI, SCIENZIATO ALIENO DAGLI APPLAUSI  
Marco Taddia
- DALLA LETTERATURA**
- 64** a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera
- LA CHIMICA ALLO SPECCHIO**
- 66** LA STORIA INFINITA DEI NEONICOTINOIDI  
Claudio Della Volpe



[http://www.soc.chim.it/riviste/chimica\\_industria/catalogo](http://www.soc.chim.it/riviste/chimica_industria/catalogo)

**DIRETTORE RESPONSABILE**

Ferruccio Trifirò

**REDAZIONE SCIENTIFICA**

Anna Simonini

Piazzale R. Morandi, 2 - 20121 Milano - tel. +39 345 0478088

[anna.simonini@soc.chim.it](mailto:anna.simonini@soc.chim.it)

**COMITATO DI REDAZIONE**

Alessandro Abbotto, Federico Bella, Nicola Cardellicchio, Martino Di Serio, Daniele Donati, Matteo Guidotti, Oreste Piccolo, Anna Simonini, Marco Taddia, Ferruccio Trifirò, Fiorenza Viani

**COMITATO SCIENTIFICO**

Angela Agostiano, Alberto Albinati, Vincenzo Barone, Luigi Campanella, Sergio Carrà, Donatella Caruso, Silvia Colombo, Gabriele Costantino, Gianluca Farinola, Carla Isernia, Aldo Laganà, Francesco Paolucci, Italo Pasquon, Francesco Luigi Pignataro, Raffaele Riccio, Adriana Saccone, Elena Selli, Lucia Toniolo, Giovanni Villani



**HANNO COLLABORATO**

Silvia Cauteruccio, Monica Civera, Claudio Della Volpe

**PROGETTO GRAFICO E IMPAGINAZIONE**

Sara Moscardini - [info@hamletcommunication.com](mailto:info@hamletcommunication.com) - Skype: hamlet262

**CONCESSIONARIA DI PUBBLICITÀ**

Agicom Srl

Viale Caduti in Guerra, 28 - Castelnuovo di Porto (Roma)

Tel. +39 06 9078285, fax +39 06 9079256

[agicom@agicom.it](mailto:agicom@agicom.it)

Skype: agicom.advertising

**EDITORE**

PAS-SCI Srl

Roma

Reg. Tribunale di Milano n. 134 del 11/04/2017

ISSN 2283-544X

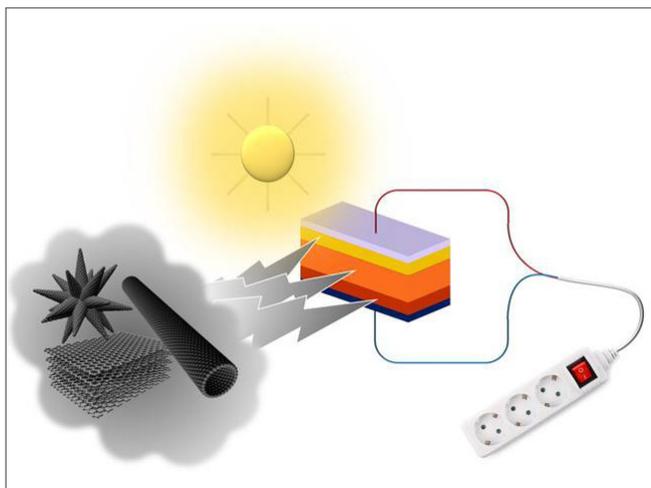




TERESA GATTI, ENZO MENNA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE  
UNIVERSITÀ DI PADOVA  
TERESA.GATTI@UNIPD.IT  
ENZO.MENNA@UNIPD.IT

# L'UTILIZZO DELLE NANOSTRUTTURE DI CARBONIO NEL FOTOVOLTAICO IBRIDO DI TERZA GENERAZIONE

*Con questo articolo ci proponiamo di fornire una visione generale dei molti vantaggi risultanti dall'utilizzo di nanostrutture di carbonio in dispositivi fotovoltaici ibridi di ultima generazione (celle solari a colorante e a perovskite). Questi nanomateriali offrono interessanti prospettive per migliorare la stabilità e la scalabilità e per abbassare i costi di produzione di queste tecnologie, accelerandone l'ingresso nel mercato.*



La richiesta di dispositivi fotovoltaici efficienti e stabili cresce insieme alla necessità di abbassarne i costi di produzione. Celle solari in silicio mono-cristallino sono disponibili oggi sul mercato con efficienze di conversione (power conversion efficiency - PCE) in alcuni casi superiori al 23% e durata media di 25 anni, come generalmente garantito dai produttori. Nonostante ciò, la ricerca di nuovi processi produttivi, più economici ed a più alto rendimento, continua incessantemente [1].

Prospettive innovative sono state aperte dall'emergere del fotovoltaico organico (organic photovoltaics - OPV) all'inizio del nuovo millennio, grazie all'ideazione

dell'architettura cosiddetta a "bulk heterojunction", in cui un polimero semiconduttore avente la funzione di assorbire la luce e foto-ossidarsi ed un derivato fullerico in grado di accettare gli elettroni foto-prodotti sono combinati in un composito costituente lo strato foto-attivo. Da questo tipo di celle solari è stato possibile ottenere PCE massime intorno al 13% e tempi di vita superiori alle 5.000 ore su dispositivi non incapsulati [2]. Nello stesso tempo, la combinazione di materiali organici e inorganici, ha consentito lo sviluppo di strutture alternative, definite da ora in poi come fotovoltaico ibrido (hybrid photovoltaics - HPV) [3]. Le tecnologie OPV e HPV fanno parte del fotovoltaico cosiddetto di terza generazione.

Nel contesto dell'HPV possiamo distinguere due soluzioni che richiamano un maggiore interesse da parte della comunità scientifica, in quanto potenzialmente in grado di combinare buone/alte PCE a costi di produzione contenuti, essendo costituite da materiali largamente disponibili. Esse sono, rispettivamente, le celle solari a colorante (dye sensitized solar cells - DSSC), dette anche di Grätzel [4] dal nome dell'inventore, Michael Grätzel dell'École Polytechnique Fédérale de Lausanne, e le celle solari a perovskite (perovskite solar cells - PSC). Questi dispositivi sono basati su una specie principale, in grado di assorbire la luce e generare eccitoni che si dissociano in cariche elettriche libere (buche ed elettroni), che, nel caso delle DSSC,



è costituita da un colorante (inizialmente per lo più complessi di rutenio, sostituiti oggi da coloranti “metal-free”, meno stabili ed efficienti, ma meno tossici e costosi), mentre nelle PSC è un materiale ibrido (organico-inorganico) policristallino. Le PSC sono emerse all’attenzione della comunità scientifica solo recentemente (2009 [5]) e in pochi anni hanno assunto un ruolo chiave nel fotovoltaico di terza generazione, con molti nuovi lavori scientifici prodotti ogni giorno in tutto il mondo e PCE quasi prossime al silicio (record attuale certificato al 22,1%). Le perovskiti usate nelle prime PSC erano prodotte mescolando ioduro di piombo e ioduro di metilammonio (per ottenere  $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ); sono evolute poi in analoghi alogenuri misti di piombo contenenti la formamidina protonata, insieme al metilammonio, come secondo catione, in grado di innalzare ulteriormente la PCE dei dispositivi solari e oggi sono per lo più interamente inorganiche (alogenuri di piombo e cesio), intrinsecamente più stabili. Al tempo stesso si sta cercando (con grandi sforzi, benché ad oggi i risultati siano ancora poco promettenti) di sostituire il piombo con altri metalli, quali lo stagno bivalente e combinazioni di cationi monovalenti e trivalenti (al momento solo indio-bismuto e indio-antimonio) [6].

Il materiale assorbitore di luce costituisce lo strato attivo di questi dispositivi, affiancato da altri strati ancillari, in grado di raccogliere le cariche positive e negative foto-generate e di condurle ai rispettivi elettrodi collettori, per dar luogo ad una corrente elettrica. Questi strati sono costituiti da materiali in grado di trasportare buche (hole transporting materials - HTM) e materiali in grado di trasportare elettroni (normalmente si usa la terminologia “electron transporting layers” - ETL). Il ruolo di questi materiali è spesso fondamentale nel determinare la performance finale dei dispositivi ed è soprattutto in questi strati che giocano un ruolo determinante le nanostrutture di carbonio (carbon nanostructures - CNS). Tra queste, ci riferiamo in particolare ai fullereni ( $\text{C}_{60}$  e  $\text{C}_{70}$ ), che hanno avuto un’importanza chiave già nello sviluppo dell’OPV, i nanotubi di carbonio a parete singola e multipla (single/multi walled carbon nanotubes - SWCNT/MWCNT), i materiali di tipo grafenico (graphene-based materials - GBM) ed i nanoconi di carbonio (carbon nanohorns - CNH). Per maggiori dettagli sulle strut-

ture e proprietà delle CNS rimandiamo ad un nostro precedente articolo apparso su questo stesso giornale nel 2017 [7]. Qui ci preme solo brevemente ricordare che questi nanomateriali sono di considerevole interesse a causa delle loro elevate conducibilità elettriche e termiche, della loro resistenza meccanica e dell’alto rapporto superficie/volume che li caratterizza. Allo stesso tempo però, a causa delle forti interazioni di tipo van der Waals tra nuvole elettroniche  $\pi$ , le CNS hanno una forte tendenza ad auto-aggregare, riducendo così l’area totale potenzialmente esposta all’interazione con altri materiali e/o mezzi e inficiando parzialmente le proprietà caratteristiche della singola unità isolata. L’auto-aggregazione è senza dubbio un ostacolo quando si vuole procedere con la deposizione di questi nanomateriali da soluzione o si vogliono mescolare con polimeri e altre specie per ottenere compositi. Per questo, spesso si ricorre alla funzionalizzazione organica delle CNS, che può essere covalente o non-covalente, a seconda delle esigenze. Per il caso specifico (ma non per questo poco rilevante a livello applicativo) dell’utilizzo della funzionalizzazione per la preparazione di compositi polimerici contenenti CNS, rimandiamo il lettore ad una nostra review apparsa nel 2016 su *EurJOC* [8]. Allo stesso tempo, la funzionalizzazione può anche avere lo scopo di conferire alle CNS nuove proprietà o funzioni: per questo è stato coniato il termine “functional nanocarbon hybrids” da Eder e collaboratori, per indicare quelle specie costituite da CNS sulla cui superficie è stato ancorato uno strato sottile di un altro materiale o composto con funzioni attive [9]. Le proprietà delle CNS suscitano indubbiamente interesse per l’impiego in applicazioni HPV. Per esempio, CNT e GBM sono stati spesso considerati valide soluzioni per sostituire componenti di elettrodi a base di metalli o di ossidi metallici. Essi possono essere prodotti infatti in forma di film sottili, trasparenti e flessibili, il che potrebbe consentire di ridurre i costi di produzione e di ottenere dispositivi più leggeri e adattabili a diverse superfici (di enorme interesse soprattutto nell’ambito dei dispositivi elettronici indossabili o dei sensori). La letteratura sull’uso di CNS per la sostituzione di altri materiali comunemente utilizzati come elettrodi è estremamente vasta e non verrà trattata in questo articolo.

D'altro canto, grande attenzione è rivolta anche all'incorporazione delle CNS all'interno degli strati ancillari dei dispositivi, quali HTM ed ETL. In questo contesto, l'effetto positivo delle CNS può essere svolto sia a livello di interfacce sia all'interno degli strati HTM/ETL. La loro presenza può migliorare la conducibilità elettrica, consentendo un migliore trasporto delle cariche foto-generate verso il circuito esterno, oppure può consentire una più efficiente estrazione delle cariche all'interfaccia tra lo strato foto-attivo e l'HTM o ETL (entrambi i fenomeni possono coesistere, migliorando le prestazioni generali del dispositivo). Inoltre, la presenza delle CNS può significativamente aumentare la stabilità dei dispositivi all'azione degli agenti atmosferici.

Un esempio dei vantaggi offerti dall'implementazione di CNS in un HTM usato per le PSC è riportato in un nostro lavoro del 2016, nell'ambito di una proficua collaborazione con il gruppo di ricerca guidato da Aldo Di Carlo presso il "Center for Hybrid and Organic Solar Energy" dell'Università di Roma Tor Vergata e con Francesco Bonaccorso e collaboratori presso i "Graphene Labs" dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) a Genova [10]. In quell'occasione abbiamo voluto studiare l'effetto dell'incorporazione di SWCNT di tipo HiPco e di ossido di grafene ridotto (reduced graphene oxide - RGO) all'interno di un polimero semiconduttore comunemente utilizzato come HTM, il poli(3-esiltiofene) [poly(3-hexylthiophene) - P3HT].

Per garantire una dispersione omogenea delle CNS all'interno della matrice di P3HT e minimizzare la formazione di aggregati, abbiamo adottato una doppia strategia, basata sulla funzionalizzazione covalente delle CNS con gruppi *p*-metossifenilici (per ottenere i derivati SWCNT-PhOMe e RGO-PhOMe) e sulla successiva sedimentazione e separazione degli aggregati residui nelle soluzioni miste di polimero e CNS. La Fig. 1 riassume il processo di preparazione dei due HTM compositi SWCNT-PhOMe/P3HT e RGO-PhOMe/P3HT.

Da queste miscele primarie abbiamo poi ottenuto, mediante diluizione con la soluzione madre di solo P3HT, compositi con diverse percentuali di CNS in peso rispetto al polimero, in un intervallo compreso tra 1 e 3% per SWCNT, e tra 1 e 4% per RGO (caratterizzato da una maggiore disperdibilità). Questo ci ha permesso di determinare le composizioni ottimali di tali HTM compositi per il funzionamento delle PSC. In particolare abbiamo osservato che, nel caso dei SWCNT, la percentuale migliore non è quella più alta (3%) ma quella intermedia (2%). Questo è verosimilmente dovuto al fatto che i CNT, come è noto, possono generare corto-circuiti locali (e, di conseguenza, indesiderate ricombinazioni di carica), se usati in quantità superiori ad una data soglia. Tale soglia varia in funzione delle condizioni che si verificano caso per caso. Al contrario, per i compositi RGO/P3HT i risultati migliori si sono avuti con la concentrazione

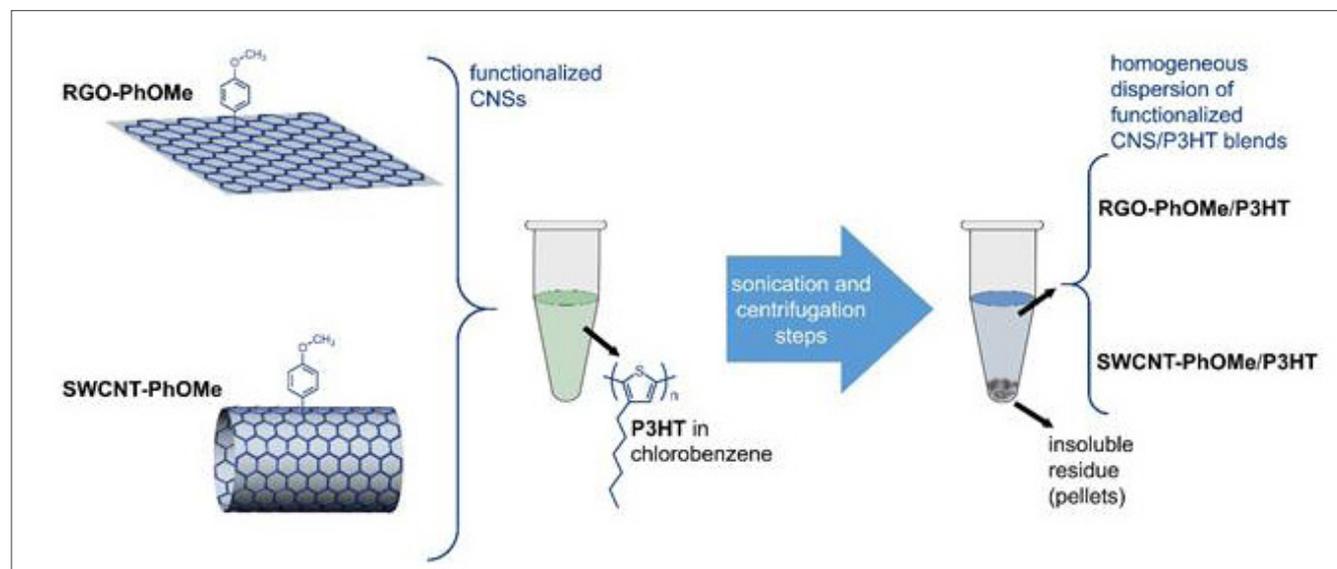


Fig. 1 - Preparazione di HTM compositi per PSC a base di CNS funzionalizzate e P3HT (adattato del rif. [10] con il permesso di John Wiley and Sons)

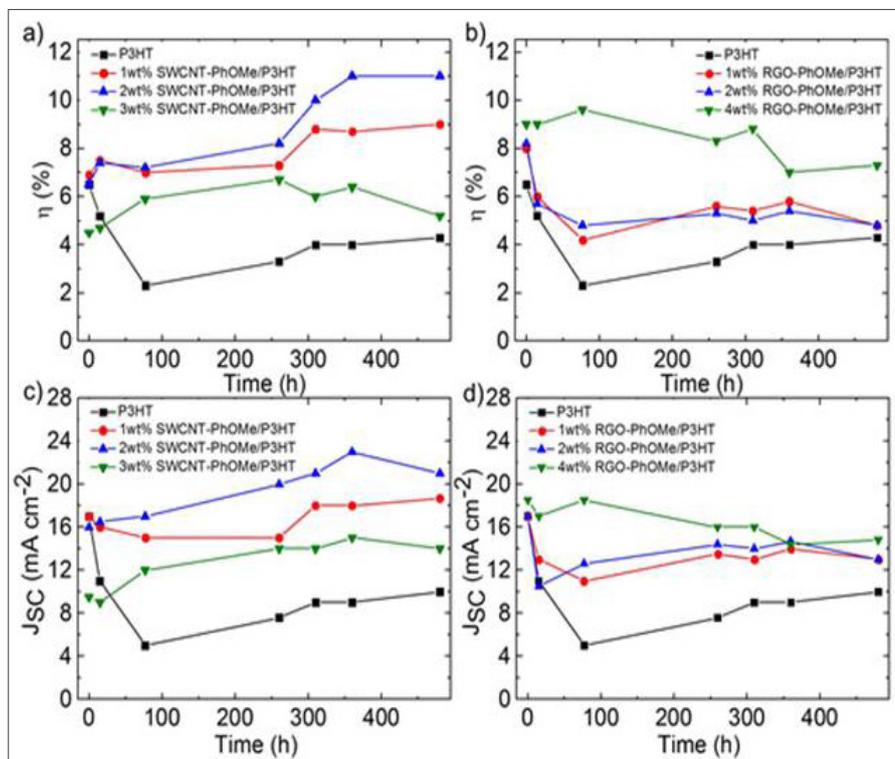


Fig. 2 - Test di durata effettuati su PSC contenenti HTM composti CNS/P3HT (adattato dal rif. [10] con il permesso di John Wiley and Sons)

di CNS più alta (4%). La Fig. 2 riporta i test di durata effettuati sui dispositivi contenenti i diversi HTM su un intervallo di tempo pari a 480 ore.

Come si nota, le PCE (definita dal simbolo  $\eta$  in questo caso), è in generale maggiore nel caso dei composti CNS/P3HT rispetto al solo P3HT, con un andamento quasi costante nel tempo per il dispositivo contenente il 4% di RGO e persino crescente nel caso del dispositivo contenente il 2% di SWCNT. Per quest'ultimo HTM, un test di durata spinto oltre i 4 mesi ha addirittura dimostrato che è possibile mantenere una PCE residua intorno al 9%, risultato che appare estremamente promettente per una futura commercializzazione delle PSC. Come si nota dai grafici c) e d) in Fig. 2, la PCE ha un andamento simile alla corrente estratta dai dispositivi ( $J_{sc}$  = short-circuit current), dimostrando come l'azione benefica esercitata dalle CNS sia legata alla loro capacità di favorire il trasporto delle cariche elettriche.

L'interesse per HTM composti a base di P3HT è in particolare alimentato dalla possibilità di utilizzarli come valida alternativa a quello che oggi è quasi considerato il benchmark degli HTM, una molecola molto

costosa (intorno ai 300 €/g) chiamata Spiro-OMeTAD [per esteso, 2,2',7,7'-tetrakis-(N,N-di-4-metossifenilammino)-9,9'-spirobifluorene]. Le celle a base di Spiro-OMeTAD manifestano inoltre problemi di instabilità e scarsa riproducibilità, anche a causa del processo di drogaggio (solitamente con *tert*-butilpiridina e un sale di litio) necessario per favorire il trasporto di buche. In questo contesto abbiamo recentemente dimostrato, in collaborazione con il "Center for Nano Science and Technology" dell'IIT a Milano (gruppo di ricerca di Annamaria Petrozza) e con il "Zernike Institute of Advanced Materials" della Rijksuniversiteit di Groningen (gruppo di ricerca di Maria Antonietta Loi), come l'utilizzo di un HTM composito a base di P3HT contenente un RGO opportunamente funzionalizzato,

sia in grado di fornire dispositivi con performance altamente riproducibili, in netto contrasto con quelli ottenuti utilizzando Spiro-OMeTAD [11]. La potenzialità di questo particolare HTM di tipo P3HT/RGO per un futuro utilizzo in dispositivi ad area maggiore (quindi prossimi alla scala industriale) è emerso dallo screening di una serie di HTM analoghi, in cui è stato variato il tipo di funzionalizzazione organica apportata all'RGO con lo scopo di migliorarne le interazioni intermolecolari con P3HT. Specificatamente, il composito in questione contiene un tipo di RGO recante sostituenti 4-(esilossi)fenilici (RGO-PhOHex), che ne consentono un'ottimale dispersione nella matrice polimerica (verosimilmente tramite interazioni idrofobiche con le analoghe catene esiliche sul P3HT), guidando allo stesso tempo la formazione di film altamente omogenei, tramite i quali ha luogo una più efficiente estrazione di carica dallo strato di perovskite sottostante. L'aspetto morfologico dell'HTM è qui realmente la chiave per interpretare i risultati ottenuti dai test elettrici sulle PSC, come si evince dal confronto con un derivato di RGO con sostituenti 4-[(2-2'-bittiofene)-5-il]fenilici (RGO-PhBiTh), in presenza del

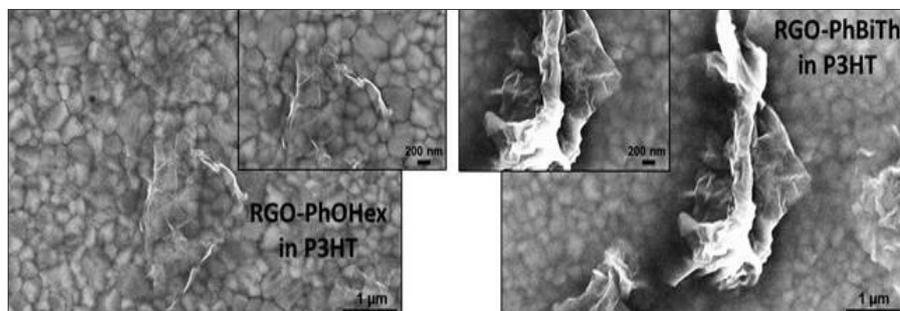


Fig. 3 - Analisi morfologica tramite microscopia elettronica a scansione degli HTM composti a base di P3HT contenenti foglietti di RGO funzionalizzati con sostituenti 4-(esilossi) fenilici (immagine a sinistra con ingrandimento) e sostituenti 4-[(2-2'-bitiofene)-5-il]fenilici (immagine a destra). Sullo sfondo si nota la tipica struttura granulare della perovskite (immagini adattate dal rif. [11] con il permesso di John Wiley and Sons)

quale la PCE delle celle peggiora, soprattutto a causa di un abbassamento della  $J_{SC}$ . Infatti, da immagini SEM raccolte dall'alto sui due tipi di HTM composti depositati sullo strato di perovskite (Fig. 3) è possibile notare che i singoli foglietti di RGO-PhOHex si dispongono piatti all'interno del film sottile di P3HT, mentre RGO-PhBiTh è costituito da foglietti "accartocciati" su se stessi, che fuoriescono marcatamente dallo strato di polimero. Il notevole corrugamento di RGO-PhBiTh è attribuibile alla formazione di interazioni  $\pi$  intramolecolari tra residui bifenilici e zone della superficie di RGO dove la funzionalizzazione è meno densa. La presenza di questi oggetti di dimensioni nano/micrometriche, verosimilmente caratterizzati da una buona conducibilità elettrica, dà origine a cortocircuiti locali e ricombinazioni di carica a livello dell'interfaccia HTM/perovskite, che causano nel complesso una diminuzione della corrente totale estratta dai dispositivi. Di recente abbiamo avuto modo di verificare le potenzialità dei GBM nel migliorare anche la stabilità delle DSSC, oltre che delle PSC. In particolare, ci siamo concentrati su un loro possibile utilizzo in sinergia con i coloranti generalmente impiegati come foto-sensibilizzatori per i fotoanodi a base di biossido di titanio delle DSSC. In collaborazione con il gruppo di ricerca di Alessandro Abbotto dell'Università di Milano Bicocca, abbiamo progettato la sin-

tesi di un nuovo materiale ibrido a base di RGO e di un colorante organico appartenente alla nuova generazione di coloranti "metal-free" già menzionata [12]. Nei derivati sintetizzati (Fig. 4, RGO-TPA-Th-H) le molecole organiche sono legate covalentemente alla superficie di RGO e presentano funzionalità carbossiliche libere di tipo ciano-acetico, per l'ancoraggio alla superficie delle nanoparticelle di biossido di titanio.

La struttura del colorante, del tipo "push-pull" o "donor- $\pi$ -acceptor", è costituita da un componente donatore di elettroni (la parte triarilamminica), un ponte  $\pi$  (il tiofene centrale) ed un componente accettore di elettroni (la funzionalità ciano-acetica). Questi coloranti sono estremamente versatili e, tramite opportune modifiche della struttura molecolare, è possibile modularne lo spettro di assorbimento e la solubilità. In questo lavoro abbiamo voluto usare una struttura semplice come modello iniziale, ma le prospettive aperte da questa prima dimostrazione d'utilizzo sono molteplici. Test di confronto effettuati su DSSC modello hanno infatti evidenziato che il composito grafene-colorante organico si ancora al fotoanodo di biossido di titanio molto più stabilmente rispetto al colorante libero TPA-Th-H (Fig. 4), mentre le prestazioni fotovoltaiche sono pressoché comparabili [12, 13].

La stabilità di ancoraggio è emersa quando si è tentato di desorbire il foto-sensibilizzatore ibrido dal fotoanodo di biossido di titanio per una determinazione

quantitativa: mentre per il colorante modello è sufficiente l'azione di un opportuno solvente organico a caldo, per il composito colorante-RGO non è stato possibile ottenere il totale desorbimento nemmeno mantenendo il fotoanodo in una miscela di idrossido di sodio 1 M in dimetilformamide a

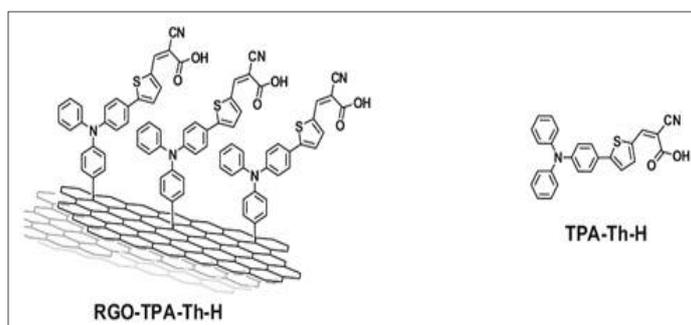


Fig. 4 - Rappresentazione schematica della struttura dei nuovi foto-sensibilizzatori composti a base di RGO e coloranti organici "metal-free" per DSSC (a sinistra) e del colorante standard di riferimento (a destra) (immagine adattata dal rif. [12] con il permesso di Elsevier)

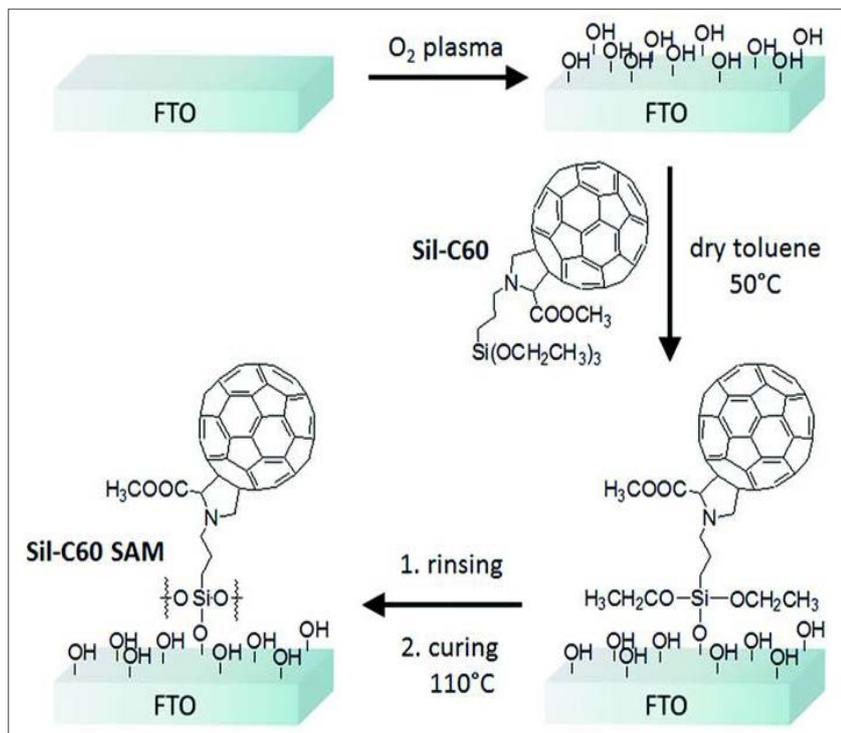


Fig. 5 - Processo di fabbricazione del mono-strato fullerenerico (SilC60-SAM) su FTO, che prevede l'attivazione con plasma a ossigeno della superficie dell'elettrodo trasparente, seguita da reazione con la componente trietossilano del derivato fullerenerico e da un successivo step di "curing" termico (immagine riprodotta dal rif. [15] con il permesso della Royal Society of Chemistry)

caldo per 7 giorni. L'interesse per questi materiali ibridi molto stabili in ambienti idrolitici è perciò considerevole, soprattutto se si pensa ad applicazioni quali la scissione fotocatalitica dell'acqua per produrre idrogeno, ed è proprio in questa direzione che ci stiamo muovendo adesso, portando avanti la collaborazione con il gruppo di Alessandro Abbotto.

Tornando alle PSC, ci siamo anche concentrati sullo sviluppo di nuovi ETL basati su CNS, come alternativa al biossido di titanio tradizionalmente usato. Quest'ultimo materiale presenta alcuni svantaggi legati alla sua preparazione (che richiede un passaggio di sinterizzazione a temperature sopra i  $500^\circ C$  ed è perciò poco conveniente dal punto di vista industriale) ed alla sua stabilità all'esposizione prolungata a radiazione UV. In questo progetto ci sono venuti in soccorso i fullereni: queste molecole infatti, dopo una lunga ed onorata "carriera" come accettori di elettroni per OPV (oggi giorno insidiata dalla crescente attenzione rivolta ai cosiddetti accettori "non-fullerenici"), stanno ultimamente assumendo un ruolo chiave anche nelle PSC. A questo proposito, per chi fosse interessa-

to ad approfondire il tema dell'avvento dei fullereni nelle PSC, suggeriamo la lettura di una nostra recente review [14]. Qui sottolineiamo solo l'ineguagliata (almeno per il momento) abilità dei fullereni nel ridurre l'isteresi elettrica in questi dispositivi, apparentemente dovuta alla capacità di bloccare la migrazione ionica agendo a livello dei difetti presenti sulla superficie dei cristalli di perovskite, insieme all'efficienza nell'estrarre e trasportare gli elettroni foto-generati, pari ad altri ETL di uso comune.

Le potenzialità dei fullereni come ETL nelle PSC si scontrano tuttavia con alcune problematiche di applicazione nel caso dei dispositivi ad architettura cosiddetta "diretta", in cui l'ETL è posto sotto lo strato di perovskite e sopra l'elettrodo trasparente. Questa architettura è di fatto quella che garantisce le migliori performance (rispetto all'alternativa, detta "inversa"), però richiede che lo strato di perovskite ven-

ga processato da soluzione direttamente sull'ETL. Per questo, uno strato ETL formato da semplice  $C_{60}$  o dalla sua alternativa più solubile, il PCBM (l'estere metilico dell'acido fenil- $C_{61}$ -butirrico), presenta problemi di compatibilità con i solventi da cui viene successivamente depositata la perovskite, in quanto questi possono dissolvere parzialmente gli strati sottostanti. Per questa ragione è necessario individuare strategie che garantiscono la formazione di strati fullerenerici stabili all'azione dei solventi. Una possibile soluzione è quella di ricorrere a derivati del  $C_{60}$  che siano facilmente processabili (quindi di per sé solubili in solventi organici basso-medio bollenti), ma che possano essere successivamente convertiti in un materiale insolubile, ad esempio mediante trattamento termico o chimico, o irraggiamento con luce di opportuna frequenza. L'approccio "cross-linking", per esempio, è stato largamente utilizzato [14]. Noi abbiamo proposto una strategia leggermente diversa, che prevede l'utilizzo di un derivato fullerenerico dotato di una funzionalità trietossisilano, in grado di reagire con superfici di tipo vetroso, formando mono-strati. Con questo de-

rivato abbiamo quindi funzionalizzato direttamente l'elettrodo trasparente conduttivo, a base di ossido di stagno drogato con fluoro (fluorine-doped tin oxide, FTO), ottenendo un mono-strato fullerenico spesso circa 1,5 nm [15]. Abbiamo dimostrato che si tratta effettivamente di un mono-strato combinando misure di impedenza a calcoli DFT, come è riportato in Fig. 5. Abbiamo quindi utilizzato questo mono-strato come ETL, depositandovi sopra la perovskite e completando il dispositivo con un HTM e un elettrodo d'oro. I dati statistici ottenuti su un consistente numero di dispositivi hanno rivelato come questo singolo strato di molecole fullereniche sia in grado di fornire PCE migliori rispetto ad un ETL spesso 20 nm di C<sub>60</sub> pristino o ad uno strato di biossido di titanio compatto di circa 100 nm. Allo stesso tempo, l'isteresi elettrica è quasi completamente annullata e la resistenza all'esposizione a radiazione UV ottima (rispetto al biossido di titanio). L'approccio da noi proposto presenta il vantaggio di utilizzare una quantità minima di materiale che, sebbene richieda una sintesi in due passaggi, evita trattamenti a temperature estremamente elevate e viene depositato con una procedura alquanto semplice ed adattabile su larga scala. Tutto questo lo rende estremamente appetibile dal punto di vista industriale.

## Conclusioni

Con questo articolo ci siamo proposti di fornire una panoramica sulle molte opportunità offerte dall'utilizzo di CNS in dispositivi fotovoltaici ibridi di ultima generazione, per migliorarne non solo le prestazioni assolute, ma anche, e soprattutto, la scalabilità e la stabilità, e inoltre per ridurre i costi di produzione, soppiantando componenti molto costosi, a base di metalli rari. Abbiamo tratto esempi concreti dai nostri personali contributi a questo settore di ricerca, in cui abbiamo esplorato più di una problematica dell'HPV e agito sui diversi componenti dei dispositivi. Come è evidente, ci siamo largamente affidati alla funzionalizzazione chimica delle CNS come strumento chiave per migliorarne la processabilità e per conferire loro proprietà aggiuntive ottimizzate per le specifiche applicazioni. Crediamo che la trasformazione chimica di questi materiali sia un requisito essenziale per consentirne un rapido ingresso nel mercato dell'optoelettronica a basso costo, con un ruolo di primo piano.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Per approfondimenti in merito consigliamo di visitare il sito web del National Renewable Energy Laboratory (NREL) americano, un'autorità in tema di energie rinnovabili: <https://www.nrel.gov/pv>
- [2] C.J. Brabec, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 2004, **83**, 273.
- [3] P. Müller-Buschbaum *et al.*, *Adv. Energy Mater.*, 2017, **7**, 1700248.
- [4] B. O'Regan, M. Grätzel, *Nature*, 1991, **353**, 737.
- [5] A. Kojima *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 6050.
- [6] A. Abate, *Joule*, 2017, **1**, 659.
- [7] T. Gatti *et al.*, *La Chimica e l'Industria Online*, 2017, **99**(3), 28.
- [8] T. Gatti *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2016, 1071.
- [9] C.J. Shearer, A. Cherevan, D. Eder, *Adv. Mater.*, 2014, **26**(15), 2295.
- [10] T. Gatti *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, 2016, **26**, 7443.
- [11] T. Gatti *et al.*, *Solar RLL*, 2018, **2**, 1800013.
- [12] T. Gatti *et al.*, *Carbon*, 2017, **115**, 746.
- [13] P. Guarracino *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 27716.
- [14] T. Gatti *et al.*, *Nano Energy*, 2017, **41**, 84.
- [15] P. Topolovsek *et al.*, *J. Mater. Chem. A*, 2017, **5**, 11882.

### Use of Carbon Nanostructures in Third-Generation Hybrid Photovoltaics

The scope of this article is to provide the reader with a general view of the advantages resulting from the use of carbon nanostructures in last-generation hybrid photovoltaic devices (dye-sensitized and perovskite solar cells). These nanomaterials offer indeed interesting perspectives to improve long-term stability, to ensure implementation on large areas and to lower production costs of these technologies, allowing their next commercialization.



**A BUON  
IMPRENDITOR  
POCHE  
PAROLE.**

**CHIARO  
e TONDO**

**FCA PRESENTA CHIARO E TONDO: LO SCONTO SEMPRE GARANTITO PER LIBERI PROFESSIONISTI CON PARTITA IVA. E SE SEI UN'AZIENDA FINO A 1.000€ DI EXTRA BONUS PER IL RINNOVO DEL TUO PARCO AUTO.**

**Chiaro e Tondo** è lo sconto trasparente a cui hai diritto per l'acquisto di un'auto dei brand Alfa Romeo, Jeep, Fiat, Lancia e Abarth. Ad esempio, su Fiat Tipo 5Porte lo sconto è di **5.400€** sul prezzo di listino (con il contributo dei concessionari). E se sei un'azienda hai un **extra bonus di 500€**. Scarica subito il voucher su [scontochiaroetondo.it](http://scontochiaroetondo.it) e portalo in concessionaria. Offerta valida per immatricolazioni entro il **30 giugno** e su vetture in pronta consegna.

**FCA**  
FIAT CHRYSLER AUTOMOBILES



Jeep





DOMENICA TONELLI  
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA INDUSTRIALE "TOSO MONTANARI"  
 UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
 DOMENICA.TONELLI@UNIBO.IT

# NANOMATERIALI PER LO SVILUPPO DI SENSORI ELETTROCHIMICI

*Vengono descritti alcuni sensori elettrochimici, fabbricati nel Dipartimento di Chimica Industriale dell'Università di Bologna, al fine di evidenziare le potenzialità delle nanotecnologie in campo sensoristico. La tecnica usata per la modifica dei substrati conduttori è la deposizione elettrochimica. In particolare, i nanomateriali sfruttati per lo sviluppo dei sensori sono polimeri conduttori o a stampa molecolare, nanoparticelle di argento ed un composito a base di nanotubi di carbonio e ossido di grafene. Le applicazioni riportate riguardano il settore alimentare.*

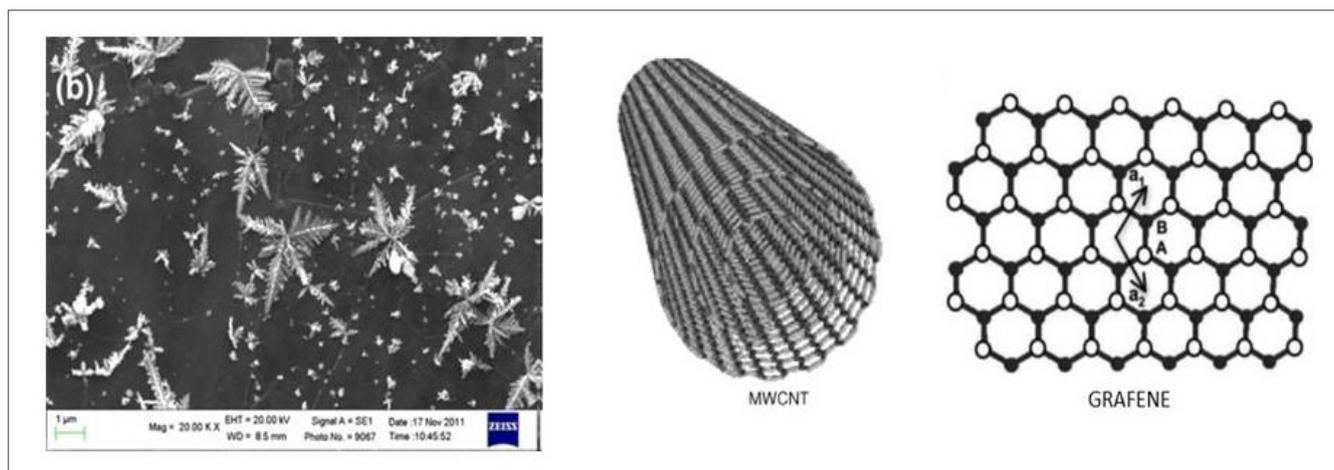


Fig. 1 - Dendriti di nanoparticelle di Ag elettrosintetizzate su fogli di grafite e nanomateriali a base di C

Nell'ultimo decennio le nanotecnologie hanno rappresentato uno degli approcci più all'avanguardia nel settore della chimica analitica ed in particolare per il "sensing" [1]. I nanomateriali hanno componenti strutturali con almeno una dimensione nell'intervallo 1-100 nm. Vengono solitamente classificati come 0D, 1D 2D, a seconda che tutte le dimensioni, oppure due o una sola siano nanometriche. Per esempio le nanoparticelle appartengono ai materiali 0D, le nanofibre o nanotubi, dove la lunghezza non è nanometrica, sono esempi di materiali 1D, i nanofilm, dove solo lo spessore cade nell'intervallo 1-100 nm, appartengono ai nanomateriali 2D. Spesso alle dimensioni nanometriche si associano

proprietà chimiche, ottiche, magnetiche, termiche ed elettroniche diverse da quelle manifestate dallo stesso materiale con dimensioni maggiori, cioè dal materiale "bulk", che possono essere sfruttate per costruire (bio)sensori con prestazioni superiori, soprattutto di tipo elettrochimico [2].

I metodi elettroanalitici hanno caratteristiche peculiari legate alla semplicità operativa, al basso costo, all'accuratezza e riproducibilità, all'alta sensibilità dei dispositivi per la determinazione di specie redox attive ed alla possibilità di essere facilmente miniaturizzati. Inoltre sono a disposizione molte tecniche che prevedono sia il passaggio che l'assenza di corrente; il che aumenta no-

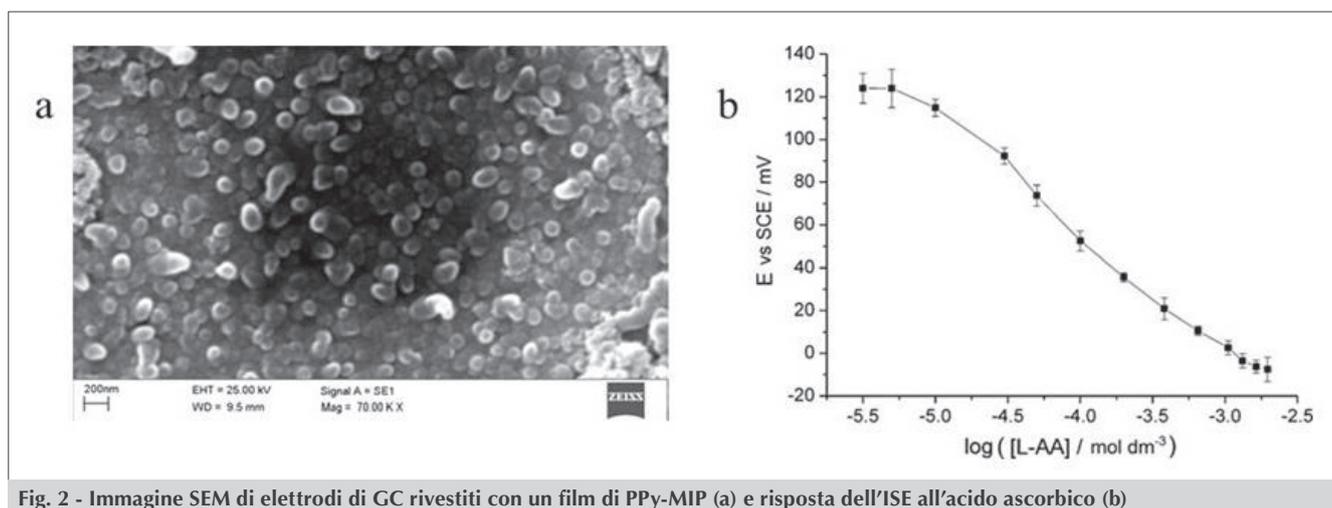


Fig. 2 - Immagine SEM di elettrodi di GC rivestiti con un film di PPy-MIP (a) e risposta dell'ISE all'acido ascorbico (b)

tevolmente le potenzialità dei sensori elettrochimici. L'ottimizzazione della risposta dipende essenzialmente dalla scelta del materiale elettrodico e, specificamente, dalla dimensione e dalla morfologia dello stesso, soprattutto quanto si impiegano tecniche a potenziale controllato. Uno degli inconvenienti di queste tecniche risiede nella scarsa selettività nei confronti degli analiti, legata essenzialmente alle sovratensioni da applicare all'elettrodo perché decorra efficacemente la reazione redox. Questo problema è stato in gran parte superato utilizzando gli elettrodi chimicamente modificati (CME) [3]. La modifica del materiale, che costituisce l'elettrodo di lavoro, genera un sensore con nuove ed interessanti proprietà, che ne migliorano notevolmente le prestazioni. Per esempio il modificante limita l'accesso all'elettrodo di sostanze interferenti, migliorando la selettività nei confronti delle molecole target, è in grado di ancorare biomolecole, può agire da sistema di preconcentrazione e presentare un'elevata area superficiale, il che conduce ad una maggiore sensibilità, può agire da mediatore redox per l'analita, può ridurre gli effetti di avvelenamento dovuto agli intermedi e/o prodotti della reazione elettrodica [4, 5].

Facendo riferimento alle nanoparticelle (NP) metalliche, sono state sviluppate, negli ultimi vent'anni, numerose tecniche di sintesi, sia fisiche che chimiche, capaci di produrre NP di dimensione, forma e composizione diverse. L'approccio fisico include tecniche come l'ablazione con il laser [6], la litogra-

fia e l'irraggiamento ad alta energia [7]. L'approccio chimico si basa essenzialmente su reazioni di riduzione, condotte con opportuni reagenti, o per via elettrochimica o fotocatalitica [8-10]. Parecchi studi hanno dimostrato che durante il processo di sintesi, la morfologia, la dimensione, la stabilità e le proprietà fisico-chimiche delle NP sono influenzate da molti fattori, che includono sia parametri cinetici che termodinamici [11]. Alla sintesi chimica possono essere associati problemi di tossicità derivanti dall'utilizzo di reagenti pericolosi, come solventi organici, agenti riducenti e stabilizzanti, che servono per prevenire l'agglomerazione delle NP [12].

I film di nanoparticelle per applicazioni sensoristiche richiedono lo sviluppo di tecniche di deposizione controllate. Gli approcci elettrochimici sono spesso riportati come metodi elettivi per produrre le nanostrutture o il nanopatterning della superficie elettrodica, perché risultano semplici e a basso costo. Inoltre, quando il film modificante è prodotto per via elettrochimica, esso risulta molto più stabile perché l'adesione delle NP al materiale conduttore è nettamente superiore [13].

In questo articolo vengono descritti alcuni sensori elettrochimici che sfruttano elettrodi modificati con nanomateriali di diversa natura, al fine di ottenere migliori prestazioni in termini di selettività o di sensibilità. Gli esempi riportati sono stati applicati essenzialmente al settore alimentare, anche se possono trovare impiego in ambiti ambientale e biomedico.

## Determinazione di acido ascorbico con MIP

L'acido L-ascorbico (AA) è coinvolto in processi biochimici di notevole rilevanza. È una vitamina idrosolubile e termolabile che non può essere sintetizzata dagli esseri umani, quindi deve essere introdotta con la dieta. L'AA riveste un ruolo importante nel corpo come scavenger di radicali liberi e questa attività è fondamentale nella prevenzione di malattie come il cancro o il morbo di Parkinson. Esso è contenuto in quantità rilevante in molti frutti e verdure e viene, molto spesso, aggiunto intenzionalmente a molti cibi, bibite e prodotti farmaceutici, come agente antiossidante. L'ossidazione diretta di AA agli elettrodi convenzionali di Au, Pt o carbone vetroso (GC) non è facile da realizzare a causa dell'avvelenamento del materiale elettrodico, provocato dai prodotti di ossidazione, il che comporta un trasferimento elettronico lento ed una scarsa riproducibilità nella misura quantitativa [14, 15].

Nel laboratorio di analitica è stato sviluppato un sensore potenziometrico per la misura accurata di AA in succhi di frutta, basato su un elettrodo di GC modificato con un film di polipirrolo (PPy) nanometrico, a stampo molecolare (MIP). La Fig. 2a mostra un'immagine ottenuta al microscopio elettronico (SEM) dell'elettrodo modificato con il film di PPy parzialmente sovraossidato, in cui si nota il ricoprimento uniforme e le nanostrutture con morfologia granulata.

Il lavoro, pubblicato nel 2011, descrive per la prima volta l'utilizzo di un elettrodo ione-elettivo basato su un MIP per la determinazione dell'AA in forma di monoanione, in quanto le misure sono state condotte in soluzione di tampone fosfato a pH=5,5 ( $pK_{a1}=4,1$ ).

Fino al momento della pubblicazione dell'articolo, il PPy e il PPy sovraossidato erano stati usati solo come rilevatori potenziometrici, in cromatografia ionica, per la determinazione, rispettivamente, di anioni e cationi [16]. Il fatto di usare un nanopolimero a stampo molecolare consente di incrementare le prestazioni in termini di selettività. Per ottenere un film di PPy ben adeso al GC, il polimero è stato depositato per via elettrochimica, applicando un potenziale anodico ad una soluzione di monomero 50 mM e di AA 20 mM.

Il responso allo ione ascorbato è molto più alto quando si usa il polimero a stampo molecolare ri-

spetto al polimero normale, anch'esso elettrosintetizzato nelle stesse condizioni, ma in assenza della molecola di AA, cioè della molecola stampo. Ciò conferma che il processo di "imprinting molecolare" crea un nano-ambiente per il riconoscimento dello ione ascorbato, grazie alla presenza di specifici siti di interazione molecolare all'interfaccia membrana polimerica/elettrolita, dove si verifica il processo reversibile di scambio ionico tra l'ascorbato e lo ione drogante il polimero conduttore.

Nella Fig. 2b è riportata una curva di risposta dell'ISE per l'ascorbato: la pendenza del tratto lineare è in accordo con il valore previsto per uno ione monovalente, la linearità della risposta si estende per circa 3 decenni ( $5 \times 10^{-6}$  -  $2 \times 10^{-3}$  M) e il limite minimo di rivelazione risulta 3  $\mu$ M.

La selettività dell'elettrodo ISE è stata valutata seguendo le indicazioni IUPAC [17], prendendo in considerazione i seguenti anioni: solfato, cloruro, bicarbonato, nitrato, acetato, ossalato, tartrato, citrato e acetilacetilato. I risultati ottenuti hanno confermato che l'ISE presenta una notevole selettività nei confronti dello ione ascorbato.

## Sensori per la misura dei radicali OH

Tra i radicali liberi sono molto importanti i ROS (reactive oxygen species), prodotti da tutti gli esseri viventi che utilizzano l'ossigeno per il loro metabolismo. Quando la produzione dei ROS non è più bilanciata dalla capacità dei sistemi biologici di detossificare gli intermedi reattivi o di riparare i danni che ne risultano, non si è più in condizioni di omeostasi, quindi si verifica lo stress ossidativo delle cellule. Questa condizione può indurre l'insorgenza di molte malattie, quali l'ischemia, i morbi di Parkinson e Alzheimer e la carcinogenesi. Tra i ROS i radicali OH sono tra i più reattivi e pericolosi. Di conseguenza la loro rapida e selettiva determinazione è fondamentale in biomedicina.

La determinazione diretta dei radicali OH è molto difficile perché hanno un tempo di vita cortissimo ( $10^{-10}$  s). In genere si determinano facendoli reagire con una molecola sonda, che poi viene sottoposta ad un processo di separazione dai composti in soluzione, ed infine determinata con tecniche strumentali sofisticate, di tipo cromatografico o elettroforetico [18].

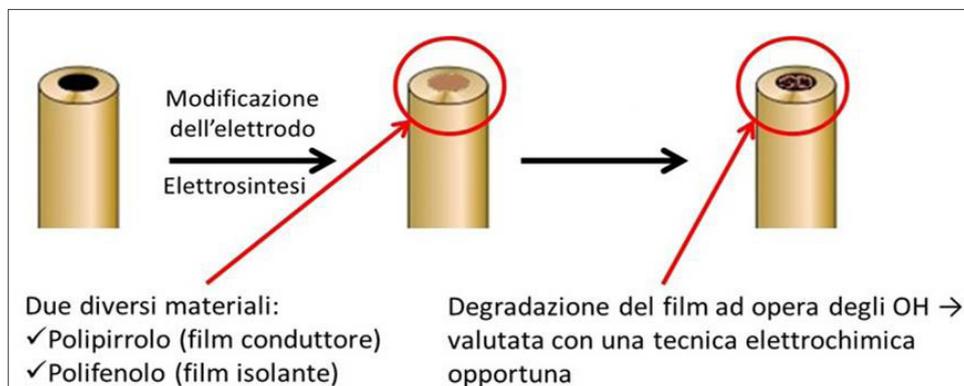


Fig. 3 - Schema dell'approccio usato per la determinazione dei radicali OH, che sfrutta l'attacco di un film nanometrico di polimero conduttore o isolante, elettrosintetizzato su un elettrodo di GC

Abbiamo messo a punto due sensori elettrochimici basati su elettrodi di GC modificati, tramite elettrodeposizione, con film nanometrici di un polimero conduttore (polipirrolo) [19] o isolante (polifenolo) [20], che sfruttano il seguente approccio. Generando nella soluzione, dove l'elettrodo è immerso, i radicali OH, tramite fotolisi dell'acqua ossigenata o tramite la reazione di Fenton, si verifica l'attacco al film polimerico e ciò ne provoca una degradazione. La valutazione dell'entità della degradazione con una tecnica elettroanalitica, una volta che l'elettrodo viene estratto dalla soluzione in cui si è avuta la generazione degli OH, permette la loro quantificazione senza alcuna procedura separativa, in quanto il film modificante agisce da son-

da per i radicali (Fig. 3). Tra i polimeri conduttori il PPy è usato molto frequentemente, grazie al fatto che possiede alta conducibilità elettrica ed alta stabilità in aria ed in mezzi acquosi. La sua conducibilità può essere incrementata attraverso un processo di ossidazione con reagenti chimici o per via elettrochimica. Il processo (doping) inietta cariche positive nello scheletro

del polimero, mentre piccoli anioni vengono incorporati tra le catene per mantenere l'elettroneutralità. Se l'azione ossidante è troppo forte, si creano gruppi carbossilati; la presenza di cariche negative sul polimero genera un materiale sovraossidato, che tende ad escludere le specie anioniche. Ciò ha come conseguenza la diminuzione dell'elettroattività e della conducibilità del polipirrolo. I radicali OH sono in grado di provocare il fenomeno della sovraossidazione.

Il sensore basato sul GC modificato con il film nanometrico di PPy (spessore medio  $\pm$  SD:  $9,5 \pm 0,9$  nm) è stato messo a punto per verificare se il grado di sovraossidazione, misurato tramite la diminuzione della carica associata al processo di "doping",

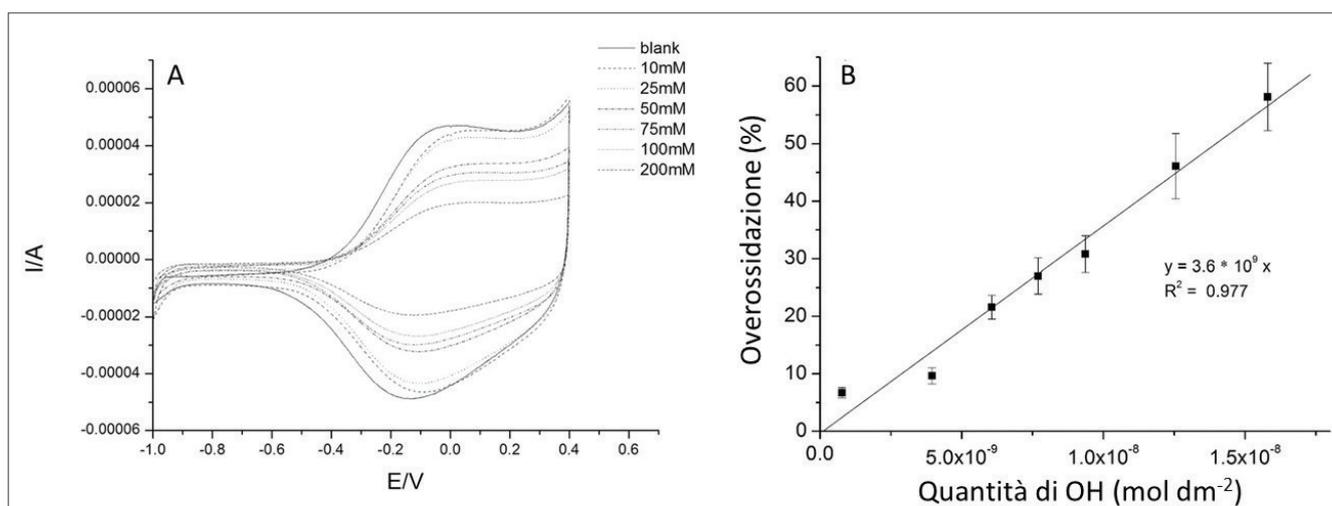


Fig. 4 - Voltammogrammi ciclici, registrati alla velocità di scansione di  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$  in  $\text{LiClO}_4$   $0,1 \text{ M}$ , acquoso contenente  $\text{HClO}_4$   $0,01 \text{ M}$ , ad un elettrodo di PPy-GC dopo 5 min di attacco da parte di concentrazioni crescenti di radicali OH ( $[\text{Fe}^{2+}] = 0,05 \text{ M}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  vedi legenda) (A); sovraossidazione (%), vs la quantità di radicali OH che raggiunge l'elettrodo (B)

fosse proporzionale alla quantità di radicali OH che raggiungono la superficie dell'elettrodo.

In Fig. 4A si riportano le voltammetrie cicliche registrate per un CME immerso per 5 minuti in soluzioni contenenti varie concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ovviamente la produzione di radicali OH cresce con la concentrazione di acqua ossigenata e ciò viene evidenziato dalla maggiore percentuale di sovraossidazione del polimero (diminuzione del segnale analitico). La Fig. 4B mostra la percentuale di sovraossidazione del film nanometrico di PPy in funzione della quantità totale di radicali OH che raggiunge l'elettrodo. Il trend è lineare ed il limite di rivelazione risulta  $3 \times 10^{-10}$  mol dm<sup>-2</sup>.

Il sensore presenta una buona riproducibilità di risposta e un'ottima selettività nei confronti di altri radicali, quali quello derivante da 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-acido solfonico) ABTS<sup>+</sup>, il superossido e gli alchilperossidi. Il film potrebbe essere attaccato solo da fortissimi ossidanti come lo ione permanganato che, fortunatamente, non sono presenti nei campioni reali.

Il sensore può essere utilizzato per la valutazione della capacità antiossidante di campioni alimentari, espressa sulla base dell'abilità di "scavenging" dei radicali OH. In confronto ad altri sensori riportati in letteratura, ha il vantaggio di non richiedere alcuna molecola sonda per la valutazione dell'attacco al film polimerico ed alcun reagente costoso o pericoloso per la sua fabbricazione. Inoltre la modifica della superficie elettrodica è molto veloce, perciò potrebbe essere sfruttato per lo sviluppo di un kit per la rivelazione rapida di radicali OH.

Nel campo alimentare, gli antiossidanti (AO) vengono definiti come quei composti che, se presenti a basse concentrazioni rispetto a substrati ossidabili, sono in grado di inibire o ritardare in modo significativo la loro ossidazione [21].

La loro azione nel corpo umano protegge dall'attacco dei radicali liberi e rallenta il progredire di molte malattie croniche legate all'invecchiamento. È stata infatti trovata una proporzionalità inversa tra l'assunzione di frutta e vegetali e la mortalità dovuta alle malattie legate all'invecchiamento, e questo risultato è stato attribuito alla presenza degli AO in questi alimenti [22]. Allo scopo di quantificare la capacità antiossidante di molti componenti pre-

senti negli alimenti, sono stati proposti nel tempo molti saggi, quali DPPH, ABTS e ORAC, per citarne solo alcuni [23]. I sensori sopra descritti sono stati impiegati per valutare la capacità antiossidante di molti composti e di succhi di frutta. Inoltre i dati risultanti sono stati confrontati con quelli ottenuti con i metodi standard sopra citati, dimostrando una correlazione con il metodo ORAC [24]. Si conclude che i sensori basati sui film nanometrici di polimeri conduttori o isolanti possono essere usati con successo per la valutazione degli intake di antiossidanti.

### Biosensori per la determinazione di polifenoli

I polifenoli abbondano nel regno vegetale. Le loro proprietà antiossidanti si traducono per l'uomo nell'azione di contrasto ai radicali liberi, a tutto vantaggio della prevenzione dell'invecchiamento precoce e delle malattie degenerative. Negli ultimi anni la letteratura ha riportato esempi di biosensori elettrochimici, basati su ossidasi, in cui i supporti sono stati modificati con nanomateriali a base di carbonio (ad esempio, nanotubi, CNT, e grafene, G, vedi Fig. 1) al fine di favorire il trasferimento elettronico tra il centro attivo del biocatalizzatore e l'elettrodo [25, 26].

In un recente lavoro abbiamo investigato le prestazioni di due biosensori a base di laccasi e tirosinasi, che sono stati supportati su elettrodi di GC modificati con un composito costituito da grafene ossido (GO) e nanotubi di C a parete multipla (MWCNT), per la valutazione dei polifenoli [27].

Entrambi gli enzimi sono cupro-ossidasi, perché la loro attività è dovuta alla presenza di ioni rame nei centri attivi. Prima dell'applicazione del film enzimatico gli elettrodi di GC, modificati per drop-casting con il nanocomposito, sono stati sottoposti ad una riduzione elettrochimica (10 cicli di voltammetria ciclica, tra 0 e -1,3 V vs SCE), allo scopo di ridurre il GO, ottenendo così un materiale ridotto (ERGO) con caratteristiche di conducibilità elettrica simili a quelle del grafene. Questo tipo di riduzione rappresenta un metodo "green" poiché evita l'uso di reagenti riducenti pericolosi, come l'idrazina.

La scelta di partire dal GO e non direttamente dal grafene è legata al basso costo, alla disponibilità commerciale ed alla stabilità delle sospensioni

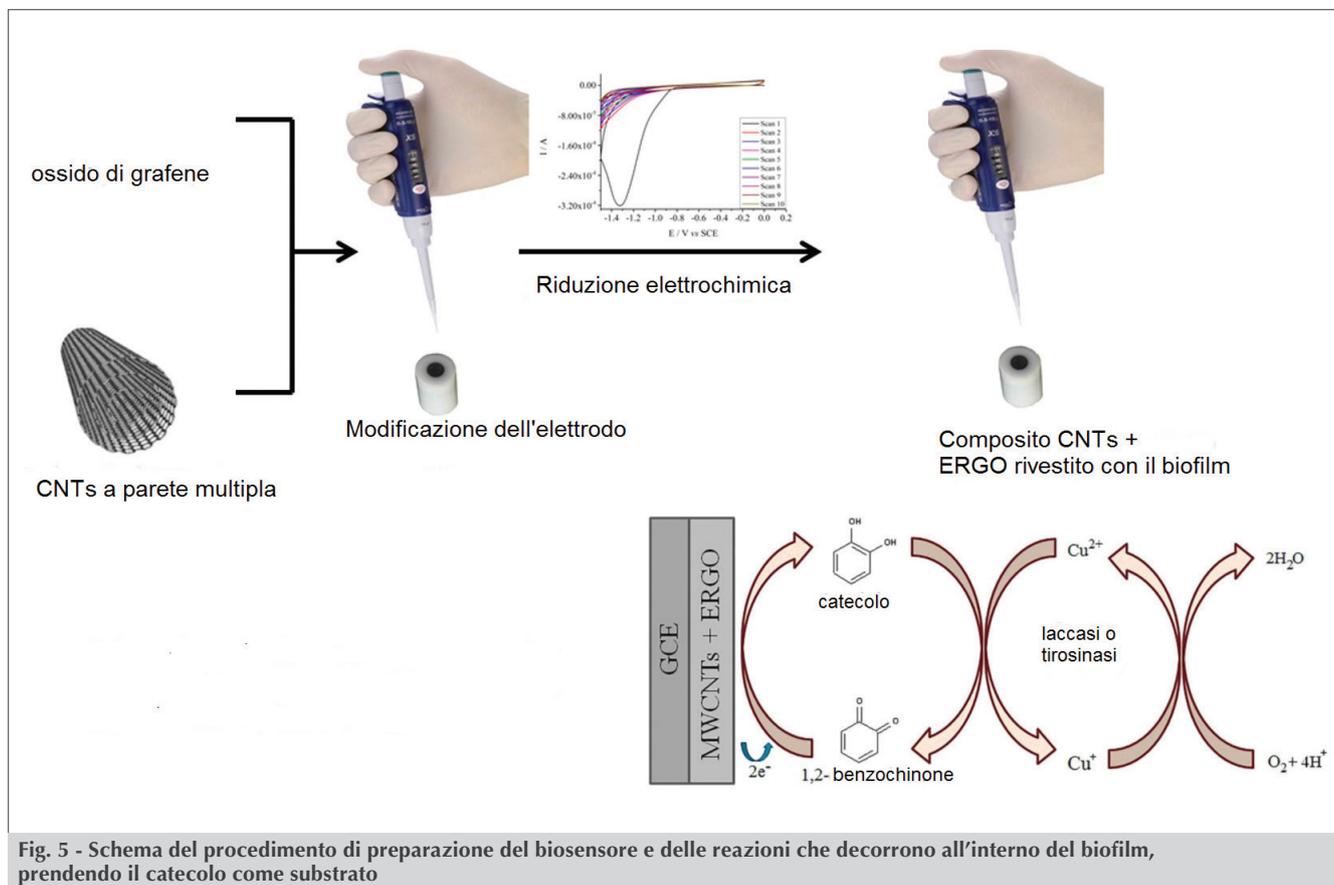


Fig. 5 - Schema del procedimento di preparazione del biosensore e delle reazioni che decorrono all'interno del biofilm, prendendo il catecolo come substrato

acquose. Gli enzimi sono stati applicati sul nanocomposito per drop casting e particolare attenzione è stata dedicata alla scelta della membrana di immobilizzazione, che deve evitare il rilascio del biomateriale durante l'utilizzo del biosensore in soluzione (Fig. 5).

Per l'enzima tirosinasi, il sistema ottimale di immobilizzazione è risultato il chitosano, mentre per la laccasi la membrana a base di albumina di siero bovino reticolata con glutaraldeide. Gli enzimi tirosinasi e laccasi sono stati supportati utilizzando, per la prima volta, un composito a base di MWCNT e ERGO, sfruttando così sia l'aumentata area superficiale, sia il trasferimento elettronico più veloce tra il chinone, prodotto enzimaticamente, e l'elettrodo modificato sottostante (meccanismo di funzionamento descritto in Fig. 5). Infatti i due biosensori sono di tipo amperometrico, perché si registra la corrente di riduzione che passa all'elettrodo, applicando un opportuno potenziale, in presenza di polifenoli. La scelta dell'ibrido dei due nanomateriali,

per la modifica del GC, deriva da uno studio approfondito, condotto preliminarmente, per valutare le prestazioni dei singoli nanomateriali di C o di entrambi con diverse configurazioni [28].

I biosensori sono stati impiegati per la determinazione del catecolo e di altri polifenoli, precisamente: pirogallolo, epicatechina, acido gallico, acido 1,2-di-idrossibenzoico, acido caffeico, acido clorogenico, rutina, catechina e dopamina. Inoltre la loro applicabilità è stata dimostrata quantificando il contenuto di polifenoli, espresso come equivalenti di epicatechina, in succhi di frutta che contenevano quantità variabili di composti antiossidanti. L'unico pretrattamento applicato ai campioni analizzati consisteva nella loro centrifugazione ed opportuna diluizione in tampone. I risultanti valori di polifenoli erano in buon accordo con le quantità determinate con metodi analitici standardizzati. Le prestazioni del biosensore a base di laccasi sono risultate nettamente superiori a quelle del biosensore a base di tirosinasi, soprattutto in termini di tempo di vita

(più di un mese se mantenuto in tampone acetato, pH 4,50 a 4 °C, contro due giorni). Questo risultato non è sorprendente perché è noto che la tirosinasi è un enzima molto instabile [29].

Si è tentato anche di stabilire una correlazione tra la capacità antiossidante dei succhi analizzati ed il contenuto di polifenoli. I dati ottenuti erano in linea con quelli riferibili al metodo standard ABTS [24], quando i succhi non contenevano vitamina C o carotenoidi, perché, in questo caso, la capacità antiossidante è fortemente legata alla presenza di tali composti. Perciò il biosensore a base di laccasi potrebbe essere utilizzato di routine per la determinazione dei polifenoli totali in matrici alimentari, al fine di fare una stima della loro qualità nutrizionale.

## Determinazione di perossido di idrogeno

Anche l'acqua ossigenata,  $H_2O_2$ , appartiene ai ROS. È un coprodotto di molte reazioni di ossidazione ed è un intermedio essenziale nel settore tessile, cartario, alimentare, farmaceutico, clinico e in molti processi industriali. Recentemente, la sua rivelazione è diventata cruciale nelle celle a combustibile perché la sua velocità di riduzione influenza le prestazioni di questi dispositivi. Di conseguenza, assume particolare importanza la sua determinazione con un metodo semplice, rapido, sensibile e a basso costo. I metodi convenzionali di riduzione di  $H_2O_2$  si basano su titolazioni, spettrofotometria e chemiluminescenza, ma richiedono procedure sperimentali lente e grandi volumi di campione.

Questo analita si può determinare con tecniche amperometriche, se si riescono a superare i problemi connessi all'uso dei più comuni materiali elettrodici e, precisamente, gli alti potenziali da applicare, sia che venga rivelato in ossidazione o riduzione perché le cinetiche sono lente, e l'avvelenamento che si verifica sulla superficie del sensore, soprattutto se si opera in ossidazione [30]. Quando si usano elevate sovratensioni, la selettività dei metodi elettroanalitici diventa spesso insufficiente a causa delle reazioni redox che coinvolgono sostanze interferenti. Il problema può essere superato utilizzando biosensori, ma sfortunatamente essi manifestano parecchi inconvenienti, collegati alla limitata stabilità ed attività degli enzimi immobilizzati [31]. Nella prima decade degli anni Duemila,

la determinazione dell'acqua ossigenata è stata condotta usando CME modificati con materiali inorganici ed, in particolare, con NP metalliche [32]. Abbiamo proposto un sensore basato su fogli di grafite, modificati con strutture nanodendritiche di Ag, sintetizzate per elettrodeposizione (step di potenziale da + 1,00 a -0,40 V, vs SCE/ $KNO_3$ , per 10 s) da soluzioni contenenti gli ioni Ag [33]. Dapprima la sintesi delle nanostrutture di Ag è stata studiata in assenza di tensioattivi o agenti templanti, poi in presenza di sodio 1-nonansolfonato (NS) o di polivinilpirrolidone (PVP), e gli elettrodi sono stati testati al fine di valutare quale di essi manifestasse le migliori prestazioni nei confronti dell'elettroreduzione di  $H_2O_2$ .

Gli elettrodi fabbricati senza additivi o in presenza di NS mostravano prestazioni simili, mentre quelli ottenuti in presenza di PVP esibivano prestazioni decisamente peggiori, soprattutto in termini di sensibilità. I fogli flessibili di grafite, modificati con le tre procedure di elettrosintesi, sono stati caratterizzati con la microscopia elettronica (SEM) che ha rivelato la presenza di strutture dendritiche, quando la sintesi è condotta in assenza di additivi o in presenza di NS, di forma e dimensioni più o meno simili (Fig. 1). Al contrario, in presenza di PVP, si ottengono NP sferiche, di dimensioni inferiori. Questa morfologia è dovuta all'azione protettiva del PVP che promuove la nucleazione dell'argento ed impedisce l'aggregazione tra particelle, limitando così la formazione di dendriti. I nostri risultati suggeriscono che le strutture nanodendritiche mostrano un'attività elettrocatalitica superiore a quella degli aggregati sferici, evidenziando così un effetto, sulla risposta elettrochimica, della morfologia dei nanomateriali.

I migliori segnali sono stati ottenuti operando ad un potenziale di -0,4 V in tampone fosfato (pH 6,7) ed il sensore esibiva una risposta lineare all'acqua ossigenata da 0,1 a 3,5 mM, con un limite minimo di rivelazione pari a 20  $\mu$ M. Queste prestazioni sono nettamente migliori rispetto a quelle mostrate da sensori simili descritti in letteratura.

Gli esempi qui riportati, anche se riferibili solo ai sensori elettrochimici, rendono conto delle notevoli potenzialità di nanotecnologie in campo sensoristico.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **103**, 113.
- [2] J. Perez, L. Bax, C. Escolano. Roadmap Report on Nanoparticles, Willems & Van DenWildenberg, Barcelona, Spain, 2005.
- [3] R.W. Murray, A.G. Ewing, R.A. Durst, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 379.
- [4] X. Luo, A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth, *Electroanalysis*, 2006, **18**, 319.
- [5] S. Sharma, N. Singh, V. Tomar, R. Chandra, *Biosens. Bioelectron*, 2018, **107**, 76.
- [6] F. Mafune, J. Kohno, Y. Takeda, T.J. Kondow, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 9050.
- [7] G. Zhang, D.J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 5616.
- [8] S. Eustis, H.Y. Hsu, M.A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 4811.
- [9] L. Rodríguez-Sánchez, M.C. Blanco, M.A. Lopez-Quintela, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **104**, 9683.
- [10] A. Frattini, N. Pellegrini, D. Nicastro, O. de Sanctis, *Mater. Chem. Phys.*, 2005, **94**, 148.
- [11] L. Wang, X. Chen, J. Zhan, Y. Chai *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 3189.
- [12] J. Ai, E. Biazar, M. Jafarpour, M. Montazeri *et al.*, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 1117.
- [13] V.C. Sooryaa, S. Berchmans, *J. Electrochem. Soc.*, 2017, **164**, B435.
- [14] D. Tonelli, B. Ballarin, L. Guadagnini, A. Mignani, E. Scavetta, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 7149.
- [15] W. Sun, M. Yang, R. Gao, K. Jiao, *Electroanalysis*, 2007, **19**, 1597.
- [16] M. Sahin, L. Ozcan, B. Usta, Y. Sahin, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 3492.
- [17] Y. Umezawa, K. Umezawa, H. Sato, *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**, 507.
- [18] Y.-L. Hu, Y. Lu, G.-J. Zhou, X.-H. Xia, *Talanta* 2008, **74**, 760.
- [19] I. Gualandi, L. Guadagnini, S. Zappoli, D. Tonelli, *Electroanalysis*, 2014, **26**, 1544.
- [20] I. Gualandi, D. Tonelli, *Talanta*, 2013, **115**, 779.
- [21] B. Halliwell, M.A. Murcia, S. Chirico, O.I. Aruoma, *Crit. Rev. Food Sci.*, 1995, **35**, 7.
- [22] K. Ganesan, K.S. Kumar, P.V.S. Rao, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2011, **12**, 73.
- [23] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides *et al.*, *Analyst*, 2002, **127**, 183.
- [24] I. Gualandi, L. Ferraro, P. Matteucci, D. Tonelli, *Electroanalysis*, 2015, **27**, 1906.
- [25] D. Li, G. Li, P. Lv, N. Ullah, C. Wang *et al.*, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 30602.
- [26] Y. Liu, X. Qu, H. Guo, H. Chen *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 2195.
- [27] Y. Vlamidis, I. Gualandi, D. Tonelli, *J. Electroanal. Chem.*, 2017, **799**, 285.
- [28] V.V. Sharma, I. Gualandi, Y. Vlamidis, D. Tonelli, *Electrochim. Acta*, 2017, **246**, 415.
- [29] S. Lupu, C. Lete, P.C. Balaure *et al.*, *Sensors*, 2013, **13**, 6759.
- [30] J. Wang, X.-J. Chen, K.-M. Liao *et al.*, *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, **10**, 311.
- [31] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J.F. Hainfeld, I. Willner, *Science*, 2003, **299**, 1877.
- [32] F.W. Campbell, R.G. Compton, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 241.
- [33] L. Guadagnini, B. Ballarin, D. Tonelli, *J. Nanopart. Res.* 2013, **15**, 1971.

### Nanomaterials for the Development of Electrochemical Sensors

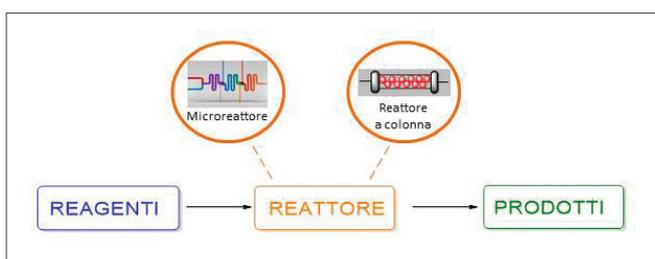
Some electrochemical sensors fabricated at the Department of Industrial Chemistry (University of Bologna) are described in order to highlight the potentialities of nanotechnologies in the field of sensing. Electrochemical deposition is the elective technique for the modification of conductive substrates. In particular, the nanomaterials exploited for the development of sensors are conductive or molecularly imprinted polymers, silver nanoparticles and a composite made of carbon nanotubes and reduced graphene oxide. The reported applications are related to the food field.



MARTINA LETIZIA CONTENTE<sup>A</sup>, LUCIA TAMBORINI<sup>B</sup>  
<sup>A</sup>SCHOOL OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF NOTTINGHAM (UK)  
<sup>B</sup>DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE (DISFARM)  
 UNIVERSITÀ DI MILANO  
 LUCIA.TAMBORINI@UNIMI.IT

# MICROREATTORI E BIOCATALISI: COME MINIMIZZARE IL DIVARIO TRA RICERCA ACCADEMICA E INDUSTRIA

*Negli ultimi due decenni, la tecnologia dei microreattori ha cambiato il paradigma nella sintesi organica sia su scala di laboratorio che di produzione e sta recentemente ricevendo sempre maggiore attenzione anche nel campo della biocatalisi. Grazie ai vantaggi dei microreattori, quali il rapido e accurato trasferimento di massa e di calore, i piccoli volumi di reazione e i brevi percorsi di diffusione, è possibile selezionare in modo più rapido ed economico i substrati e le condizioni di reazione e sviluppare dei metodi di immobilizzazione adeguati per l'uso di biocatalizzatori in continuo. Inoltre, la progettazione di processi biocatalizzati in continuo integrati con sistemi di analisi e purificazione consente di scalare le biotrasformazioni in modo più efficiente e riproducibile. Nel complesso, queste caratteristiche possono colmare il divario tra la ricerca accademica e l'uso su larga scala dei biocatalizzatori.*



La tecnologia della sintesi a flusso continuo (*flow chemistry*) si è dimostrata nel corso degli anni estremamente vantaggiosa in diversi processi chimici [1]. La miniaturizzazione è una caratteristica importante della *flow chemistry* e la disponibilità sul mercato di micro e mesoreattori è aumentata negli ultimi anni, sebbene possano essere assemblati anche semplicemente sfruttando parti di strumentazione per GC o LC. I microreattori sono spesso dispositivi a chip o reattori tubulari con diametro interno compreso tra 10  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$ , mentre reattori con canali di diametro superiore (da 500  $\mu\text{m}$  a pochi millimetri) vengono in genere classificati come mesoreattori [2-5]. Il capil-

lare o microcanale, in genere in vetro, plastica o metallo, rappresenta l'ambiente di reazione. I microreattori possiedono un rapporto area superficiale/volume (area specifica) elevato, compreso tra 5.000 e 50.000  $\text{m}^2/\text{m}^3$ , e questo consente che i trasferimenti di massa e di calore siano estremamente efficienti, il flusso sia laminare (**numero di Reynolds** basso), la miscelazione sia limitata alla diffusione, e che il controllo della temperatura sia rapido ed efficace. D'altra parte, le dimensioni ridotte dei capillari comportano alcune problematiche, in quanto il volume di produzione è limitato e possono verificarsi perdite di pressione e occlusione dei canali [6, 7]. Il blocco dei canali dovuto alla presenza di solidi, sia come prodotti di reazione che come materiali di partenza non solubilizzati, può essere ridotto al minimo mediante l'uso di ultrasuoni, che possono disperdere gli aggregati quando applicati in adeguati livelli di energia e frequenza, oppure aggiungendo un opportuno co-solvente [8, 9]. I mesoreattori hanno volumi nell'ordine di millilitri, possiedono aree specifiche tra 100 e 10.000  $\text{m}^2/\text{m}^3$  e





hanno una maggiore portata e minori cadute di pressione, sebbene presentino proprietà inferiori in termini di trasferimento di calore e di miscelazione rispetto ai microreattori.

Negli ultimi anni, l'industria ha cominciato ad investire nella tecnologia della sintesi a flusso continuo per diversi motivi, da ricollegarsi soprattutto all'aumento della sicurezza, a un migliore controllo dei parametri di processo, alla possibilità di integrare sistemi di analisi e di effettuare diversi passaggi sintetici in sequenza e al trasferimento più rapido e semplice da scala di laboratorio a scala industriale, sfruttando l'approccio del 'numbering up' (mettendo reattori in serie e/o in parallelo). Inoltre, la *flow chemistry* offre la possibilità di ridurre i tempi e i costi necessari per ottenere dati di base per lo sviluppo di un processo. Nel 2016, la Food and Drug Administration (FDA) ha

approvato per la prima volta il passaggio dal processo di produzione tradizionale in batch ad un processo continuo per il farmaco anti-HIV Prezista (darunavir) [10], incoraggiando i produttori a investire in processi in continuo innovativi ed efficienti che possano consentire una produzione più rapida, riproducibile ed ecosostenibile.

D'altra parte, negli ultimi cinquant'anni, i progressi negli studi dei fondamenti della biocatalisi e delle sue applicazioni in vari settori industriali [11, 12] hanno fatto emergere la biocatalisi come una tecnologia chiave per la chimica sostenibile ed è stata sfruttata in numerosi processi produttivi per l'ottenimento di prodotti farmaceutici, aromi, profumi, cosmetici e sostanze chimiche [13]. I biocatalizzatori, sia sotto forma di enzimi isolati che di cellule intere, sono estremamente interessanti per le loro proprietà come la stereo-

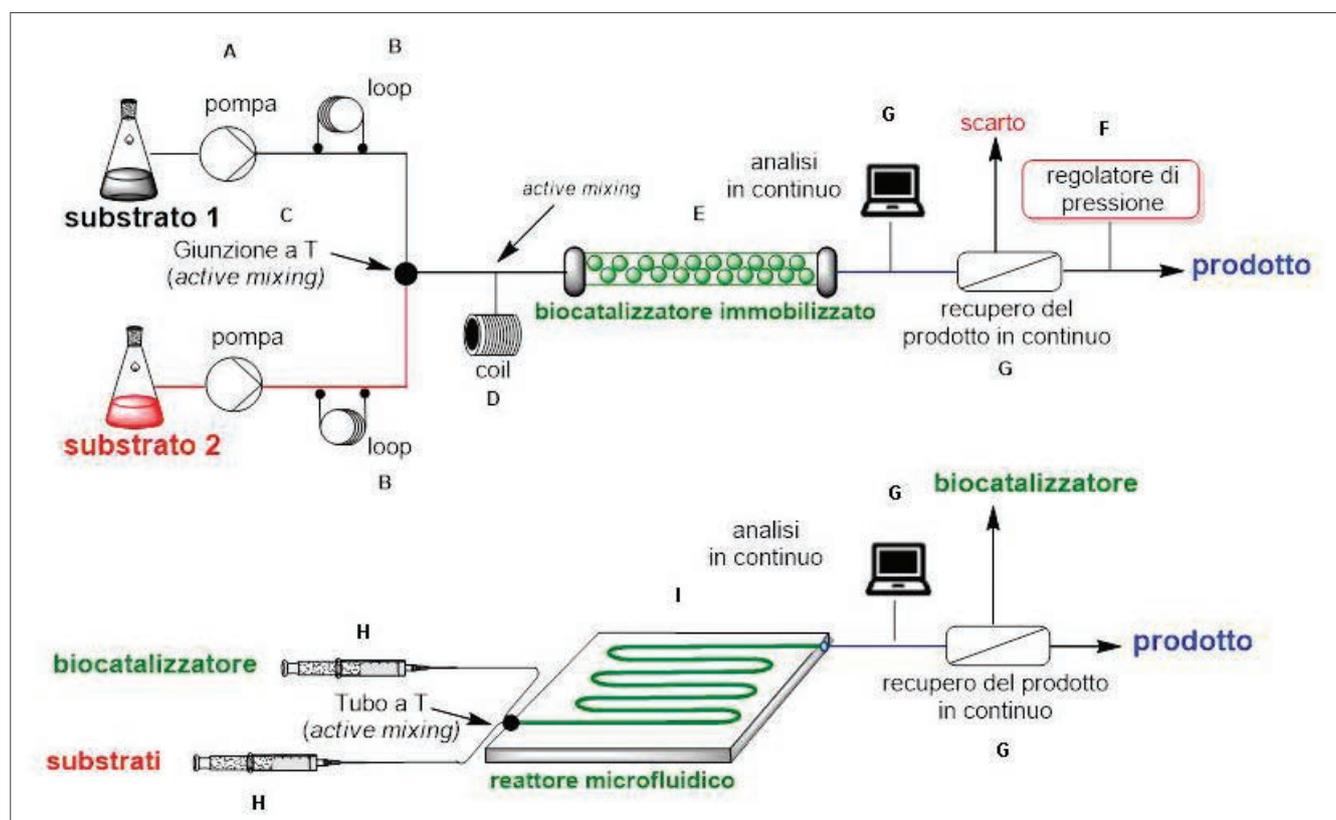


Fig. 1 - [17]: rappresentazione schematica dei principali componenti dei reattori di flusso. (A) Pompe: utilizzate per fornire quantità riproducibili di solventi e reagenti; i tipi più comuni sono pompe a pistoni, peristaltiche, a siringa. (B) Loop: utilizzati per introdurre piccoli volumi di reagenti. (C) Giunzione a T: punto di miscelazione primario, in cui i flussi di reagenti si uniscono (D) Coil: reattore che fornisce una miscelazione omogenea per la reazione. (E) Reattore a colonna: riempito con il biocatalizzatore immobilizzato. (F) Regolatore di pressione: controlla la pressione del sistema. (G) Unità a valle: analisi in linea, operazioni di purificazione, ecc. (H) Pompe a siringa. (I) reattori microfluidici

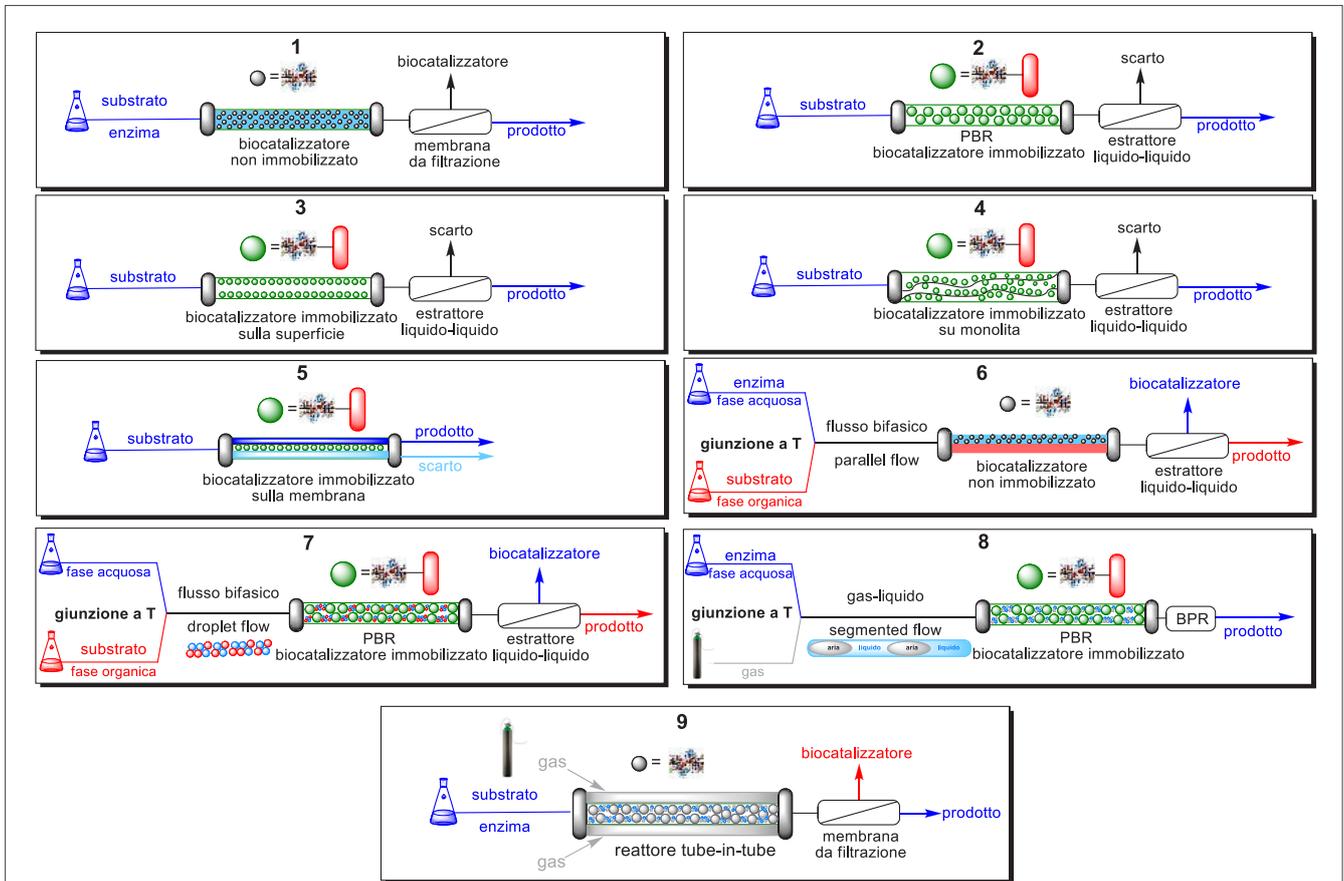


Fig. 2 - [17]: (1) Biocatalizzatore non immobilizzato. (2) Biocatalizzatore immobilizzato. (3) Biocatalizzatore immobilizzato sulla superficie interna del reattore. (4) Biocatalizzatore immobilizzato su monolita. (5) Biocatalizzatore immobilizzato su membrana. (6) Biocatalizzatore non immobilizzato in flusso bifasico (l/l). (7) Biocatalizzatore immobilizzato in flusso bifasico (l/l). (8) Biocatalizzatore immobilizzato in flusso bifasico (g/l). (9) Biocatalizzatore non immobilizzato in reattore tube-in-tube

regio-selettività, le condizioni di reazione blande, la biocompatibilità, e la biodegradabilità. L'introduzione di passaggi biocatalitici nella produzione industriale di prodotti farmaceutici, ad esempio pregabalin [14], il farmaco antidiabetico sitagliptina [15] e l'antivirale boceprevir [16], hanno mostrato un miglioramento significativo nelle prestazioni e nella sostenibilità dei processi produttivi, come risulta evidente da una riduzione del **fattore E** del 79,3% e del 63,1% nel caso, rispettivamente, di pregabalin e boceprevir. In realtà, nei processi biocatalizzati su scala industriale spesso emergono problematiche come la scarsa miscelazione e la presenza di "zone morte" che possono portare a basse conversioni. Questo, ovviamente, può anche avere un grave impatto sulle procedure di isolamento e purificazione del prodotto e sui costi operativi dei processi.

Nonostante l'importanza crescente sia della biocatalisi che della tecnologia della sintesi a flusso continuo, la loro combinazione per lo sviluppo sostenibile di nuovi processi non è ancora stata ampiamente valorizzata, sebbene negli ultimi anni stia ricevendo sempre più attenzione.

Possono essere usati come biocatalizzatori in reattori per *flow chemistry* sia enzimi isolati che cellule intere, in entrambi i casi sia in soluzione (fase omogenea) che immobilizzati (fase eterogenea) (Fig. 1).

Nel caso di reazioni in fase omogenea, il substrato e la soluzione contenente l'enzima vengono iniettati nel reattore e la reazione viene condotta in un flusso continuo di entrambi i reagenti (Fig. 2, configurazione 1). Di conseguenza, la soluzione in uscita contiene sia il prodotto che i substrati eventualmente non reagiti e il biocatalizzatore. Immobilizzando il biocatalizzatore





è possibile riutilizzarlo senza dover effettuare alcuna complicata procedura di isolamento e purificazione dalle miscele post-reazione ed è stato dimostrato, inoltre, che l'immobilizzazione degli enzimi può aumentare significativamente la loro stabilità [18,19]. Per i reattori con biocatalizzatori immobilizzati possono essere utilizzate diverse configurazioni:

- (i) biocatalizzatore immobilizzato su un supporto e impaccato in un reattore a colonna (Packed Bed Reactor, PBR, Fig. 2, configurazione 2). Le tecniche per l'immobilizzazione degli enzimi si sono evolute e ad oggi è disponibile una varietà di protocolli per l'immobilizzazione su supporti diversamente derivatizzati, dalla reticolazione con glutaraldeide all'attacco diretto del catalizzatore su resine epossidiche [20], all'uso innovativo di nano-particelle magnetiche [21-23];
- (ii) biocatalizzatore immobilizzato sulla superficie interna dei capillari (Fig. 2, configurazione 3) [24];
- (iii) biocatalizzatore immobilizzato su un monolita contenuto nel capillare (Fig. 2, configurazione 4) [8];
- (iv) biocatalizzatore immobilizzato su una membrana (Fig. 2, configurazione 5) [25].

Il flusso può essere monofasico o bifasico (segmentato); nel flusso segmentato sono presenti due fasi immiscibili che producono goccioline di soluzione separate (Fig. 2, configurazioni 6-9), in cui la superficie di contatto è elevata. Variando il flusso dei due liquidi, la dimensione e la periodicità dei segmenti possono essere modulate e controllate [26].

Utilizzando enzimi o cellule immobilizzati in micro o mesoreattori si riduce al minimo la perdita di biocatalizzatore, si ottiene una maggiore resa del prodotto per quantità di enzima utilizzato e una maggiore produttività. In primo luogo, questo è dovuto all'elevato valore del rapporto enzima-substrato che risulta da un elevato eccesso *in situ* di molecole di biocatalizzatore rispetto alla concentrazione del substrato e, in secondo luogo, all'alto valore del rapporto superficie-volume. Di conseguenza, anche la produzione su larga scala risulta economicamente più fattibile in apparecchiature significativamente più piccole con una sostanziale riduzione dei tempi di reazione, da ore a pochi minuti, e un miglioramento della resa spazio-temporale, con aumenti fino a 650 volte rispetto ai processi batch [27]. Complessivamente, queste caratteristiche si traducono in una riduzione degli scarti

e dei fabbisogni energetici del processo biocatalitico in continuo, rispetto alla modalità convenzionale in batch.

Il tempo di reazione ovvero il tempo di permanenza del substrato nel reattore può essere facilmente controllato e variato modificando il flusso. Questa peculiarità della sintesi a flusso continuo è particolarmente importante quando si formano prodotti instabili che devono essere rimossi rapidamente dall'ambiente di reazione o quando l'equilibrio della reazione è un fattore che determina la conversione. Il flusso in uscita può essere analizzato in tempo reale (ad esempio UV, LC, GC, spettroscopia di massa) ed inoltre possono essere integrate procedure per l'isolamento dei prodotti come estrazioni liquido-liquido, separazioni di fase ed evaporazione del solvente [28]. L'integrazione di sensori per monitorare condizioni di processo variabili (ad esempio, temperatura, pH, ossigeno disciolto) rappresenta un argomento di ricerca importante; i sensori ottici, in grado di operare in linea, sono particolarmente attraenti, data la loro natura non invasiva, non distruttiva e l'ingombro compatibile con i dispositivi microfluidici [29]. In reazioni in cui alcuni parametri, come l'ossigeno o il pH, possono cambiare, è preferibile un monitoraggio on-line, in quanto fornisce una misura diretta del progresso della reazione. Questa problematica è stata affrontata recentemente con successo da Gruber e collaboratori, che hanno utilizzato un sensore di pH ottico integrato in un microreattore per misurare il pH in più punti del capillare, valutando la progressione di una reazione catalizzata da una tirosin-chinasi (TK-) e una penicillina G acilasi attraverso la regolazione costante del pH nella reazione [30].

L'utilizzo di enzimi isolati sia immobilizzati (Immobilized Enzyme Reactors, IMERs) che liberi (Free Enzyme Reactors, FERs) è più comune poiché presenta indubbi vantaggi rispetto all'approccio con cellule intere [31, 32]. Per esempio, gli enzimi isolati non possiedono la parete cellulare, che rappresenta una barriera aggiuntiva tra substrato e catalizzatore e la cui integrità deve essere preservata, ed è inoltre trascurabile la possibilità che si verifichino reazioni collaterali. L'utilizzo di cellule intere è invece favorevole in quelle reazioni enzimatiche in cui è richiesto un cofattore in quanto può essere rigenerato *in situ* dal metabolismo nativo cellulare. Anche le cellule inte-

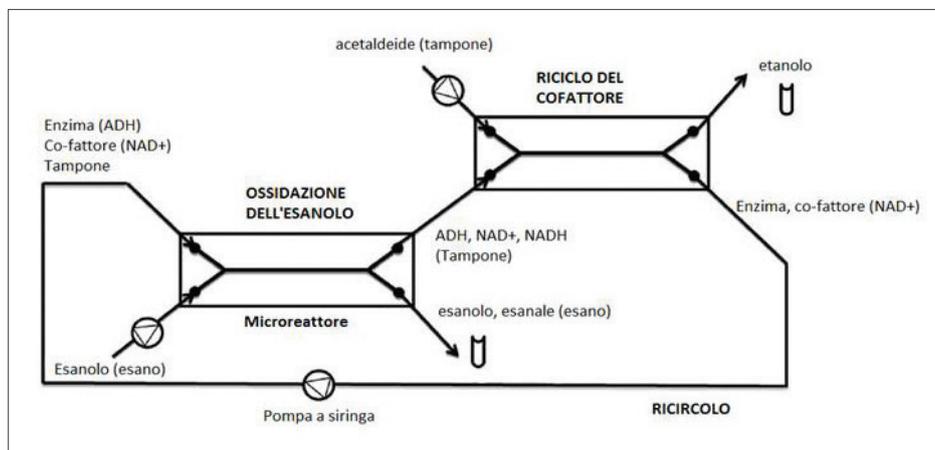


Fig. 3 - [37]: due microchip connessi in serie. L'ossidazione di esanolo avviene nel primo microreattore, la rigenerazione del cofattore nel secondo da cui parte un ricircolo di enzima e cofattore

re possono essere utilizzate in fase omogenea, o, per semplificare il riciclo del biocatalizzatore e le procedure di purificazione a valle, possono essere immobilizzate (Immobilized Whole Cells Reactors, IWCRs) [33]. Molte applicazioni con cellule intere immobilizzate riguardano cellule con attività idrolasica, in particolare nel settore della produzione di biodiesel [34]. In un'altra recente applicazione, il micelio di *Cladosporium cladosporioides* MUT 5506, un ceppo dotato di attività trans-fruttosilasica, è stato usato in sfere di alginato in un IWCR per produrre una nuova miscela di frutto-oligosaccaridi [35]. Cellule intere liofilizzate di *Aspergillus oryzae* sono state utilizzate in solvente organico in un PWCR per la risoluzione cinetica del flurbiprofene [36].

Un esempio molto interessante di enzimi isolati in microreattori (FER) è quello riportato da Šalić e Zelić [37] che riguarda una tra le più rilevanti classi enzi-

matiche, le ossidoreduttasi, in cui viene proposto un nuovo metodo per la produzione di esanale tramite ossidazione di esanolo usando un'aldeide deidrogenasi (ADH) da *Saccharomyces cerevisiae*. L'elevato rapporto superficie-volume, la rapida miscelazione, il migliore trasferimento di calore e quindi la riduzione di energia consumata, il buon controllo dei parametri di processo e l'utilizzo di minime quantità di reagenti (microlitri) sono alcuni dei vantaggi dei microreattori che per-

mettono una migliore produzione di esanale (>99% conversione molare) rispetto ai tradizionali metodi in batch. La rigenerazione di co-fattori, molecole molto costose, è necessaria per rendere il processo catalizzato dalle ossidoreduttasi appetibile dal punto di vista economico e maggiormente sostenibile. In questo caso, la rigenerazione del co-fattore NADH è catalizzata dallo stesso enzima della reazione principale, ma viene utilizzata acetaldeide come co-substrato in quanto poco costosa e facilmente riducibile da parte delle aldeidi deidrogenasi. Il prodotto derivato, l'etanolo, è benigno e facilmente rimovibile. L'ultima fase dello studio è stata focalizzata sullo sviluppo di un sistema integrato con due microreattori collegati in serie. Il primo chip è stato utilizzato per l'ossidazione di esanolo e il secondo per la rigenerazione del co-fattore (Fig. 3). Il NADH rigenerato è stato riutilizzato mediante ricircolo nel primo chip, dove la fase di

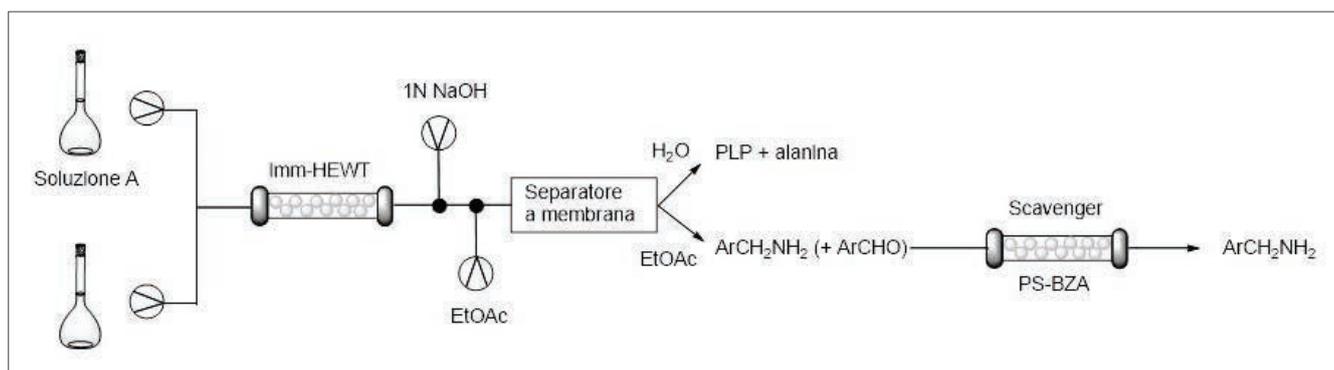


Fig. 4 - [38]: soluzione A: soluzione 20 mM ammino-accettore in tampone fosfato (50 mM, pH 8,0) contenente 0,1 mM PLP; soluzione B: soluzione 1 M L-alanina in tampone fosfato (50 mM, pH 8,0). T = 37 °C, P = atm



ossidazione è stata effettuata in continuo per tre giorni senza l'aggiunta di co-fattore fresco.

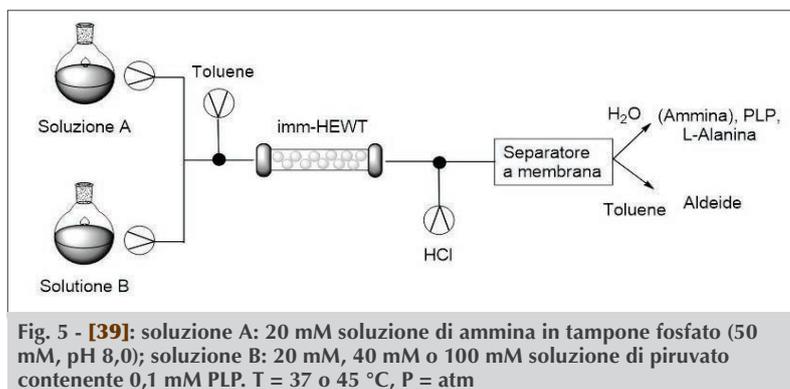
Nel 2017, per la prima volta, una transaminasi *S*-selettiva (HEWT), derivante dal batterio alo-adattato *Halomonas elongata* è stata utilizzata in flusso (IMER) risultando estremamente efficiente sia per la sintesi di ammine (Fig. 4) [38], che per la reazione opposta, vale a dire l'ossidazione di ammine aromatiche nei corrispondenti derivati carbonilici interessanti come aromi e fragranze (Fig. 5) [39]. L'amminotransferasi da *H. elongata*, precedentemente caratterizzata [40], è stata selezionata in quanto mostra una notevole stabilità che è stata ulteriormente incrementata mediante immobilizzazione su resine epossidiche. La strategia di immobilizzazione sfrutta il poly-His-tag fuso all'enzima per un'interazione selettiva con una resina epossidica precedentemente derivatizzata con un metallo bivalente, il cobalto(II) [41]. L'utilizzo di enzimi estremofili che tollerano differenti tipologie e concentrazioni di solventi ed un vasto range di temperatura e pH ha permesso la biotrasformazione di un'ampia gamma di substrati. Tali enzimi hanno permesso lo sviluppo di un'efficiente piattaforma biocatalitica per la bioproduzione di ammine e aldeidi in reattori a flusso continuo. In entrambi i casi i prodotti sono stati ottenuti con rese eccellenti (90-99%), con tempi di reazione brevissimi (1-15 minuti) rispetto ai metodi tradizionali, grazie all'elevata concentrazione di biocatalizzatore (5 mg/grammo di resina) disponibile all'interno del reattore a colonna utilizzato (PBR). Nella sintesi di ammine, il processo è stato successivamente implementato effettuando una basificazione seguita da un'estrazione con solvente organico e separazione di fase in linea (Fig. 4). Qualsiasi traccia di aldeide eventualmente non reagita, presente nella fase organica, è stata intrappolata da una

seconda colonna contenente benzilammina immobilizzata (PS-BZA). Questa strategia ha permesso il facile recupero delle ammine sintetizzate mediante evaporazione del solvente organico, semplificando e accelerando in modo significativo le procedure di *work-up*.

Per l'ossidazione di ammine nelle corrispondenti aldeidi in ambiente acquoso, l'uso di piruvato come ammino-accettore è risultato estremamente favorevole e il suo

prodotto di scarto, l'amminoacido naturale *L*-alanina, è completamente benigno e può essere facilmente recuperato rendendo il sistema ulteriormente eco-sostenibile. Sedici ammine diverse sono state ossidate rapidamente nelle corrispondenti aldeidi e, in tutti i casi, è stato osservato un incremento di produttività di almeno 4 volte, rispetto alle reazioni condotte in batch. Per evitare che alcuni prodotti venissero trattenuti dalla matrice polimerica del supporto, è stato sviluppato un sistema bifasico liquido/liquido, utilizzando toluene come solvente organico (Fig. 5). A seguito dell'acidificazione, a valle del processo, i prodotti sono stati estratti in linea e recuperati mediante separazione come composti puri. La presenza di toluene non ha avuto effetti sull'efficienza catalitica dell'enzima.

In conclusione, il costante progresso nella comprensione dei fattori coinvolti nella catalisi enzimatica, unito ad un crescente bisogno di alternative maggiormente ecosostenibili rispetto alla catalisi tradizionale, ha generato uno scenario in rapida evoluzione in cui la biocatalisi si sta rapidamente adattando alle problematiche della produzione industriale, offrendo soluzioni alternative ai chimici di sintesi e, contemporaneamente, stimolando gli ingegneri nella costruzione di reattori innovativi. La biocatalisi in flusso può ridurre drasticamente i costi delle trasformazioni chimiche e questo è chiaramente, a livello industriale, molto allettante. I microreattori sono inoltre molto utili nella selezione delle condizioni ottimali di reazione e nella valutazione preliminare degli aspetti economici della biocatalisi prima dell'implementazione dei processi di scale-up. Infine, la possibilità di riciclare il cofattore ed, eventualmente, intrappolarlo nel reattore possono rappresentare sviluppi molto importanti nell'espansione a livello industriale dei processi biocatalitici.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] T. Wirth (Ed.), *Microreactors in Organic Chemistry and Catalysis*, 2<sup>nd</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2013.
- [2] X. Yao *et al.*, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2015, **47**, 519.
- [3] T. Honda *et al.*, Development of enzymatic reactions in miniaturized reactors, in *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions*, T. Yoshida (Ed.), Wiley, 2017, 99.
- [4] K.S. Elvira *et al.*, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 905.
- [5] S.G. Newman, K.F. Jensen, *Green Chem.*, 2013, **15**, 1456.
- [6] D. Barrow *et al.*, Properties and use of microreactors. In *Microreactors in Organic Chemistry and Catalysis* (2<sup>nd</sup> Ed.), T. Wirth (Ed.), Wiley, 2013, 1.
- [7] R. Wohlgenuth *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2015, **33**, 302.
- [8] J. Sedelmeier *et al.*, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 3618.
- [9] R.L. Hartman *et al.*, Patent US 8763623 B2, 2014.
- [10] P. Kleinebudde *et al.* (Eds.), *Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals*, Hoboken, NJ, Wiley, 2017.
- [11] K. Faber *et al.*, in *Biocatalysis in Organic Synthesis* (Vols 1-3), Thieme-Verlag, 2014.
- [12] U.T. Bornscheuer *et al.*, *Nature*, 2012, **485**, 185.
- [13] H.P. Meyer *et al.*, *Catal. Sci. Technol.*, 2013, **3**, 29.
- [14] C.A. Martinez *et al.*, *Org. Process Res. Dev.*, 2008, **12**, 392.
- [15] C.K. Savile *et al.*, *Science*, 2010, **329**, 305.
- [16] T. Li *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 6467.
- [17] L. Tamborini *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2018, **36**, 73.
- [18] D. Alsafadi, F. Paradisi, *Mol. Biotechnol.*, 2014, **56**, 240.
- [19] R.C. Rodrigues *et al.*, *Chem Soc Rev.*, 2013, **42**, 6290.
- [20] R. Singh *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 1232.
- [21] I.I. Junior, *et al.*, *Org. Process Res. Dev.*, 2012, **16**, 1098.
- [22] R.C. Rodrigues *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6290.
- [23] A. Šalić *et al.*, *J. Flow Chem.*, 2016, **6**, 27.
- [24] J.M. Bolivar, B. Nidetzky, *Chem. Today*, 2013, **31**, 50.
- [25] L. Hajba, A. Guttman, *J. Flow Chem.*, 2015, **6**, 8.
- [26] M. Bolivar, B. Nidetzky, *Chem. Today*, 2013, **31**, 50.
- [27] E. Jones, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2012, **90**, 726.
- [28] S.V. Ley *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2015, **54**, 3449.
- [29] P. Gruber *et al.*, *Lab Chip.*, 2017, **17**, 2693.
- [30] P. Gruber *et al.*, *Biotechnol. J.*, 2017, **12**, 1600475.
- [31] H. Zhou *et al.*, *FEBS J.*, 2011, **278**, 3796.
- [32] M. Miyazaki, H. Maeda, *Trends Biotechnol.*, 2006, **24**, 463.
- [33] M. Polaković *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 2017, **39**, 667.
- [34] A. Guldhe *et al.*, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2015, **41**, 1447.
- [35] P. Zambelli *et al.*, *Food Chem.*, 2016, **190**, 607.
- [36] L. Tamborini *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 6090.
- [37] A. Šalić *et al.*, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 41714.
- [38] M. Planchestainer *et al.*, *Green Chem.*, 2017, **19**, 372.
- [39] M.L. Contente *et al.*, *ChemCatChem* 2017, **9**, 3843.
- [40] L. Cerioli *et al.*, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2015, **120**, 141.
- [41] C. Mateo *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 269.

### Micoreactors and Biocatalysis: Bridging the Gap between Academic Research and Industry

In the last two decades, microreactor technology has changed the paradigm in the laboratory and production scale organic synthesis, and is recently receiving increased attention also in the field of biocatalysis. The benefits of microflow devices, such as rapid mass and heat transfer, small reaction volumes and short diffusion pathways, results in faster and cheaper selection of substrates and media, and in the rapid development of suitable immobilization methods for continuous biocatalyst use. Furthermore, the use of highly efficient reactor designs integrated with in-line analysis and purification procedures enables faster and more reliable scale-up of biocatalysed reactions. Overall, these feature can bridge the gap between the academic research and industrial use of biocatalysts.

# NEXT

PER NOI INNOVARE È UNA TRADIZIONE

## I TEMI

ECONOMIA CIRCOLARE  
FUTURO DELLA PROFESSIONE DI CHIMICO  
CHIMICA E SALUTE  
INDUSTRIA 4.0  
INFORMAZIONE E COMUNICAZIONE  
CONTROLLI

## LE DATE UTILI

REGISTRAZIONE EARLY BIRD  
31 LUGLIO  
REGISTRAZIONE STANDARD  
30 SETTEMBRE

[WWW.CHIMICI.IT/NEXT2018](http://WWW.CHIMICI.IT/NEXT2018)

BOLOGNA 12-13 OTTOBRE

18° CONGRESSO  
NAZIONALE DEI  
CHIMICI

1928-2018 90 ANNI DELLA PROFESSIONE DI CHIMICO



# LE NANOTECNOLOGIE IN AIUTO DELL'ORGANIZZAZIONE PER LA DISTRUZIONE DELLE ARMI CHIMICHE, MA ANCHE SOTTO CONTROLLO PER LA TOSSICITÀ

*Sono riportati i risultati di alcuni utilizzi delle nanoparticelle in aiuto dell'Organizzazione per la Distruzione delle Armi Chimiche, come la messa a punto di un metodo di estrazione di tracce di armi chimiche da campioni off-site, di sensori per sostanze tossiche ultra sensibili, di nuovi prodotti per la decontaminazione da armi chimiche e di antidoti contro l'avvelenamento da fosgene. Inoltre si è discusso se sia necessario includere le nanoparticelle fra le attuali armi chimiche o biologiche a causa della loro tossicità.*



In questa nota vengono esaminati i risultati di alcuni lavori pubblicati recentemente e discussi in una riunione del Comitato Scientifico dell'Organizzazione per la Distruzione delle Armi Chimiche (OPCW), con sede a L'Aia, nel 2017, comitato del quale ho fatto parte per 6 anni fino all'ottobre 2017, in cui si sono esaminati gli aspetti positivi e negativi delle nanoparticelle e del loro aiuto per le attività

dell'OPCW di cui [1]. Questi lavori molto probabilmente sono stati avviati per risolvere i problemi nati dopo l'utilizzo di armi chimiche in Siria. Nella riunione si è discusso della dualità delle nanotecnologie, e in particolare, dell'utilizzo delle nanoparticelle in aiuto dell'OPCW per risolvere diversi problemi chimici connessi con l'uso delle armi chimiche, ma anche di altri aspetti positivi come il loro impiego nel campo della catalisi e della medicina e di aspetti negativi come l'utilizzo come armi chimiche.

In questa nota tratterò solo l'utilizzo delle nanoparticelle nel risolvere i problemi chimici connessi con l'uso di armi chimiche, facendo riferimento solo a recenti pubblicazioni e farò alcune riflessioni sulla possibilità di considerare le nanoparticelle come armi chimiche.

Parlando di nanoparticelle in questa rivista, non si può fare a meno di ricordare che nel 2003, in occasione dei cent'anni della nascita di Giulio Natta, si era scritto un articolo dal titolo "Giulio Natta e

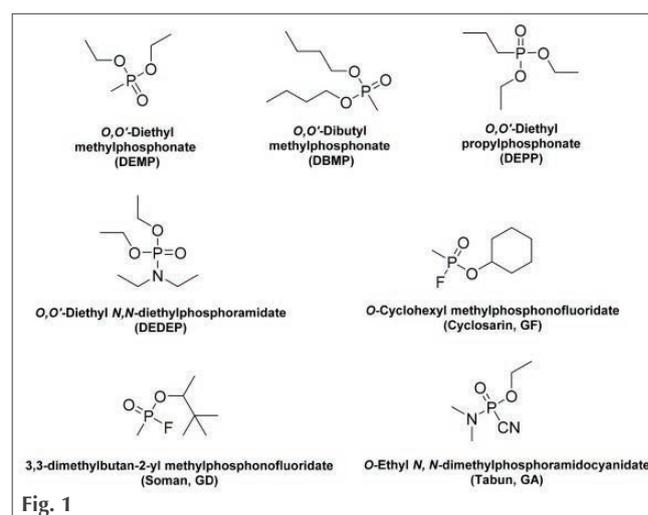


la sintesi di metanolo. Le prime basi scientifiche delle nanotecnologie" [2], facendo riferimento ad un articolo di Natta dal titolo "Relazioni fra l'attività di catalizzatori proposti per la sintesi dell'alcool metanolo e la loro struttura cristallina", pubblicato nel 1930 su questa rivista (allora *Giornale di Chimica Industriale e Applicata*) [3]. Questo era stato il suo primo articolo di chimica industriale e in quella nota del 2003 avevo scritto "Sorprende la modernità del contenuto, della metodologia di lavoro e del linguaggio utilizzato da Natta nel suo articolo del 1930: vengono sfruttate, per la prima volta, le conoscenze di chimica dello stato solido, per capire il ruolo del metodo di preparazione dei promotori nell'ottenimento di nanocristalli di ZnO con elevate proprietà catalitiche nella sintesi di metanolo. Il lavoro qui riprodotto è uno dei primi pubblicati al mondo, dove si presenta un approccio scientifico alla preparazione di catalizzatori a base di ossidi misti, che potrebbero essere anche materiali magnetici, piezoelettrici, sensori o semiconduttori. Leggendo queste poche pagine si potrà riconoscere che la parola nanotecnologia riportata nel titolo, non è affatto una forzatura". Quindi il lavoro di Natta pubblicato nel 1930 si può considerare uno dei primi lavori al mondo di nanotecnologia. In questo numero dedicato alle nanotecnologie questo articolo non poteva essere dimenticato.

### Le nanotecnologie in aiuto dell'OPCW

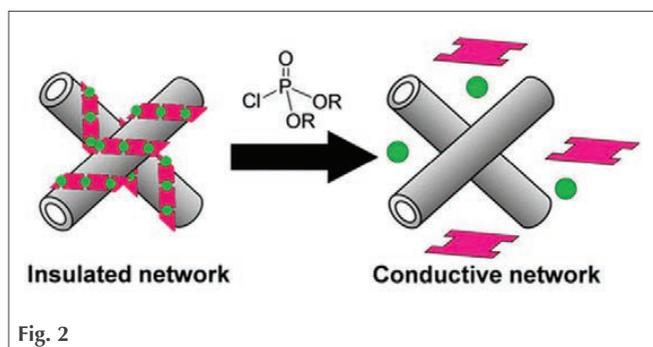
Le armi chimiche contengono sostanze chimiche altamente tossiche che rappresentano un pericolo per la società a causa del possibile uso da parte di terroristi e di attentatori generici, come nel recente caso dei due russi avvelenati in Inghilterra, e di utilizzo in conflitti, come quelli recenti in Siria, dove diverse quantità di armi chimiche erano immagazzinate ed utilizzate. Il ruolo dell'OPCW non è solo quello di controllare la distruzione di tutte le armi chimiche nel mondo e degli impianti di loro produzione, ma è anche quello di seguire gli avanzamenti della scienza nello sviluppo di nuove armi chimiche e di nuovi materiali per la protezione da contaminazione da armi chimiche, di tecniche per l'analisi veloce ed attendibile di tracce di armi chimiche e di antidoti contro avvelenamenti da armi chimiche.

L'analisi di armi chimiche in campioni di tracce di armi chimiche off-site è stata trattata nell'articolo dal titolo: "Analysis of chemical warfare agents in organic liquid samples with magnetic dispersive solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry for verification of the chemical weapons convention" [4]. Gli autori di quest'articolo hanno usato un'estrazione di esteri organici del fosforo, componenti di agenti nervini prelevati off-site presenti in un liquido organico, con solidi magnetici a base di nanoparticelle e poi hanno realizzato una successiva identificazione e quantificazione delle sostanze con gascromatografia e spettrometria di massa. Questo metodo di preparazione e di analisi di campioni di tracce di armi chimiche ha il vantaggio di essere semplice, sensibile e di operare a bassa temperatura, evitando così alterazioni dei campioni. È stato utilizzato per l'identificazione di Sarin e VX, Soman e Tabun, agenti nervini presenti in campioni ricevuti dall'OPCW prelevati off-site. Nanoparticelle a base di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> legate a resine ottenute da acido metacrilico copolimerizzato con etilenglicole dimetilacrilato sono state utilizzate per l'estrazione di queste tracce di armi chimiche presenti in un liquido organico.



La messa a punto di sensori chimici per analisi di microtracce di armi chimiche sono stati riportati nell'articolo "Ultras detection of toxic chemicals: triggered disassembly of supramolecular nanotube weapons" [5]. In questo lavoro sono stati sviluppati

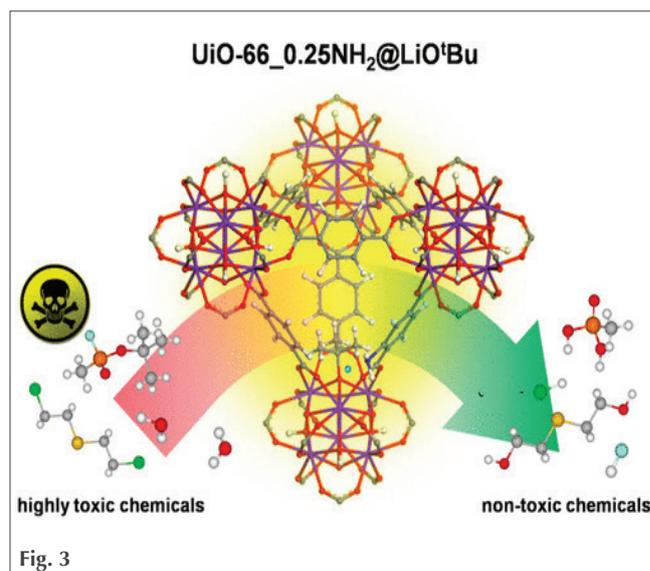
sensori chimici a basso costo e portatili per facilitare l'analisi di sostanze pericolose in piccolissime quantità (come gas tossici, esplosivi, sostanze cancerogene e anche di armi chimiche). La produzione di questi sensori è di grande interesse per la salute delle persone addette a queste analisi, date le piccole quantità di sostanze utilizzate. Come sensori sono stati messi a punto nanotubi di carbonio contenenti Ni o Cu legati a polimeri per individuare sostanze elettrofile come il dietilclorofosfato, un reagente simulante un agente nervino e il cloruro di tionile ( $\text{SOCl}_2$ ) simulante il gas mostarda.



La decontaminazione da armi chimiche è stata riportata nell'articolo "Ultra-fast degradation of chemical warfare agents using MOF nanofibers Kebabs" [6]. In questo lavoro sono stati prodotti reticoli metallo-organici introdotti dentro nanotubi di carbonio in modo da produrre una porosità molto elevata per realizzare una veloce degradazione di armi chimiche presenti in filtri o indumenti protettivi. È stato riportato nell'articolo che nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$  che rivestono nanofibre di poliammidi all'interno di nanotubi di carbonio sono molto attive in questa degradazione. Queste nanofibre funzionalizzate da composti metallorganici hanno esibito un'elevata reattività nel distruggere velocemente armi chimiche e, in particolare, la detossificazione del 50% di una sostanza simulante il Sarin e di un agente nervino come il Soman ha richiesto rispettivamente 7,4 e 2,3 minuti.

La decontaminazione da armi chimiche è stata anche riportata nell'articolo dal titolo "Chemical warfare agents detoxification properties of zirconium metal-organic frameworks by synergetic incorporation of nucleophilic and basic sites" [7]. In questo articolo sono riportate le proprietà detossificanti

di composti metallorganici dello zirconio presenti in nanoparticelle. I risultati ottenuti hanno mostrato che nanoparticelle di zirconio legate a fibre di carbonio sono capaci di idrolizzare velocemente in soluzione acquosa dei simulanti di agenti nervini come il diisopropilfluorofosfato, dell'agente mostarda 2-cloroetilsolfuro e di reali armi chimiche, come il Soman e la mostarda allo zolfo.



Infine, la messa a punto di un antidoto contro il fosgene, l'arma chimica più utilizzata nella prima guerra mondiale e reagente chimico altamente tossico, ancora utilizzato in diverse parti del mondo per produrre poliuretani e policarbonati ed altri intermedi organici, è stato riportato nell'articolo dal titolo: "Medical technology: using nanoparticles to treat phosgene exposure" [8]. Il fosgene è un gas altamente tossico che attacca le vie respiratorie, il naso, la gola e, in particolare, i polmoni: inalazioni di fosgene portano alla morte dopo 48 ore. Le nanoparticelle a base di polimeri biodegradabili e biocompatibili possono essere utilizzate per trattare attacchi ai polmoni da parte del fosgene. Questi polimeri, che contengono gruppi amminici, esterei ed idrossilici, reagiscono con il fosgene formando sostanze non tossiche. I nanopolimeri possono essere iniettati direttamente nel corpo umano ed entrano nella circolazione arteriosa sistemica; sono a base di policaprolattone, acido polilattico, destina e gelatina. Nanoparticelle fino a 150 nm hanno mostrato attività nella circolazione del sangue sen-



za creare effetti dannosi alle cellule dei polmoni e sono stati approvati dalla " U.S. Food and Drug Administration".

### **Possano essere considerate le nanoparticelle armi chimiche o biologiche?**

In questo paragrafo vengono ricordate alcune dichiarazioni riportate in diversi articoli riguardo la decisione di inserire le nanoparticelle nella Convenzione per la distruzione delle armi chimiche a causa della loro tossicità.

Nel 2008, durante il SAB Meeting of the Second Review Conference (28 February 2008), il direttore generale dell'OPCW, Rogelio Pfirter, dichiarò [9] che con le nanotecnologie sono state prodotte diverse applicazioni utili per l'umanità ed anche interventi di difesa contro le armi chimiche e la tossicità acuta delle nanoparticelle non è ancora confermata; nanomateriali sono stati utilizzati per il rilascio intelligente di farmaci, ma potrebbero essere utilizzati per veicolare sostanze tossiche (e quindi produrre armi chimiche). Comunque, aggiunse, le nanotecnologie sono un'area importante da tenere sotto controllo da parte dell'OPCW.

Successivamente, nel 2009, Wallach della "United States Court of International Trade" in un articolo dal titolo "A tiny problem with huge implications - Nanotech agents as enablers or substitutes for banned chemical weapons: is a new treaty needed?" [10] ha riportato che le nanoparticelle a base di note armi chimiche possono avere effetti diversi sui dispositivi di protezione e sulla fisiologia umana. Inoltre queste nanoparticelle potrebbero essere utilizzate come trasportatori di armi chimiche e biologiche ed anche come nanorobot che potrebbero essere utilizzati per entrare nel corpo umano, penetrare nelle cellule e reagire come le ben note armi biologiche. Quindi secondo Wallach non c'era nessun motivo che le nanoparticelle, come potenziali armi, non fossero coperte dalla leggi esistenti sulle armi chimiche.

Infine, in un più recente articolo di Robert Mathews, capo del "Nuclear Biological and Chemical (NBC) Arms Control Unit of the Australian Defence Science and Technology Organisation", dal titolo "Chemical and Biological Weapons" è stato riportato che le nanoparticelle possono asfissiare senza alcuna

azione chimica e possono imitare le azioni dei patogeni e quindi funzionare da armi biologiche.

Tuttavia secondo Mathews, le nanoparticelle, se non hanno effetti chimici, non possono essere considerate armi chimiche e, se non hanno effetti biologici, non possono essere considerate armi biologiche, malgrado possano condurre alla morte. Ad ogni modo, nel caso le nanoparticelle vengano usate per trasportare armi chimiche o biologiche, sicuramente devono entrare a tutti gli effetti nelle due convenzioni attuali sulle armi non convenzionali. Questa posizione è anche quella attuale dell'OPCW, ossia le nanotecnologie non possono essere considerate come responsabili della produzione di armi chimiche per la loro tossicità non proprio chimica, a meno che le nanoparticelle non vengano impiegate come portatori di armi chimiche: in questo caso entrano nella convenzione dell'OPCW.

### **BIBLIOGRAFIA**

- [1] [https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/SAB/en/sab2501\\_e\\_.pdf](https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/SAB/en/sab2501_e_.pdf)
- [2] F. Trifirò, *La Chimica e l'Industria*, 2003, **85**(1), 11.
- [3] G. Natta, *Giornale di Chimica Industriale ed Applicata*, 1930, **12**(1), 14.
- [4] V. Singh, A.K. Purohit et al., *Journal of Chromatography A*, 2016, **1448**, 32.
- [5] S. Ishihara, J.M. Azzarelli et al., *J. Am Chem Soc.*, 2016, **138**(26), 8221.
- [6] J. Zhao. D.T. Lee et al., *Angewandte Chemie*, 2016, **55**(42), 13224.
- [7] R. Gil-San-Millan, E. López-Maya et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**(28), 23967.
- [8] S. Barua, G. Nichols, *Journal of the Homeland Defense & Security Information Analysis Center*, 2016, **3**(3), 30.
- [9] [https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/CSP/RC-2/en/RC-2\\_DG.1-EN.pdf](https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/CSP/RC-2/en/RC-2_DG.1-EN.pdf)
- [10] E.J. Wallach, *Fordham International Law Journal*, 2009, **33**(3), 858.
- [11] R.J. Mathews, *Chemical and Biological Weapons*, in *Routledge Handbook of the Law of Armed Conflict*, R Liivoja, T. McCormack (Eds.), Routledge, London, 2016.



MASSIMO BARBIERI  
 LICENSING MANAGER @TECHNOLOGY TRANSFER OFFICE  
 POLITECNICO DI MILANO  
 MASSIMO.BARBIERI@POLIMI.IT

# IL BREVETTO UNITARIO: QUALE OPPORTUNITÀ PER LE IMPRESE?

*Viene presentato uno studio comparativo sul brevetto europeo con effetto unitario. Si tratta di un sistema alternativo per la tutela delle invenzioni in Europa che si affiancherà all'attuale sistema di convalide nazionali. Il brevetto europeo con effetto unitario non sarà più un fascio di brevetti nazionali ma un unico titolo valido negli Stati che avranno ratificato l'accordo sul tribunale unificato.*

## Introduzione

Un brevetto unitario è un brevetto europeo con effetto unitario, ovvero un brevetto europeo e quindi concesso dall'Ufficio Europeo Brevetti (UEB), secondo il regolamento e le procedure stabilite dalla Convenzione sul Brevetto Europeo (CBE), a cui è attribuito un effetto unitario su formale richiesta del titolare della privativa [1].

Il sistema del brevetto unitario è basato sulla CBE: questo significa che la fase che precede la concessione è la stessa dei classici brevetti europei. La domanda viene esaminata secondo i criteri della CBE e se tutti i requisiti formali e sostanziali sono soddisfatti, sarà concessa. Le vari fasi sono schematizzate in Fig. 1.

Ciò che cambia è la procedura successiva alla concessione, che attualmente prevede la convalida del titolo in uno o più Paesi membri della CBE (il brevetto europeo è ora un "fascio di brevetti nazionali", nel senso che genera tanti brevetti nazionali quanti sono gli Stati contraenti designati

dal richiedente, brevetti la cui validità e ambito di tutela sono disciplinati dai vari ordinamenti nazionali e giudicati da giudici nazionali in merito alla contraffazione) ma che sarà più semplice dal punto di vista amministrativo e più conveniente economicamente dell'attuale sistema di convalide nazionali perché si tratta di un titolo unico e fornirà una tutela uniforme, con la stessa efficacia in tutti i Paesi membri dell'Unione Europea (UE) che avranno ratificato l'accordo TUB.

Lo scopo principale della riforma è proprio quello di fornire alle imprese un'alternativa più semplice e meno costosa al sistema esistente, centralizzando la procedura successiva alla concessione: questo farà

risparmiare soldi ai richiedenti (sulle traduzioni ma anche sulle tasse annuali di mantenimento e di pubblicazione e sugli onorari dei consulenti in proprietà industriale incaricati) e ridurrà la complessità dell'intero processo.

Uno scopo ulteriore è quello di centralizzare anche le dispute legali: per questo

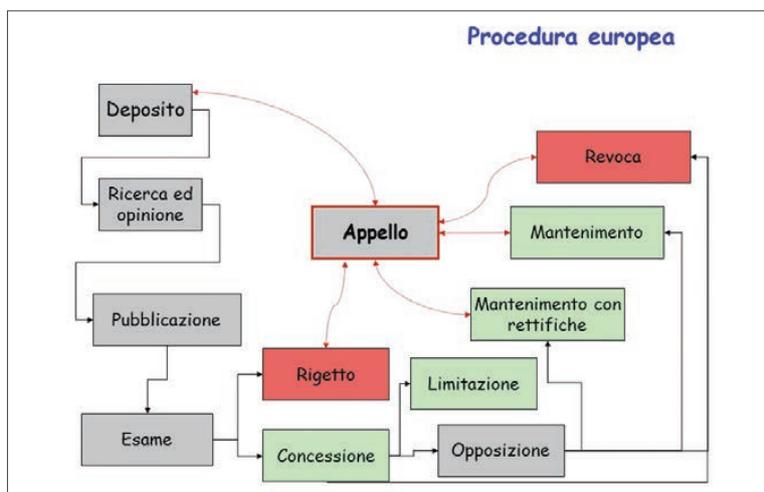


Fig. 1 - Principali fasi della procedura europea



motivo è stato creato il tribunale unificato dei brevetti (TUB) con uno specifico accordo.

Un brevetto unitario potrà essere limitato, trasferito, revocato oppure decadere rispetto a tutti i Paesi membri della UE e potrà essere concesso in licenza in tutti o in parte di essi. I trasferimenti, le licenze e gli altri diritti in capo al titolare non dovranno più essere registrati in ogni singolo Paese ma sarà sufficiente annotare la richiesta per l'ottenimento dell'effetto unitario nel corrispondente Registro dei brevetti unitari, amministrato centralmente dall'UEB.

### Regolamenti UE e l'accordo sul tribunale unificato

Il "pacchetto del brevetto unitario" consiste in due regolamenti dell'Unione Europea (n. 1257/2012 e n. 1260/2012) e un accordo internazionale sul tribunale unificato dei brevetti (TUB).

I due regolamenti derivano dalla cooperazione rafforzata nell'ambito della creazione della tutela brevettuale unitaria da parte degli Stati membri della UE (tranne Spagna e Croazia) e sono già in vigore dal 20 gennaio 2013 ma saranno attuati solo dopo l'attivazione dell'accordo TUB.

L'accordo TUB è stato sottoscritto da 25 Stati membri nel febbraio 2013 (ovvero tutti tranne Spagna, Polonia e Croazia).

Un brevetto con effetto unitario potrà, tuttavia, essere richiesto solo dopo l'attuazione dei summenzionati regolamenti comunitari e avrà efficacia solo in quei Paesi che avranno ratificato l'accordo TUB alla data di registrazione dell'effetto unitario da parte dell'UEB.

Questo significa che, sebbene siano 26 gli Stati membri della UE, i brevetti unitari registrati non copriranno tutti e 26 i territori, dal momento che alcuni di essi non avranno ancora ratificato l'accordo TUB. Le ratifiche non avverranno tutte insieme ma gradualmente. Ciò significa che ci saranno generazioni di brevetti unitari eterogenei con differenti coperture territoriali.

La copertura territoriale di una specifica generazione di brevetti unitari sarà la stessa per tutta la loro durata, indipendentemente dalle successive ratifiche che avverranno dopo la data di registrazione dell'effetto unitario. Quindi la copertura territoriale di un brevetto unitario non potrà essere estesa agli Stati mem-

bri che avranno ratificato l'accordo dopo che l'UEB ha registrato il suo effetto unitario.

L'elenco degli Stati membri coperti da un dato brevetto unitario sarà pubblicato nel Registro dei brevetti unitari e sarà menzionato nella comunicazione dell'UEB che informerà il richiedente sulla data di registrazione dell'effetto unitario [Regola 7(1) - UPR [2]].

L'ambito territoriale di ciascun brevetto unitario sarà quindi definito in modo certo e non ambiguo.

### Strategie brevettuali

Il brevetto unitario si prospetta come un'opzione aggiuntiva a quelle attualmente vigenti per l'ottenimento della tutela della proprietà industriale in Europa.

Un brevetto unitario potrà convivere ed essere affiancato al classico brevetto europeo: sarà possibile ottenere una tutela unitaria in quegli Stati che avranno ratificato l'accordo TUB e convalidare, invece, il brevetto europeo in quegli Stati non coperti dalla tutela unitaria, perché non sono Stati membri della UE (Svizzera, Norvegia, Turchia, Islanda e i Paesi dell'ex Jugoslavia), oppure sono Stati membri ma che non partecipano alla cooperazione rafforzata (Spagna, Croazia) oppure Stati membri che non hanno ancora ratificato l'accordo TUB [3].

Per poter tutelare un'invenzione in Europa, un'impresa potrà:

- estendere la domanda di brevetto prioritaria negli Stati in cui intende commercializzare un prodotto o in cui hanno la sede i principali concorrenti;
- depositare una domanda di brevetto europeo e dopo la concessione decidere se applicare una delle seguenti opzioni:
  - convalidare il brevetto solo in alcuni Stati, usufruendo se necessario dell'opzione di "opt-out" [4];
  - richiedere l'effetto unitario;
  - utilizzare entrambe le soluzioni, utilizzando il sistema di convalide in quei Paesi dove non è possibile conseguire l'effetto unitario.

Sui brevetti europei che un'impresa ha già in portafoglio, dovrà, inoltre, decidere se esercitare o meno l'opzione di "opt-out".

### Il tribunale unificato

Il tribunale unificato avrà la competenza esclusiva per i brevetti unitari e i classici brevetti europei con-

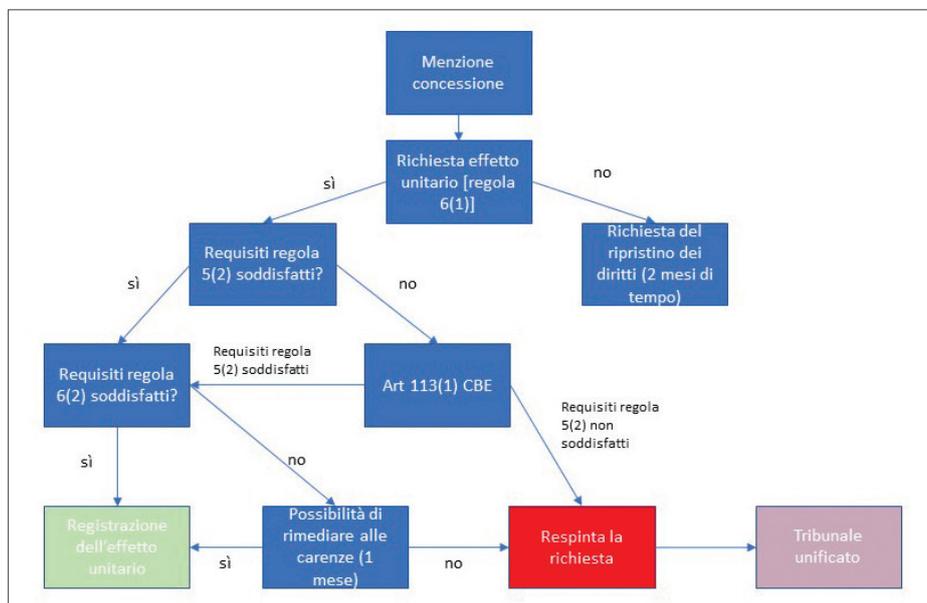


Fig. 2 - Schema delle fasi per la registrazione di un brevetto unitario

validati in uno o più Stati su eventuali azioni di nullità, non contraffazione, revoca e sulle decisioni prese dall'UEB dei brevetti unitari. Se un brevetto unitario sarà giudicato nullo, perderà efficacia in tutti i Paesi in cui era stato registrato l'effetto unitario.

Per quanto riguarda i classici brevetti europei, tuttavia, la competenza esclusiva è soggetta a un'eccezione ("opt-out") per un periodo transitorio di sette anni, che può essere prolungato per altri sette anni. Durante questo lasso di tempo, le azioni legali potranno essere intraprese nei tribunali nazionali. Inoltre, i titolari di brevetti europei concessi prima di questo periodo di transizione potranno comunque esercitare l'opzione di "opt-out" annotandola nel Registro del tribunale unificato, a meno che non sia già stata intrapresa un'azione legale. L'opzione di "opt-out" può essere ritirata in qualsiasi momento. Il tribunale unificato non avrà alcuna competenza riguardo i brevetti nazionali e i certificati di protezione complementare.

Il tribunale unificato sarà costituito da una Corte di Prima Istanza con diverse divisioni (una centrale e alcune locali e regionali), una Corte d'Appello (per i ricorsi contro le decisioni della Corte di prima Istanza) e un Registro. La sede della divisione centrale sarà a Parigi, con due sezioni a Londra (da confermare per la decisione della Gran Bretagna di uscire dalla UE) e a Monaco. Sono stati istituiti anche un centro

di mediazione e arbitrato con sede a Lubiana e Lisbona e uno di formazione per i giudici a Budapest.

Le azioni di contraffazione, le misure cautelari (descrizione, inibitoria e sequestro) e le richieste di risarcimento danni potranno essere avviate presso le sezioni locali/regionali del luogo in cui è avvenuta la contraffazione o dove il convenuto ha la residenza o il domicilio o la sede legale. La scelta dipende dalla convenienza della sede e dalla lingua della procedura della divisione. In termini di efficienza, rapidità, qualità delle sentenze e dell'interpretazione della legge, non ci dovrebbero essere differenze tra le varie sezioni.

I vantaggi di avere un tribunale unificato possono essere così riassunti:

Il principale svantaggio per il titolare è la perdita dei diritti in tutti i Paesi nel caso in cui il brevetto sia giudicato nullo.

- giurisprudenza unificata;
- sentenze con efficacia in tutti gli Stati membri della UE;
- procedimenti più rapidi rispetto a quelli nazionali.

### La procedura del brevetto unitario

Per ottenere un brevetto unitario, il titolare della privativa deve inviare una richiesta formale [Regola 5(1) - UPR] all'UEB entro un mese dal ricevimento della menzione di concessione del brevetto europeo pubblicata nel corrispondente Bollettino [Regola 6(1) - UPR]. Si tratta di una scadenza obbligatoria e che non può essere prorogata. Qualora non possa essere rispettata questa scadenza, è possibile richiedere il ripristino dei diritti entro due mesi, pagando la tassa prescritta.

La richiesta, che può essere effettuata gratuitamente *on-line* secondo tre modalità (eOLF, CMS oppure tramite modulo web), deve contenere la traduzione del brevetto europeo in:

- inglese, se la procedura è stata eseguita in francese o tedesco;



- una qualsiasi lingua della UE, se la procedura è stata attuata in inglese.

La traduzione delle rivendicazioni nelle altre due lingue ufficiali dell'UEB è già stata depositata all'atto della concessione del brevetto europeo e può essere riutilizzata. Quindi, in pratica, solo la traduzione della descrizione deve essere espletata.

Il brevetto con effetto unitario avrà efficacia dalla data della pubblicazione della concessione del brevetto europeo sul corrispondente Bollettino.

Se i requisiti formali richiesti dalla Regola 6(2) [5] UPR non sono soddisfatti, l'UEB può concedere una proroga di un mese per poter rimediare alle carenze riscontrate [senza possibilità di ripristino dei diritti - Regola 7(3) UPR].

Se sono assolti i requisiti delle Regole 5(2) [6] e 6(2) UPR, l'effetto unitario sarà registrato. In caso contrario, al titolare sarà concessa la possibilità di porre rimedio alle mancanze. In caso di rifiu-

to, sarà possibile appellarsi al tribunale unificato. Nella Fig. 2 sono schematizzate le varie fasi che portano alla registrazione dell'effetto unitario.

Si paga una singola tassa di rinnovo direttamente all'UEB che gestisce tutta la parte amministrativa.

L'importo delle tasse annuali, riportato in Tab. 1, sarà suddiviso al 50% con gli Stati membri.

Se il pagamento sarà effettuato in ritardo rispetto alla scadenza, potrà essere effettuato nei sei mesi successivi e sarà applicata una maggiorazione pari al 50% dell'importo della corrispondente tassa. Se l'annualità sarà corrisposta entro i tre mesi [7] successivi alla scadenza, non sarà applicata alcuna sovrattassa.

Uno sconto del 15% sarà praticato qualora il titolare della privativa dichiari la propria disponibilità a concedere una licenza d'uso sul brevetto.

Le PMI, le persone fisiche, le organizzazioni no-profit, le università e gli enti pubblici di ricerca potranno ottenere una riduzione dei costi di traduzione di 500 euro. Questa richiesta dovrà essere depositata insieme a quella dell'effetto unitario.

Nella Fig. 3 è riportato un grafico di confronto tra le tasse annuali dovute per il mantenimento di un brevetto unitario e quelle di un brevetto europeo convalidato in quattro Paesi (Italia, Francia, Germania e Regno Unito), si possono trarre le seguenti considerazioni:

- la somma dei primi dieci rinnovi non raggiunge i 5.000 euro;
- solo apparentemente la convalida in quattro Stati è economicamente conveniente (nel computo è stata selezionata l'Italia e non l'Olanda, che invece era stata presa dall'UEB come il quarto Paese di riferimento e non sono stati considerati gli onorari dei consulenti incaricati al pagamento delle annualità);
- la procedura europea non è vantaggiosa se si decide di convalidare il brevetto europeo solo in due Stati; ma per un numero maggiore lo è.

### Conclusioni

Il brevetto con effetto unitario fornirà alle imprese, alle università e agli enti pubblici di ricerca un sistema complementare per la tutela delle invenzioni in Europa rispetto a quello attuale che prevede di effettuare le convalide nazionali dopo la concessione del titolo.

Anno di rinnovo	Importo della tassa annuale (euro)
2°	35
3°	105
4°	145
5°	315
6°	475
7°	630
8°	815
9°	990
10°	1.175
11°	1.460
12°	1.775
13°	2.105
14°	2.455
15°	2.830
16°	3.240
17°	3.640
18°	4.055
19°	4.455
20°	4.855

Tab. 1 - Tasse annuali del brevetto unitario

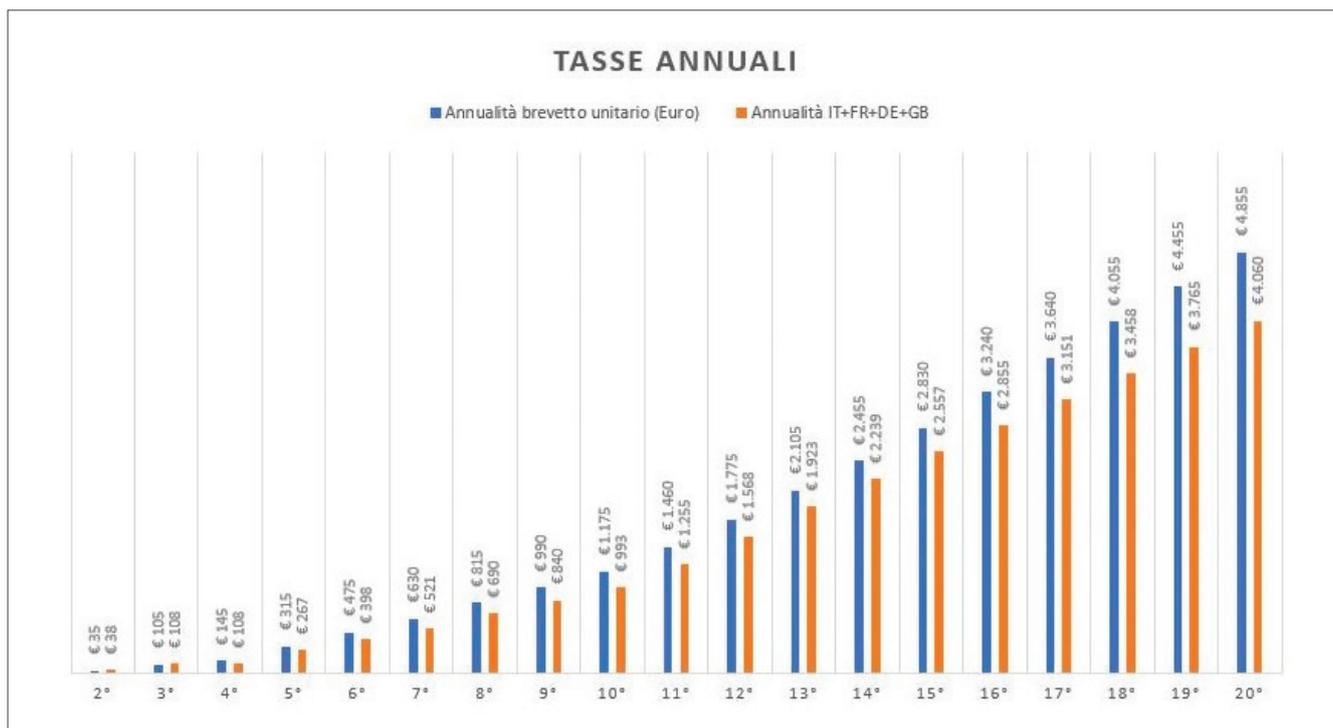


Fig. 3 - Confronto delle tasse annuali dovute per un brevetto unitario e un brevetto europeo convalidato in Italia, Francia, Germania e Regno Unito

Il brevetto unitario sarà più facilmente gestibile rispetto alle convalide nazionali, più conveniente economicamente (sia per le tasse annuali di mantenimento sia perché non saranno più necessarie le traduzioni) e soprattutto consentirà di godere di una tutela uniforme, con la stessa efficacia per tutti i Paesi membri dell'Unione Europea che avranno ratificato l'accordo sul tribunale unificato.

## BIBLIOGRAFIA E NOTE

- [1] Unitary Patent Guide - Obtaining, maintaining and managing Unitary Patents, 1<sup>st</sup> edition August 2017 - <https://www.epo.org/law-practice/legal-texts/html/upg/e/index.html>
- [2] "UPR": Rules relating to Unitary Patent Protection [http://www.epo.org/law-practice/legal-texts/html/upg/e/uppg\\_a\\_vi\\_1.html](http://www.epo.org/law-practice/legal-texts/html/upg/e/uppg_a_vi_1.html)
- [3] O. Joshi, A. Roy, M. Janodia, *Journal of Intellectual Property Rights*, 2017, **22**, 188.
- [4] Con la procedura di "opt-out" i brevetti europei concessi non saranno sotto la giurisdizione del tribunale unificato ma dei tribunali dei Paesi in cui sono state effettuate le convalide.
- [5] La richiesta dell'effetto unitario deve essere presentata in forma scritta e nella lingua della procedura e dovrà contenere: a) le informazioni sul titolare della privativa; b) il numero del

brevetto europeo a cui sarà conferito l'effetto unitario; c) eventuali informazioni sul mandatario incaricato dal titolare; d) una traduzione del brevetto europeo come richiesto dall'articolo 6 (1) del Regolamento UE n. 1260/2012 (se la lingua della procedura è francese o tedesco, una traduzione del testo in inglese; se la lingua della procedura è l'inglese, una traduzione in una delle lingue ufficiali dell'Unione Europea).

- [6] L'effetto unitario sarà registrato solo se il brevetto europeo è stato concesso con rivendicazioni che hanno lo stesso ambito di tutela in tutti gli Stati membri.
- [7] I tre mesi decorrono dalla data di notifica della registrazione dell'effetto unitario.

### The Unitary Patent: Which Business Opportunities?

A comparative study on the European patent with unitary effect is presented. This is an alternative system for the protection of inventions in Europe that will be added to the current system of national validations. The European patent with unitary effect will no longer be a bundle of national patents but a single title valid in the States that have ratified the Agreement on the Unified Patent Court (UPCA).

# Green & Circular Economy

**6-9  
Novembre  
2018**

Rimini Italy

[ecomondo.com](http://ecomondo.com)



22<sup>a</sup> Fiera internazionale  
del recupero di materia  
ed energia e dello  
sviluppo sostenibile

# ECOMONDO

THE GREEN TECHNOLOGIES EXPO

hoopcommunication.it

IN CONTEMPORANEA CON

**KEY ENERGY**

ORGANIZZATO DA

**ITALIAN EXHIBITION GROUP**  
Providing the future



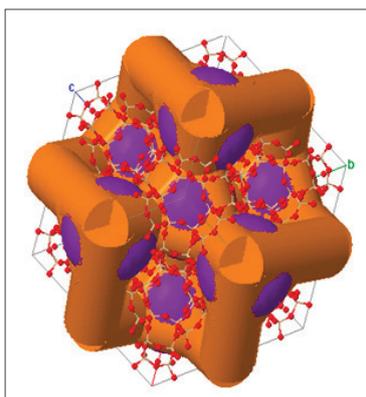
TATIANA CHENET, LUISA PASTI, ANNALISA MARTUCCI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA  
CHNTTN@UNIFE.IT

# MATERIALI ADSORBENTI PER LA RIMEDIAZIONE DI ACQUE

*I contaminanti emergenti vengono continuamente immessi nei sistemi idrici a causa del loro vasto impiego. Lo scopo di questo lavoro è quello di studiare la capacità di adsorbimento di materiali micro e mesoporosi nei confronti di composti organici in soluzione acquosa. I risultati sperimentali hanno dimostrato che le zeoliti sono adsorbenti selettivi per i contaminanti organici.*

I contaminanti emergenti (CECs) sono sostanze, naturali o di sintesi, che possono essere candidati ad essere in futuro regolamentate in base alla loro sospetta (eco)tossicità ed ai loro potenziali effetti sulla salute umana. Fondamentalmente, si tratta di sostanze utilizzate quotidianamente nelle attività umane e che possono avere molteplici impieghi. Poiché i CECs sono così numerosi, ubiquitari e chimicamente diversi, essi vengono spesso suddivisi in categorie che descrivono il loro principale impiego o altre caratteristiche peculiari. I CECs sono continuamente immessi nei corpi idrici in tutto il mondo a causa del loro vasto e quotidiano impiego. I convenzionali impianti di trattamento di acque reflue sono infatti in grado di rimuovere solo parzialmente questi composti, che vengono quindi introdotti nell'ambiente direttamente dagli effluenti di questi impianti oppure possono provenire dall'impiego in agricoltura dei fanghi derivanti dagli impianti stessi. Alcuni studi hanno dimostrato che anche un'esposizione a basse concentrazioni a taluni CECs può avere effetti negativi sui sistemi biologici. In genere questi contaminanti sono infatti presenti a livelli di concentrazione molto bassi nelle acque naturali.

Pertanto, da una parte è importante sviluppare metodi analitici in grado di rilevare queste molecole in



modo accurato anche a bassi livelli di concentrazione per meglio valutare il loro impatto ambientale, e, dall'altro, è necessario migliorare l'efficienza delle tecnologie di bonifica delle acque per ridurre il potenziale rischio ad essi associato. In generale, dalla letteratura scientifica si evince che le tecnologie basate sull'adsorbimento sono economiche ed efficienti sia per l'arricchimento di inquinanti in tracce sia per la loro rimozione dall'acqua

e numerose sono le tipologie di adsorbenti inorganici che possono essere impiegate per questo scopo. Recentemente, è stata dimostrata l'efficacia delle zeoliti nella rimozione di composti organici in matrici ambientali. Parallelamente, anche i materiali silicei mesoporosi hanno suscitato un crescente interesse poiché le loro proprietà (elevata area superficiale, elevato volume dei pori, dimensione dei pori controllata) li rendono promettenti come adsorbenti nei processi di rimozione di contaminanti. Inoltre, grazie alla loro stabilità chimica e termica le zeoliti possono essere considerate materiali ecocompatibili.

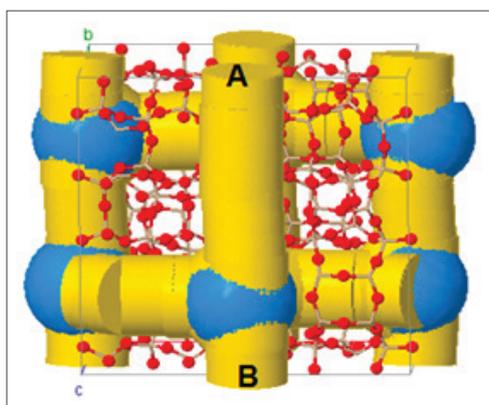
Lo scopo del presente lavoro è quello di studiare la capacità di adsorbimento di materiali microporosi e mesoporosi nei confronti di composti organici in soluzione acquosa. Questa indagine ha il duplice scopo di valutare la loro applicabilità sia in sistemi di bonifica di acque naturali contaminate che come mezzo

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.



adsorbente in sistemi analitici di arricchimento basati su metodi di estrazione in fase solida.

Per quanto riguarda gli inquinanti studiati, sono stati selezionati come membri dei CECs diversi composti ad attività farmaceutica, oltre che derivati del petrolio o additivi di carburanti. Tali composti sono caratterizzati da differenti proprietà chimico-fisiche, come dimensioni



molecolari, comportamento acido/base, idrofobia, ecc. In questo lavoro, sono state impiegate diverse tecniche di indagine (tra cui la cromatografia, la diffrattometria e la termogravimetria) per lo studio del processo di adsorbimento, in particolare per:

- 1) studiare le proprietà adsorbenti dei materiali;
- 2) caratterizzare la loro struttura dopo l'adsorbimento dei contaminanti selezionati;
- 3) localizzare le specie organiche all'interno del sistema di canali della zeolite;
- 4) individuare le interazioni tra molecole organiche adsorbite e l'adsorbente;
- 5) caratterizzare la cinetica del processo di adsorbimento.

In particolare, la cromatografia è stata principalmente impiegata per determinare le isoterme di adsorbimento dei composti d'interesse. L'isoterma di adsorbimento è utile per rappresentare la capacità di una zeolite di adsorbire sostanze organiche in soluzione acquosa e fornisce una descrizione della dipendenza funzionale tra capacità e concentrazione di inquinante. La determinazione sperimentale dell'isoterma consente di valutare l'applicabilità dell'adsorbimento ai processi di trattamento delle acque, di selezionare il materiale adsorbente più adeguato e di stimarne la quantità necessaria; inoltre i parametri delle isoterme forniscono indicazioni sulla distribuzione dell'energia del processo di adsorbimento. Le suddette tecniche sono state utilizzate anche per lo studio della cinetica di adsorbimento. La cinetica riguarda cambiamenti, soprattutto la velocità con cui questi avvengono, delle proprietà chimiche nel tempo: essa svolge quindi un ruolo fondamentale nel determinare il tempo di contatto appropriato per

la rimozione di inquinanti dalle acque reflue. Per studiare il meccanismo di adsorbimento, sono state impiegate tecniche di diffrazione per localizzare la specie organica adsorbita all'interno della struttura della zeolite. Le informazioni raccolte da quest'ultima indagine consentono di definire le interazioni tra molecole organiche e framework della zeolite.

I dati sperimentali hanno rivelato che la concentrazione di inquinante organico incorporato all'interno del framework è influenzata dalla struttura cristallina, dall'idrofobia (rapporto  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ : SAR) e dai trattamenti termici dell'adsorbente. Per i materiali mesoporosi studiati, un ruolo importante è svolto anche dalla procedura di eliminazione del template (trattamento termico o estrazione con solvente).

È stato dimostrato che sia le interazioni idrofobiche che elettrostatiche contribuiscono al processo di adsorbimento: infatti, idrofobia e costante di dissociazione del soluto influenzano fortemente l'adsorbimento. In molti casi si è verificato che la molecola selezionata è stata adsorbita all'interno del framework delle zeoliti. In generale, il processo di adsorbimento è risultato molto veloce in tutte le zeoliti studiate nei confronti delle diverse classi di inquinanti. Per indagare la possibile competizione da parte di sostanze organiche naturali sulle proprietà di adsorbimento di contaminanti da parte delle zeoliti, è stato valutato l'effetto della presenza in soluzione di derivati fenolici dalla lignina. I risultati sperimentali hanno dimostrato che le zeoliti sono adsorbenti selettivi per gli inquinanti organici.

#### Adsorbent Materials for Water Remediation

Emergent contaminants are constantly lead into water bodies due to their wide use. The aim of this work is to study the adsorption capacity of micro and mesoporous materials towards organic compounds in aqueous solutions. The experimental results showed that zeolites are selective adsorbents for organic contaminants.



LUCA RIVOIRA  
DIPARTIMENTO DI CHIMICA  
UNIVERSITÀ DI TORINO  
LUCA.RIVOIRA@UNITO.IT

## AMMINE BIOGENE NEI VINI

*In questo lavoro sono stati sviluppati nuovi approcci analitici per la determinazione delle ammine biogene nei vini tramite derivatizzazione con naftalene-2,3-dicarbossialdeide e dabsyl-cloruro, e analisi HPLC-fluorescenza e HPLC-spettroscopia a lenti termiche. È stato inoltre proposto un metodo di screening rapido basato sulla transglutaminazione delle ammine e sulla reazione di Berthelot.*

Le ammine biogene (BAs) sono composti azotati prodotti per decarbossilazione microbica degli aminoacidi. La presenza di ammine biogene è stata più volte evidenziata in cibi e bevande, in particolare nelle matrici alimentari fermentate (l'enzima decarbossilasi risulta particolarmente

attivo nei processi fermentativi). Se le concentrazioni di BAs risultano superiori a un determinato livello, la loro presenza provoca un deterioramento delle proprietà organolettiche del cibo/bevanda in cui sono presenti. Se assunte in dosi elevate, le BAs risultano tossiche sia a livello acuto, pro-

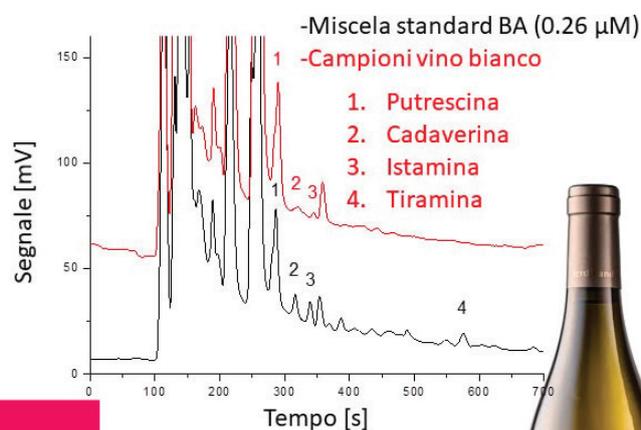


L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.



## Analisi di campioni reali HPLC-DBS-TLS

- 2 vini Rebula (Slovenia),  
vino bianco



		PUT [mg·L <sup>-1</sup> ]	CAD [mg·L <sup>-1</sup> ]	HIS [mg·L <sup>-1</sup> ]	TYR [mg·L <sup>-1</sup> ]
Vino A	HPLC-DBS-TLS	0.64±0.02	0.20±0.03	<b>0.08±0.01</b>	< LOD
	HPLC-OPA-FL	0.59±0.13	0.20±0.11	< LOD	< LOD
Vino B	HPLC-DBS-TLS	1.14±0.03	0.25±0.03	<b>0.09±0.01</b>	< LOD
	HPLC-OPA-FL	1.10±0.23	0.15±0.08	< LOD	< LOD

Confronto tra

- Metodo OIV-MA-AS315-18 (HPLC-OPA-FL)
- Metodo HPLC-DBS-TLS



Fig. 2

vocando mal di testa, ipertensione, sia cronico, generando alterazioni cancerogene del DNA. Sulla base di tali premesse, in occasione delle Giornate di Chimica Analitica in memoria del prof. Francesco Dondi, dedicate a tematiche inerenti la Scienza delle Separazioni e la Bioanalitica, ho deciso di portare all'attenzione dei partecipanti il nostro lavoro intitolato "Chromatographic determination of biogenic amines in wines by novel detection approaches".

La ricerca, che si inserisce nell'ambito di una collaborazione internazionale fra il Dipartimento di Chimica dell'Università di Torino, referente Prof. ssa Maria Concetta Bruzzoniti, e il Laboratorio di Scienze Ambientali e della vita dell'Università di Nova Gorica (Slovenia), si basa sulla messa a punto e sul confronto di tecniche analitiche per la determinazione delle BAs nei vini (Fig. 1).

Date le evidenti problematicità delle ammine biogene, nonostante in Europa e in Italia non esista una legge che regoli il livello di concentrazione massima di BAs nei vini, negli anni sono stati

proposti alcuni metodi analitici per la loro determinazione in tale matrice, principalmente basati sulla gascromatografia, sull'elettroforesi capillare e sulla cromatografia liquida. Quest'ultima tecnica è frequentemente accoppiata a una derivatizzazione pre-colonna e a una determinazione con rivelatore UV-Vis. L'ortoftalaldeide (OPA) è l'agente derivatizzante più usato, nonostante sia stata evidenziata una modesta riproducibilità del metodo dovuta alla sua scarsa stabilità.

A partire da tali assunzioni, in questo studio sono stati valutati due nuovi derivatizzanti per le BAs nei vini, il naftalene-2,3-dicarbossilaldeide (NDA) e il dabsyl-cloruro (DBS) con successiva analisi HPLC accoppiata a detector a fluorescenza (HPLC-NDA-FL) e a spettroscopia a lenti termiche (HPLC-DBS-TLS). È importante sottolineare come l'ifenziazione HPLC-TLS, nonostante risulti meno utilizzata della classica HPLC-MS, sia una tecnica che offre alta sensibilità, a prezzi strumentali inferiori. Condizione necessaria per l'applicazione di tale tecnica di rivelazione è che gli analiti (che

vengono eccitati da un raggio laser a una specifica lunghezza d'onda), abbiano un decadimento non fluorescente. È stato infatti dimostrato come il calore rilasciato dalla diseccitazione non fluorescente delle molecole sia proporzionale alla loro concentrazione e la sua misurazione ne permetta la quantificazione. Il DBS non forma complessi fluorescenti con le BAs e quindi si presta ad una rivelazione mediante TLS.

Per lo studio, sono state selezionate le 4 BAs più rappresentative e più presenti nelle matrici alimentari: putrescina, cadaverina, istamina e tiramina.

Dopo una prima ottimizzazione delle condizioni di separazione cromatografica, per entrambi i reagenti, sono state ottimizzate le condizioni di derivatizzazione: tempi di reazione, concentrazione dell'agente derivatizzante e temperatura. Tramite l'utilizzo di tecniche statistiche si sono così individuate, le condizioni sperimentali che portano ad una migliore resa di derivatizzazione delle BAs. Tali condizioni hanno portato ad un notevole risparmio del tempo di derivatizzazione rispetto al metodo proposto dall'*International Organisation of Vine and Wine* (OIV), che utilizza l'OPA. La rapidità di preparazione del campione all'analisi non è tuttavia l'unico parametro di confronto fra i metodi testati; pertanto anche le linearità e le sensibilità dei nuovi metodi sono stati confrontati con quello dell'OIV. Dai risultati ottenuti si osserva come la derivatizzazione con DBS, seguita da analisi tramite HPLC-TLS, offra limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) inferiori rispetto sia al metodo con NDA che a quello dell'OIV con OPA (es.  $LOD_{\text{istamina}} = 11 \mu\text{g/L}$  (DBS),  $27 \mu\text{g/L}$  (NDA),  $60 \mu\text{g/L}$  (OPA)). Anche per gli altri analiti, sono stati osservati incrementi da 5 a 10 volte rispetto alla metodica OIV.

Il metodo HPLC-DBS-TLS è stato confrontato con il metodo OIV, analizzando due campioni di vino (tipologia Rebula, Slovenia). Come si può osservare in Fig. 2, le concentrazioni di putrescina e cadaverina risultano concordi per i due metodi; l'istamina, invece, viene correttamente quantificata con il metodo HPLC-DBS-TLS, mentre risulta non rivelabile con il metodo OIV che utilizza l'OPA,

confermando quindi la maggiore sensibilità della procedura da noi proposta.

Infine, nell'ultima parte del lavoro, si è proposto un nuovo metodo, basato sulla rivelazione TLS, per un rapido screening del contenuto totale di BAs nel vino, sfruttando la reazione di transglutaminazione delle ammine con produzione di  $\text{NH}_3$  che viene successivamente fatta reagire con ipoclorito e acido salicilico in condizioni basiche (reazione di Berthelot) per dare il prodotto finale indofenolo, rivelato tramite TLS. È bene precisare come tale procedura sia semi-quantitativa, in quanto è possibile quantificare solo la somma delle BAs. Dopo ottimizzazione dei parametri coinvolti nella reazione di Berthelot (tempo, temperatura, concentrazione del catalizzatore) è stato ricavato un valore di limite di rivelabilità per l'ammoniaca. Considerando, infine, l'attività enzimatica dell'enzima transglutaminasi, il tempo di reazione e il volume del reattore, tale valore è stato convertito al limite di rivelabilità teorico della tecnica per le singole BAs. I limiti calcolati, che variano in un intervallo compreso fra 1,0 e 5,0  $\mu\text{g/L}$ , a seconda del peso molecolare di ciascuna ammina, risultano molto promettenti per l'analisi di campioni reali.

Gli argomenti proposti sono stati dettagliatamente descritti nell'articolo: L. Rivoira *et al.*, Novel approaches for the determination of biogenic amines in food samples, *STUDIA UBB CHEMIA*, 2017, **LXII**(3), 103; DOI: [10.24193/sub.chem.2017.3.08](https://doi.org/10.24193/sub.chem.2017.3.08)



### Biogenic Amines in Wines

In this work, we developed new analytical approaches for the determination of biogenic amines in wines based on the derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and dabsyl-chloride, followed by HPLC-Fluorescence and HPLC-Thermal lens spectroscopy analysis. A rapid screening method has also been proposed, based on transglutamination of the amines and on the Berthelot reaction.



FABIO DI NARDO  
 LABORATORIO DI CHIMICA BIOANALITICA  
 UNIVERSITÀ DI TORINO  
 FABIO.DINARDO@UNITO.IT

# TEST MULTIANALITA COLORIMETRICI A FLUSSO LATERALE

*I saggi immunochimici a flusso laterale (LFIA) rappresentano una delle tecniche di spicco per applicazioni di tipo “point-of-need” test. Tuttavia, i LFIA tradizionali consentono di rivelare un singolo analita alla volta. La nuova frontiera dei LFIA è rappresentata dalla possibilità di effettuare analisi multianalita. In tale ambito, l'utilizzo di colloidali di metalli nobili, caratterizzati da colori differenti, consente di semplificare la valutazione dei risultati.*

I metalli nobili, grazie alle loro proprietà ottiche ed elettroniche, hanno trovato vasto impiego nelle moderne tecnologie, con applicazioni che vanno dall'elettronica alla sensoristica, dalla catalisi alla diagnostica, alla veicolazione di farmaci e molte altre [1]. Tra questi, le nanoparticelle d'oro sono tra le più utilizzate nello sviluppo di saggi colorimetrici grazie ai loro elevati coefficienti di estinzione e al fatto che la banda di risonanza plasmonica superficiale (SPR) che le caratterizza sia fortemente sensibile, tra gli altri fattori, allo stato di dispersione delle nanoparticelle. La maggior parte di questi saggi si basa sulla variazione di colorazione che si verifica passando da particelle monodisperse a particelle aggregate.

Tra i saggi colorimetrici che vedono l'uso delle nanoparticelle d'oro, i *Lateral Flow Immunoassays* (LFIA) hanno avuto particolare successo grazie ai loro bassi costi di sviluppo, facilità d'uso, rapidità, portabilità ed al non utilizzo di strumentazione per effettuare l'analisi. Tali peculiarità hanno contribuito a rendere i LFIA una delle più promettenti tecniche per i “point-of-need” test, ossia quei test per cui è fondamentale ottenere risultati in tempi rapidi utilizzando dispositivi per analisi *in situ*. Inoltre, risultano essenziali nei Paesi in via di sviluppo ed in zone caratterizzate da scarse risorse, laddove

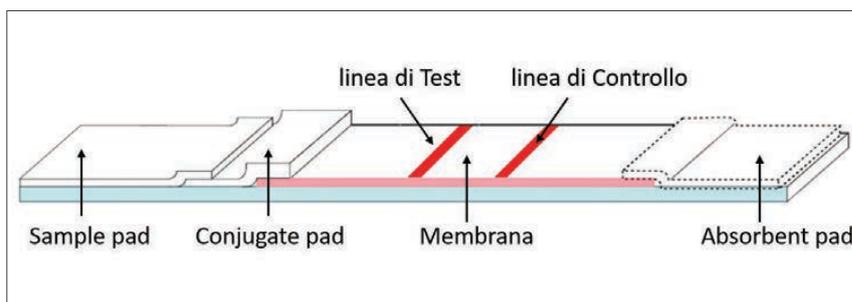


Fig. 1 - Schema delle componenti di una tipica strip da LFIA

l'accesso alle analisi strumentali è molto limitato. Questi saggi immunochimici eterogenei a flusso laterale sfruttano le interazioni specifiche tra antigene ed anticorpo per rivelare la presenza dell'analita di interesse. Una tipica *strip* da LFIA (Fig. 1) presenta un *sample pad*, che permette di trattare il campione e di renderlo compatibile con le altre componenti del sistema, e un *conjugate pad*, che ha il compito di immagazzinare un coniugato tra un antigene o un anticorpo e le nanoparticelle d'oro. Poi si ha una membrana porosa, in nitrocellulosa, che rappresenta la regione analitica del sistema ed ha lo scopo di legare bioreagenti in zone spazialmente confinate, definite “linee di test e di controllo”, dove la linea di test fornisce informazioni riguardo l'analita, mentre la linea di controllo assicura il corretto funzionamento del sistema. Infine si ha l'*absorbent pad* che blocca e raccoglie il liquido alla fine della migrazione del campione.

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle “Giornate di Chimica Analitica” dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

L'aggiunta del campione liquido, o di un suo estratto, in corrispondenza del *sample pad*, avvia una migrazione per capillarità che risospende in soluzione il reattivo marcato presente sul *conjugate pad*. In seguito, il tutto arriva nella zona in cui avvengono le interazioni specifiche con l'analita ed alla fine si ottiene un segnale visivo, correlabile con la presenza o l'assenza dell'analita stesso.

Le nanoparticelle d'oro di forma sferica, con un diametro di circa 30-40 nm, rappresentano il marcatore di riferimento nei LFIA poiché la loro preparazione è semplice e poco costosa, sono facilmente coniugabili con gli anticorpi ed il segnale prodotto è visibile ad occhio nudo, grazie al tipico colore rosso ciliegia che le caratterizza, dovuto alla banda SPR attorno ai 525 nm.

I LFIA attualmente più diffusi consentono la determinazione di un solo analita alla volta; il classico esempio è il test di gravidanza, in cui si va a ricercare la presenza della gonadotropina corionica nelle urine. La nuova frontiera dei LFIA è rappresentata dalla possibilità di effettuare analisi multianalita, le quali consentono di ridurre ulteriormente i tempi ed i costi delle analisi di *screening*. Una delle strategie maggiormente impiegate, dal punto di vista commerciale, per ottenere un LFIA multianalita consiste nell'inserire in un unico *device* più *strips*, ognuna delle quali riconosce un singolo analita [2-4]. Ovviamente questa strategia consente di mantenere tutte le caratteristiche positive dei LFIA convenzionali, ma ad un costo maggiore, a causa dell'incremento dei reagenti e dei materiali impiegati. Un'altra strategia, che consente di limitare i costi e che risulta anche essere la più immediata per ottenere LFIA in formato multianalita è quella di dispensare due o più linee di test su una sola *strip*. Dell'impiego di questa strategia sono presenti meno esempi sul mercato, ma è indubbiamente la strategia che consente un maggior risparmio ed è possibile trovarne degli esempi in letteratura [5-7].

Utilizzando le nanoparticelle d'oro di forma sferica come marcatore, un LFIA multianalita di questo tipo sarà caratterizzato da un determinato numero di li-

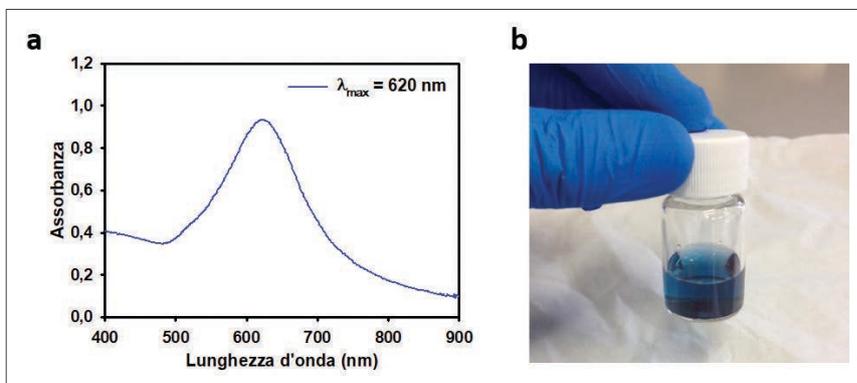


Fig. 2 - a) Spettro visibile del sol di nanoparticelle d'oro non sferiche, con banda SPR a 620 nm; b) immagine fotografica del sol con caratteristico colore blu

nee dello stesso colore, ossia rosse. Volendo facilitare la valutazione dei LFIA multianalita, senza andare ad inficiare pesantemente sui costi del sistema (quindi evitando l'impiego di lettori integrati), si potrebbero utilizzare marcatori caratterizzati da colori differenti, consentendo un'associazione più diretta ed agevole tra le linee di test e gli analiti d'interesse. Usando questa strategia, si è recentemente sviluppato un LFIA multianalita multicolore [8]. Per sviluppare questo test, si è sfruttata la forte dipendenza della banda SPR delle nanoparticelle d'oro dalla loro dimensione e forma. Di conseguenza, sintetizzando nanoparticelle d'oro di forma non sferica, si sono ottenute particelle caratterizzate da una banda SPR intorno a 620 nanometri, che si riflette nel colore blu del colloide (Fig. 2). Dopo aver verificato la fattibilità dell'impiego delle nanoparticelle non sferiche come marcatore in LFIA, si è valutata la possibilità di un loro impiego simultaneo con le classiche nanoparticelle sferiche. L'assenza di interazioni tra i due colloidi, una volta miscelati, ha permesso di procedere con lo sviluppo del LFIA multicolore.

Come sistema modello si è scelto la rivelazione dell'aflatossina B1 (AFB1) e della fumonissina B1 (FMB1) nelle farine di mais. Queste micotossine sono normate dall'Unione Europea [9, 10] ed il loro controllo risulta di fondamentale importanza per la sicurezza alimentare. Dopo la messa a punto di tutti i parametri e del sistema di estrazione, si è valutata la sensibilità analitica del test andando a determinarne il LOD visivo. Questo parametro è stato definito come la minima concentrazione di micotossina risultante in un'intensità della linea di test significa-

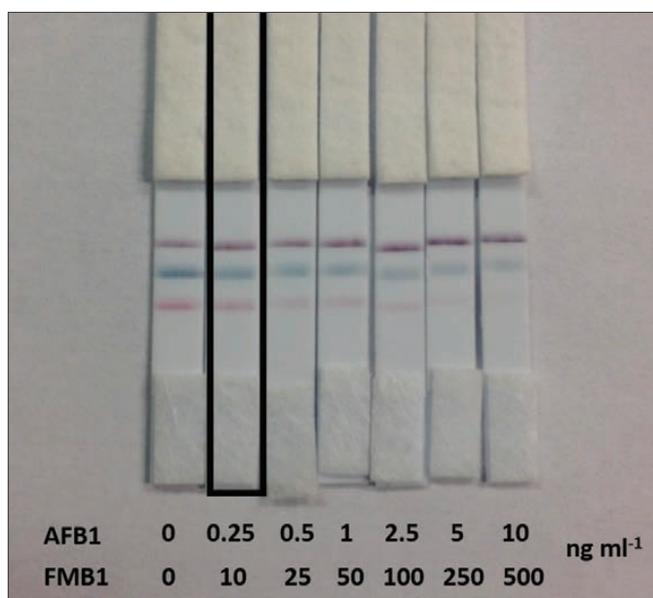


Fig. 3 - Immagine fotografica della determinazione dei LOD visivi per aflatoxina B1 e fumonisina B1. In nero è evidenziata la *strip* corrispondente ai LOD per le due micotossine

tivamente più bassa di quella di un campione bianco, questo perché, essendo un test competitivo, si ha una diminuzione del segnale all'aumentare della concentrazione di analita (Fig. 3).

Analizzando, con il test sviluppato, 18 campioni reali precedentemente dosati mediante metodi di riferimento, si è ottenuta una soddisfacente figura di merito, con nessun falso negativo ed una percentuale molto bassa di falsi positivi (3,7%), dimostrando ottime affidabilità e robustezza.

Dato che i colloidi di metalli nobili si prestano molto bene ad essere impiegati come marcatori colorati nei LFIA, per incrementare il numero di analiti discriminabili in base al colore del marcatore, si è anche preso in considerazione l'impiego di nanoparticelle d'argento di forma sferica. Tale colloide, presentando una banda SPR attorno ai 400 nm, è caratterizzato da un colore giallo. In Fig. 4 è riportata



Fig. 4 - Immagine fotografica di una *strip* per la rivelazione simultanea di 3 micotossine, impiegando come marcatori: nanoparticelle d'oro sferiche (rosso), non sferiche (blu) e nanoparticelle d'argento sferiche (giallo)

un'anteprima dell'uso simultaneo di nanoparticelle d'oro e d'argento per la rivelazione simultanea di 3 micotossine: ocratossina A (OTA), FMB1 e AFB1. In conclusione, l'impiego di marcatori caratterizzati da colori differenti può rendere significativamente più semplice la valutazione di un test LFIA in formato multianalita. Tuttavia, viste le limitazioni dovute ai colori nettamente discriminabili dall'occhio umano, tale strategia non può essere applicata per incrementare esponenzialmente il numero di analiti rivelabili simultaneamente.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Prakash *et al.*, *Advances in colloid and interface science*, 2015, **226**, 187.
- [2] <https://homehealth-uk.com/all-products/10-drug-multipanel-test-bup/>
- [3] <http://www.rapidexams.com/Tox-Cup-Cli-Waived-14-panel-drug-test-p/dt14.htm>
- [4] <https://www.screenpharmashop.com/droga-test/droga-test-urina-10.html>
- [5] X. Li *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **49**, 426.
- [6] S. Song *et al.*, *Analytical Chemistry*, 2014, **86**, 4995.
- [7] S. Han *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 2016, **927**, 64.
- [8] F. Di Nardo *et al.*, *Microchimica Acta*, 2017, **184**, 1295.
- [9] Regolamento della Commissione (CE) No. 165, GU Unione Europea, 2010, L 50, 8.
- [10] Regolamento della Commissione (CE) No. 1126, GU Unione Europea, 2007, L 255, 14.

#### Multiplex Colorimetric Lateral Flow Immunoassays

The Lateral Flow Immunoassay (LFIA) is one of the most successful analytical format for "point-of-need" analysis. Conventional LFIA can only detect one target molecule at one time. The new challenge in this area is the development of multiplex LFIA. The employment of noble metal nanoparticles, characterized by different colors, can facilitate the simultaneous visual detection of multiple analytes on a single device.



MAURIZIO PIERGIOVANNI, ACHILLE CAPPIELLO, GIORGIO FAMIGLINI,  
VERONICA TERMOPOLI, PIERANGELA PALMA  
DISPEA - UNIVERSITÀ di URBINO  
M.PIERGIOVANNI1@CAMPUS.UNIURB.IT

## DLLME PER L'ESTRAZIONE DI BDZ

***È stato sviluppato un protocollo DLLME (Dispersive Liquid Micro Liquid Extraction) per la determinazione di 8 benzodiazepine (BDZ) in bevande. Sono stati ottimizzati volume e tipo dei solventi, forza ionica e uso di ultrasuoni ed il protocollo è stato validato ICH. I recuperi ottenuti di 14,30%-103,28% sono comparabili con la MEPS (Micro Extraction by Packed Sorbents) di 20,90%-101,88%.***

La tematica ambientale è stata uno dei punti su cui si è basato lo sviluppo mondiale negli ultimi decenni; la chimica, essendo tra i settori a maggior impatto, ha svolto un ruolo di protagonista. Nel 1996 Paul Anastas pubblicò una serie di linee guida raccolte sotto il nome di "green chemistry" con l'obiettivo di riassumere il nuovo modo di pensare la chimica del futuro [1]. Anche l'analitica, nonostante il limitato impatto ambientale, ne è stata fortemente influenzata: cromatografia e preparativa sono stati gli ambiti di maggior progresso. Per quanto riguarda la preparativa, varie tecniche estrattive "green" su scala micro sono state sviluppate; tra queste emerge la "dispersive liquid-liquid micro extraction" DLLME. Questa metodica, presentata da Assadi nel 2006, è basata su un insieme di 4 componenti: il campione acquoso, un sale per enfatizzare la forza ionica, un solvente organico non miscibile con l'acqua (estrattore) ed un solvente organico miscibile con entrambi (dispersivo). Il sistema bifasico risultante viene agitato meccanicamente o con ultrasuoni (ultrasound assisted, UA-DLLME) in modo da formare una fine dispersione di fase organica all'interno della matrice acquosa; l'incremento dell'interfase massimizza il trasferimento di materia ed i recuperi. Le fasi vengono poi separate per centrifugazione e la parte organica prelevata. La DLLME è una tecnica versatile in grado di adattarsi alle applicazioni più disparate con poche modifiche e senza attrezzatura dedicata; ciononostante, l'attuale impossibilità di automatizzarla ne ha ridotto la diffusione nel routinario mentre il requisito di idrofobicità del solven-

te estrattore limita il range di composti estraibili. Altra tecnica preparativa a carattere "green" è la "micro extraction by packed sorbent" (MEPS). In questo caso l'estrazione è di tipo solido-liquido ed il principio fisico che ne sta alla base è l'affinità tra la fase adsorbente e gli analiti in maniera simile alla SPE. Nella MEPS viene impiegata una siringa automatizzata nella quale, tra ago e pistone, è interposta una cartuccia recante la fase; in questo modo il campione aspirato vi passa attraverso e solo i composti chimicamente affini vi interagiscono. Seguono eventuali lavaggi ed infine l'eluizione. La disponibilità di fasi con caratteristiche diverse rende la MEPS una tecnica flessibile e molto selettiva, pregi che si sommano alla possibile automatizzazione. Ciononostante la MEPS richiede trattamenti preliminari in quanto i campioni devono essere privi di particolato e a bassa viscosità; i costi legati all'attrezzatura sono un altro svantaggio. Entrambe queste tecniche trovano una valida applicazione in ambito forense, circostanza in cui i campioni sono di ridotta quantità. Nei "Drug Facilitated Crime" (DFC) il malcapitato viene inibito attraverso la somministrazione di sostanze psicotrope tramite la manipolazione di bevande solitamente alcoliche. Data la loro facile reperibilità nel mercato farmaceutico le benzodiazepine sono lo psicofarmaco più impiegato nei casi di DFC. I reperti rinvenuti sono i residui della bevanda assunta; il volume di questo "fondo di bicchiere" è solitamente inferiore al millilitro e richiede l'impiego di tecniche preparative efficaci anche con quantità così ridotte.

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

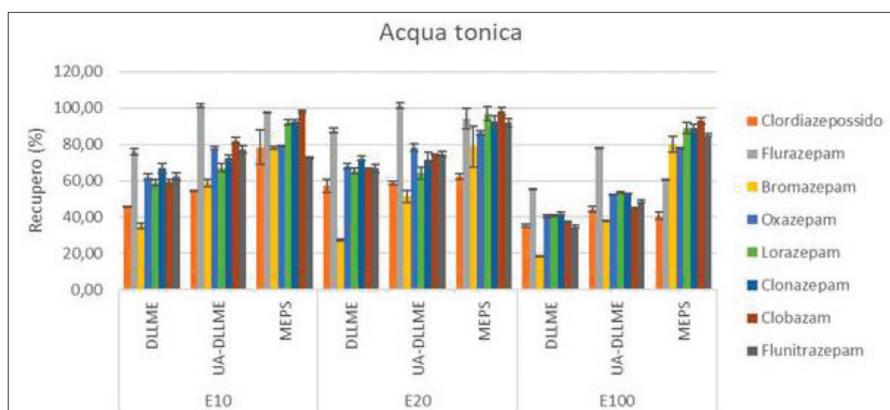


Fig. 1 - Recuperi nella matrice acqua tonica ottenuti con le 3 tecniche su campioni a 10, 20 e 100 ng/μL

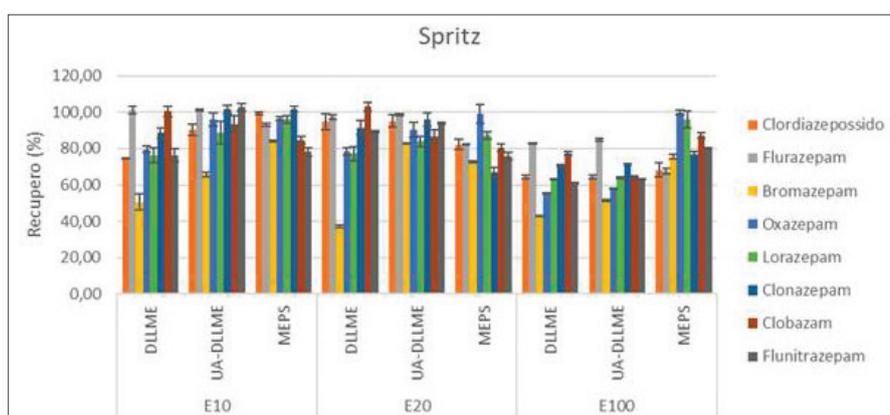


Fig. 2 - Recuperi nella matrice spritz ottenuti con le 3 tecniche su campioni a 10, 20 e 100 ng/μL

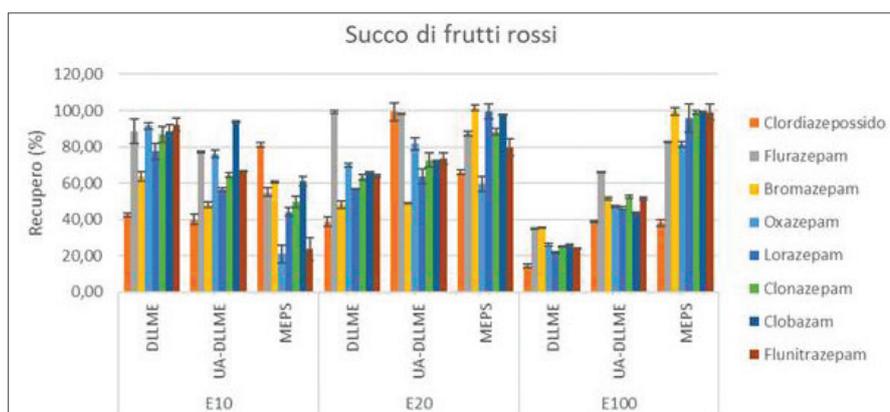


Fig. 3 - Recuperi nella matrice succo di frutti rossi ottenuti con le 3 tecniche su campioni a 10, 20 e 100 ng/μL

L'oggetto di questa ricerca è stato lo sviluppo di un protocollo DLLME per l'estrazione di 8 benzodiazepine (clordiazepossido, flurazepam, bromazepam,

NaCl. Le estrazioni sono state ripetute sia con agitazione manuale (DLLME) che con ultrasuoni (UA-DLLME). I risultati sono stati comparati a quelli ottenuti

oxazepam, lorazepam, clobazam, clonazepam e flunitrazepam) in 3 bevande di uso comune. Coerentemente con i principi della "green chemistry" la tecnica analitica scelta è stata la cromatografia liquida capillare con rivelatore UV-visibile (HPLC-UV) in modo da combinare efficienza cromatografica, ridotto consumo di fase mobile, stabilità di risposta e bassi costi.

Le matrici scelte sono state un'acqua tonica, un succo di frutti rossi ed uno spritz. Tutte presentano un'elevata concentrazione di glucosio, potenziali interferenti UV (spritz e succo), presenza di CO<sub>2</sub> (spritz e acqua tonica) e particolato solido (succo). I campioni (E10, E20 ed E100) sono stati preparati a 10, 20 e 100 ng/μL in modo da replicare le concentrazioni da DFC. Centrifugazione e degassaggio sono stati effettuati preventivamente all'estrazione MEPS per evitare l'occlusione e l'aspirazione di bolle. La DLLME è stata condotta direttamente sui campioni tal quali. L'antracene è stato scelto come standard interno per normalizzare l'efficienza estrattiva.

Il protocollo DLLME è stato sviluppato "ex-novo" sulla base di dati di letteratura. I principali parametri, come tipologia e volume di solvente estraente, di solvente dispersivo, concentrazione di NaCl, sono stati oggetto di ottimizzazione. Le migliori prestazioni per l'estrazione di 1 ml di campione sono state individuate in 200 μL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (estrattore), 300 μL di CH<sub>3</sub>CN (dispersivo) e 250 mg di

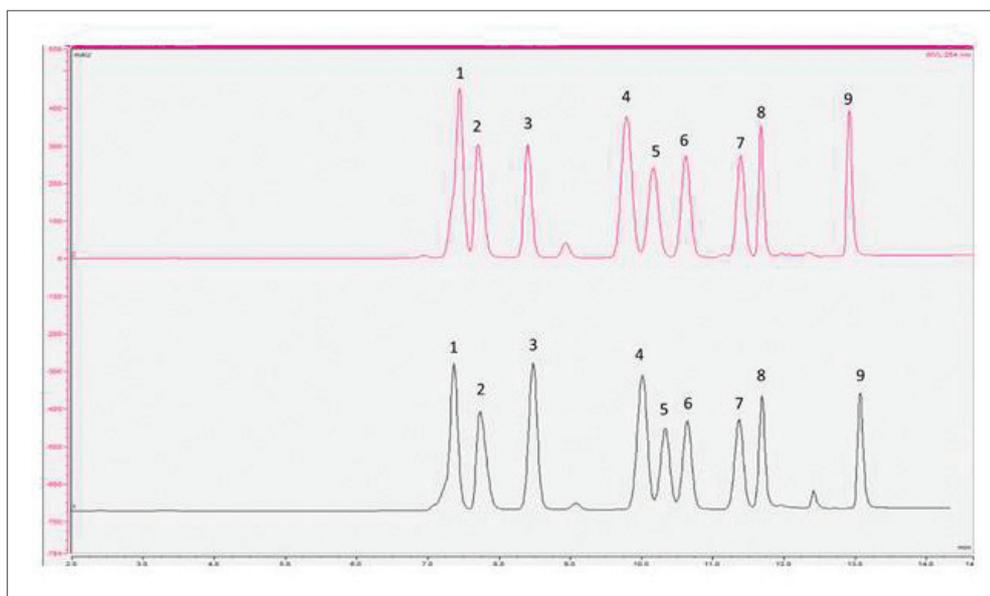


Fig. 4 - Cromatogramma HPLC-UV del campione DLLME E100 (viola) comparato alla miscela standard (nero). I picchi corrispondono a: 1-clorodiazepossido; 2-flurazepam; 3-bromazepam; 4-oxazepam; 5-lorazepam; 6-clobazam; 7-clonazepam; 8-flunitrazepam; 9- standard interno

con il protocollo MEPS sviluppato da Magrini *et al.* [2]. I recuperi nell'acqua tonica (Fig. 1) mostrano buone prestazioni della DLLME per le concentrazioni più basse (E10 ed E20) e meno incoraggianti per E100; la procedura UA-DLLME garantisce un aumento nei recuperi fino al 25,5%. La matrice, ricca di glucosio (9% m/V), instaura forti ponti a idrogeno che trattengono gli analiti nella matrice. L'estrazione MEPS garantisce risultati migliori ed indipendenti dalle concentrazioni, eccezion fatta per il flurazepam.

Le prestazioni risultano decisamente migliori nello spritz (Fig. 2) in quanto le differenze tra le 3 tecniche sono ridotte; la MEPS emerge rispetto alle DLLME solo nella E100. La presenza di etanolo (10% v/v) nella matrice influisce positivamente sul trasferimento di materia.

Il succo di frutti rossi è la matrice più complessa e questo influenza i recuperi (Fig. 3). La MEPS risulta fortemente penalizzata nel campione E10 mentre le DLLME nella E100. La UA-DLLME migliora i recuperi nella E20 ed E100 ma la DLLME classica è superiore nella E10.

Il protocollo è stato validato ICH valutandone tempo di ritenzione ( $t_r$ ), linearità, LOQ, ripetibilità intra-giorno ed inter-giorno. Le rette, acquisite sia in soluzioni standard che matrice DLLME e MEPS, han-

no mostrato un  $R^2$  compreso tra 0,9955 e 0,9999 e pendenze pressoché identiche. Il  $t_r$  è risultato avere un RSD compreso tra 0,07% e 0,17% per entrambi i metodi. La riproducibilità è stata valutata nel campione a maggior complessità (succo di frutti rossi E20) analizzando lo stesso campione 5 volte al giorno per 5 giorni consecutivi. La RSD intra-giorno è compresa tra 0,17% e 4,28% mentre la inter-giorno tra 0,78% e 6,29%, dimostrando un'ottima ripetibilità dell'analisi. Anche

il numero dei piatti teorici misurati sullo standard interno, acquisiti ad ogni separazione, è risultato stabilmente tra 142764 e 121093, a dimostrazione della stabilità di risposta. Nel protocollo DLLME sviluppato non sono stati rilevati composti della matrice co-estratti (Fig. 4).

## BIBLIOGRAFIA

- [1] P.T. Anastas, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1999, **29**, 167.
- [2] L. Magrini, A. Cappiello, G. Famigliani, P. Palma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, **125**, 48.

### DLLME extraction of BDZ

A Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction (DLLME) protocol for the determination of 8 benzodiazepines (BDZ) in beverages was developed. Solvents volume and type, ionic strength and ultrasounds assistance were optimized. The method was validated following the ICH guidelines. The recoveries spanned from 14.30%-103.28% with DLLME while MEPS (Micro Extraction by Packed Sorbents) gave 20.90%-101.88%.



VALENTINA MARASSI, BARBARA RODA, ANDREA ZATTONI, PIERLUIGI RESCHIGLIAN  
LABORATORIO DI SCIENZE DELLE SEPARAZIONI  
DIPARTIMENTO DI CHIMICA "G. CIAMICIAN"  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
VALENTINA.MARASSI2@UNIBO.IT

# STRATEGIE PER SEMPLIFICARE CAMPIONI ALTAMENTE COMPLESSI E CARATTERIZZARE VESCICOLE EXTRACELLULARI: ACCOPPIAMENTO DI TECNICHE ORTOGONALI E FRAZIONAMENTO IN CAMPO FLUSSO-FLUSSO A FIBRA TUBULARE POROSA

*La capacità di arricchire campioni di nanoparticelle biologicamente rilevanti è cruciale per poter investigare meccanismi molecolari e di signaling cellulare: l'inserimento di un'ulteriore dimensione analitica è fondamentale per semplificare e comprendere dinamiche - e campioni- estremamente complessi.*

Nel corso della loro vita, le cellule rilasciano nella matrice extracellulare una molteplicità di vescicole, sia spontaneamente che sotto stimolo (come ad esempio una patologia o variazione delle condizioni di coltura *in vitro*). In particolare, le vescicole di dimensioni tra i 30 e i 100 nm (esosomi) sono secrete da diversi tipi di cellule in seguito alla fusione di endosomi e lisosomi con la membrana plasmatica [1, 2]. La funzione biologica di questi sistemi (Fig. 1) è fondamentale ed estremamente varia, anche perché essa è dipendente dalla cellula di origine: tra le funzioni espletate dagli esosomi vi è la comunicazione intercellulare, lo scambio di materiale di membrana tra cellule e la immunomodulazione su cellule target, sia come antigeni che come vettori di proteine, DNA, RNA e frammenti nucleici [3].

La complessità del contesto biologico delle micro- e nanovesicicole le rende un argomento di estremo

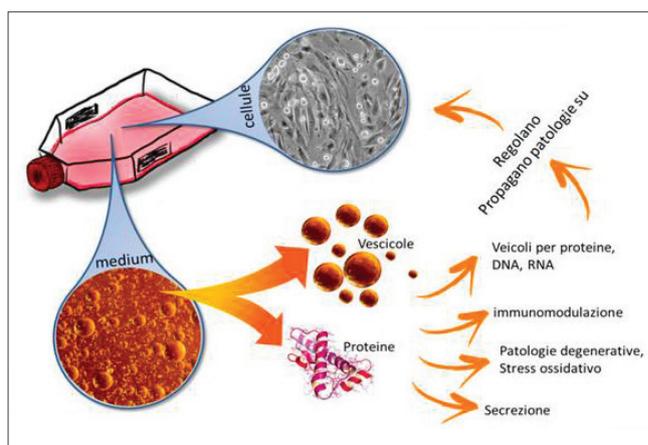


Fig. 1 - Contesto biologico delle particelle extracellulari e loro interazione con l'ambiente cellulare

interesse per la comunità scientifica e per quella chimico bio-analitica in particolare, nei vari aspetti del loro studio: caratterizzazione, quantificazione,

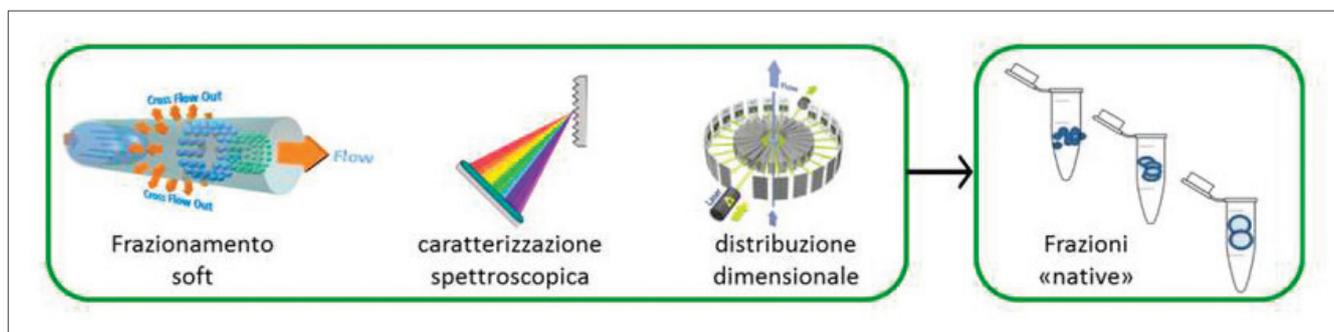


Fig. 2 - Contributo della piattaforma analitica HF5-UV-MALS

composizione chimica ed effetto biologico. Singole popolazioni hanno contenuto e ruolo differente, e la comprensione dei vari meccanismi in gioco permette lo studio approfondito di dinamiche come la carcinogenesi; inoltre, la versatilità e la completa integrabilità nei sistemi biologici rende queste vescicole interessanti candidati per applicazioni in nanomedicina, ad esempio come sistemi per drug-delivery. Una delle questioni principali per quanto riguarda la caratterizzazione di vescicole extracellulari (extracellular vesicles, EVs), però, è la difficoltà di separarle dalla restante matrice extracellulare, unita alla mancanza di metodi efficaci e rapidi di determinarne le dimensioni. L'isolamento delle EVs è un procedimento lungo e che comporta perdita di campione, come sequenze di ultrafiltrazione, ultracentrifugazione, centrifugazione a gradiente di densità e citofluorimetria, che presentano numerosi svantaggi economici e pratici, tra cui la non omogeneità del campione selezionato [4]. Nel corso della mia ricerca, presso il laboratorio di Scienze delle Separazioni del Dipartimento di Chimica G. Ciamician (Università di Bologna), il punto focale è lo sviluppo di metodi analitici che possano semplificare campioni complessi come quelli biologici in maniera rapida, selettiva ma soprattutto nativa, senza alterare le proprietà di un campione così delicato. La tecnica di elezione nel mio lavoro è il frazionamento in campo flusso-flusso (flow field-flow fractionation, FFFF), che permette di effettuare analisi di campioni nanostrutturati in condizioni native. Infatti, la separazione avviene all'interno di un canale capillare vuoto, in assenza di fase stazionaria, per effetto di un flusso idrodinamico (campo) generato ortogonalmente rispetto al flusso principale

di fase mobile [5]. Gli analiti interagiscono con il campo in base al loro coefficiente di diffusione e, di conseguenza, vengono eluiti in base alla propria dimensione idrodinamica (raggio idrodinamico,  $r_h$ ). L'assenza di fase stazionaria elimina le limitazioni generalmente presenti nella scelta delle fasi mobili, e rende la tecnica facilmente accoppiabile a un sistema di multidetection (Fig. 2): l'utilizzo in serie di detector UV e laser scattering multiangolo (MALS) fornisce sia informazioni spettroscopiche, come la valutazione della purezza proteica/nucleica e del contenuto delle vescicole, sia informazioni morfologico-dimensionali, come il raggio di girazione e il fattore di forma; non da ultimo, è possibile lavorare in condizioni fisiologiche simulando l'ambiente biologico da cui il campione proviene [6]. Un altro vantaggio di questa tecnica, e in particolare della sua versione miniaturizzata (hollow-fiber flow field-flow fractionation, HF5), che permette di ridurre la diluizione del campione in analisi, è la possibilità di raccogliere frazioni ulteriormente lavorabili [7]. Come menzionato, nell'ambito della caratterizzazione delle vescicole extracellulari vi è necessità di ideare nuove strategie per purificare o sottofrazionare popolazioni esosomali, garantire un controllo qualità delle frazioni ottenute e integrare le tecnologie utili a determinare dimensioni e composizione delle particelle. In questo contesto, l'obiettivo della nostra corrente ricerca è di integrare la tecnica HF5 a quelle già usate per la caratterizzazione di EVs, e progettare metodi analitici *ad hoc* per massimizzare l'output analitico, permettendo di ottenere in una singola analisi: 1) sorting, 2) quantificazione, 3) caratterizzazione

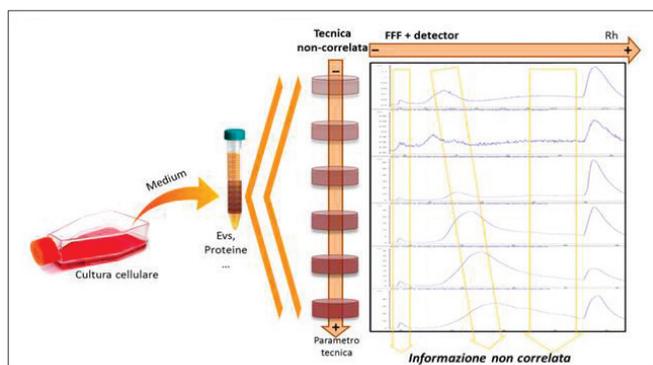


Fig. 3 - Schematica di analisi bidimensionale con piattaforma FFF

dimensionale e 4) caratterizzazione morfologica. Ciò può avvenire partendo da un campione complesso come un medium di coltura, o da campioni più raffinati già sottoposti a centrifugazione, per i quali si possa sviluppare una separazione bidimensionale frutto di principi separativi differenti (Fig. 3). Un altro auspicabile utilizzo della piattaforma fluidica è quello del riconoscimento di determinati gruppi esosomali attraverso l'uso di marker, studio ad ora impossibile per l'impraticità della procedura di tag. In collaborazione con il gruppo di Scienze Biomolecolari dell'Università di Urbino, stiamo focalizzando l'attenzione su medium di coltura derivanti da mioblasti. Essi, se condizionati, secernono due tipi di vescicole derivanti dalle membrane: nanovesicole aventi le proprietà tipiche degli esosomi, e specie più grandi, morfologicamente distinte [8]. Mediante l'analisi in condizioni fisiologiche, è stato possibile caratterizzare queste sottopopolazioni (derivanti da centrifugazione differenziale) ed evidenziare sia l'effettivo arricchimento (ma non isolamento) di esosomi e microvescicole, sia la presenza di una popolazione macroaggregata che rappresenta una porzione significativa del campione. Inoltre, è stato possibile descrivere le differenze tra le varie popolazioni in termini di contenuto (prettamente proteico per quanto riguarda gli esosomi, parzialmente nucleico per le microvescicole), dimensione e abbondanza relativa di queste specie. Inoltre, le sottofrazioni di partenza, in un mix simulato, possono essere ri-separate nelle loro componenti, dimostrando la validità e l'efficacia della piattaforma HF5-UV-MALS anche come potenziale sostituto di pretrattamenti del campione. Esperimenti promettenti sono in corso riguardo l'accoppiamento della

piattaforma HF5 con la centrifugazione a gradiente di densità che, separando secondo un principio non-correlato, permette una piena ortogonalità tra le tecniche. In conclusione, l'attività di ricerca del nostro laboratorio permette di fornire informazioni riguardo alla popolazioni e sottopopolazioni di esosomi e - più in generale - campioni di bioparticelle, per effettuare screening di diverse fonti *in vitro* ed *ex vivo*, con lo scopo di selezionare le popolazioni con maggiore carattere diagnostico, e di purificare le frazioni contenenti le informazioni ricercate (DNA/RNA, markers in seguito a marcatura...).

## BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Praticchizzo, A. Giuliani, V. De Nigris *et al.*, *Diabetes Obes. Metab.*, 2016, 855.
- [2] S. Ohno, G.P. Drummen, M. Kuroda, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **27**, 172.
- [3] M. Guescini, S. Genedani, V. Stocchi *et al.*, *J. Neural Transm.*, 2010, **117**, 1.
- [4] R. Szatanek, J. Baran *et al.*, *Int. J. of Mol. Med.*, 2015, **36**(1), 2015.
- [5] V. Marassi, B. Roda, S. Casolari *et al.*, *Microc. J.*, 2018, **136**, 149.
- [6] A. Zattoni, B. Roda, F. Borghi *et al.*, *JPBA*, 2014, **87**, 53.
- [7] V. Marassi, L. Di Cristo *et al.*, *RSOS*, 2018, **5**(1), 171113.
- [8] M. Guescini, D. Guidolin, L. Vallorani *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 2010, **316**(12), 1977.

### Tools to Simplify Highly Complex Biological Media and Characterize Extracellular Vesicles: Hyphenation of Orthogonal Techniques to Hollow-Fiber Flow Field-Flow Fractionation

The ability of separating and enriching biologically relevant nanoparticles, such as exosomes, is crucial to better investigate specific molecular and signaling patterns: a soft separation step such as flow field-flow fractionation, coupled with a multidetection platform, can add another dimension and provide uncorrelated information to the existing characterisation techniques and give insight to unravel such complex dynamics.



VERONICA TERMOPOLI, GIORGIO FAMIGLINI, PIERANGELA PALMA,  
MAURIZIO PIERGIOVANNI, ACHILLE CAPPIELLO  
LABORATORIO CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA E SPETTROMETRIA DI MASSA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE PURE ED APPLICATE  
VERONICA.TERMOPOLI@UNIURB.IT

## LC-EI-MS: UN NUOVO APPROCCIO STRUMENTALE

*In questo lavoro viene presentato un nuovo strumento, chiamato Liquid-EI (LEI), capace di interfacciare efficacemente la cromatografia liquida (LC) con la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica (MS). L'interfaccia LEI è completamente indipendente e può essere adattata ad ogni sistema GC-MS per una rapida conversione ad LC-MS. Il suo funzionamento verrà di seguito descritto.*

La cromatografia liquida ad alte prestazioni e la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica sono due tecniche di analisi che, in linea teorica, sembrano essere incompatibili. La prima necessita di condizioni di lavoro diametralmente opposte a quelle richieste per il corretto funzionamento di uno spettrometro di massa a ionizzazione elettronica, quali: temperatura ambiente, alta pressione e campione in fase liquida. Viceversa, la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica richiede: alta temperatura, alto vuoto ed il campione in fase gassosa. L'uso combinato delle due tecniche però, qualora possibile, sarebbe di grande aiuto in numerose applicazioni come l'analisi di molecole con peso molecolare medio-piccolo (<1000 Dalton). Un LC-MS con sorgente EI consentirebbe infatti l'acquisizione di spettri di massa altamente informativi (tipici della ionizzazione elettronica) e la simultanea determinazione di composti con diverse caratteristiche chimico-fisiche, il tutto con un unico strumento a basso costo e di facile utilizzo. La base scientifica di tale ricerca si fonda sulla certezza che la ionizzazione elettronica possa contribuire a migliorare le analisi LC-MS delle molecole organiche a basso-medio peso molecolare, facilitando la loro identificazione (per mezzo di librerie elettroniche), fornendo informazioni strutturali in caso di sostanze incognite, velocizzando le analisi LC-MS attraverso l'utilizzo di software di deconvoluzione e permettendo l'analisi quali-quantitativa degli analiti in esame. Questa cer-

tezza ha spinto il gruppo di ricerca del Prof. Cappiello a compiere numerosi sforzi per sviluppare un moderno ed efficiente sistema LC-MS basato sulla ionizzazione elettronica.

La prima interfaccia, chiamata Direct-EI [1] per enfatizzare la semplicità con cui avveniva la connessione tra il cromatografo e lo spettrometro di massa, consisteva in un capillare che entrava direttamente nella sorgente dello spettrometro di massa e dal quale fluiva la fase mobile proveniente da un nano-HPLC. Nebulizzazione e successiva vaporizzazione di solvente ed analiti, seguite immediatamente dalla loro ionizzazione, si verificavano tutte in sorgente in condizioni di alto vuoto ed alta temperatura (Fig. 1). Il Direct-EI è stato utilizzato con successo in diverse applicazioni [2-4] che hanno dimostrato come la ionizzazione elettronica può contribuire a migliorare le analisi LC-MS. I dati ottenuti hanno dimostrato che, da un punto di vista applicativo, questa tecnica si distingue da quelle a pressione atmosferica commercialmente disponibili per una minore dipendenza dalla polarità degli analiti, dalla composizione della fase mobile e dalla presenza di una matrice complessa. La possibilità di utilizzare la ionizzazione elettronica in LC consente di produrre spettri di massa riproducibili e caratteristici per un gran numero di sostanze di basso-medio peso molecolare che non possono essere analizzate mediante LC, come i pesticidi organoclorurati [5]. Inoltre, a differenza delle comuni interfacce LC-MS, l'interfaccia Direct-EI non

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.



è soggetta ad effetto matrice, data la ionizzazione di tipo fisico su cui si basa [6]. Partendo da questi risultati, il nostro gruppo di ricerca si è focalizzato sui punti deboli dell'interfaccia, quali: occlusione occasionale del capillare di nebulizzazione, impossibilità di superare i 350 °C di temperatura in sorgente, difficoltà nel riposizionare correttamente il capillare nelle operazioni di ordinaria manutenzione, per cercare di sviluppare un'interfaccia che potesse superare questi limiti. Il risultato è stato lo sviluppo di un nuovo prototipo, chiamato LEI (Liquid Electron Ionization), che

ha rappresentato una vera e propria rivoluzione. La nuova interfaccia, a differenza del Direct-EI dove la conversione da fase liquida a fase gassosa del soluto dipendeva quasi interamente dalla posizione del capillare e dalla geometria della sorgente, porta i processi di nebulizzazione e vaporizzazione fuori dalla zona di alto vuoto della sorgente dello spettrometro di massa con il risultato di essere completamente indipendente dal resto della strumentazione. Questa caratteristica permette al LEI di adattarsi a qualsiasi sistema GC-MS, per una veloce conversione in LC-MS. Inoltre, con alcuni accorgimenti può essere utilizzata con qualsiasi sistema HPLC. Le pompe a nano flussi e flussi capillari possono essere collegate direttamente, mentre l'HPLC convenzionale richiede l'uso di uno splitter a due vie per ridurre il flusso ad un valore compatibile con il vuoto presente in sorgente, normalmente compreso tra 0,5 e 1 µL/min. Le ottime prestazioni che la nuova interfaccia ha già dimostrato sono dovute in parte alla differente conversione della fase liquida in fase gassosa che prima avveniva in sorgente in alto vuoto ed ora in una specifica zona dell'interfaccia esterna alla sorgente dello spettrometro, chiamata "camera di vaporizza-

zione" (VMC), progettata per dividere appunto gli ambienti a diversa pressione: il sistema HPLC (zona a pressione ambiente) e la sorgente di ionizzazione (zona a bassissima pressione). Nella VMC, grazie alla sua lunghezza ed al suo diametro molto ridotto, esiste un gradiente di vuoto tale da mantenere la zona di vaporizzazione poco al di sotto della pressione atmosferica, consentendo che la conversione liquido-gas avvenga praticamente a pressione atmosferica. Il passaggio di stato viene completamente assicurato e l'adsorbimento degli analiti sulla superficie della VMC ridotto al minimo per la presenza di uno specifico rivestimento in silice, definito liner, posizionato lungo tutta la VMC. Un secondo capillare di silice di diametro inferiore, definito inlet, penetra nella prima porzione del liner e vi rilascia l'eluato proveniente dall'HPLC. Un gas inerte (He) viene fatto fluire nella VMC a supporto del gradiente di vuoto per un migliore e più rapido trasferimento della fase gassosa nella sorgente dello spettrometro di massa (Fig. 2).

Questa configurazione ha ridotto al minimo gli episodi di occlusione dell'inlet, riducendo notevolmente il tempo di residenza degli analiti nella zona ad alta temperatura e promuovendo così una loro im-

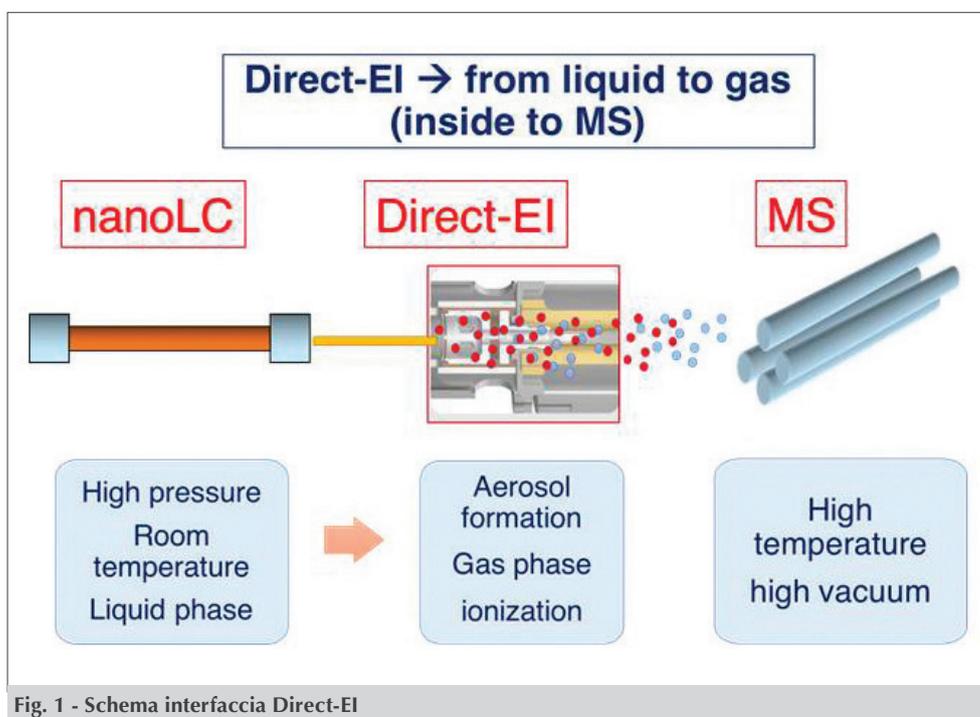


Fig. 1 - Schema interfaccia Direct-EI

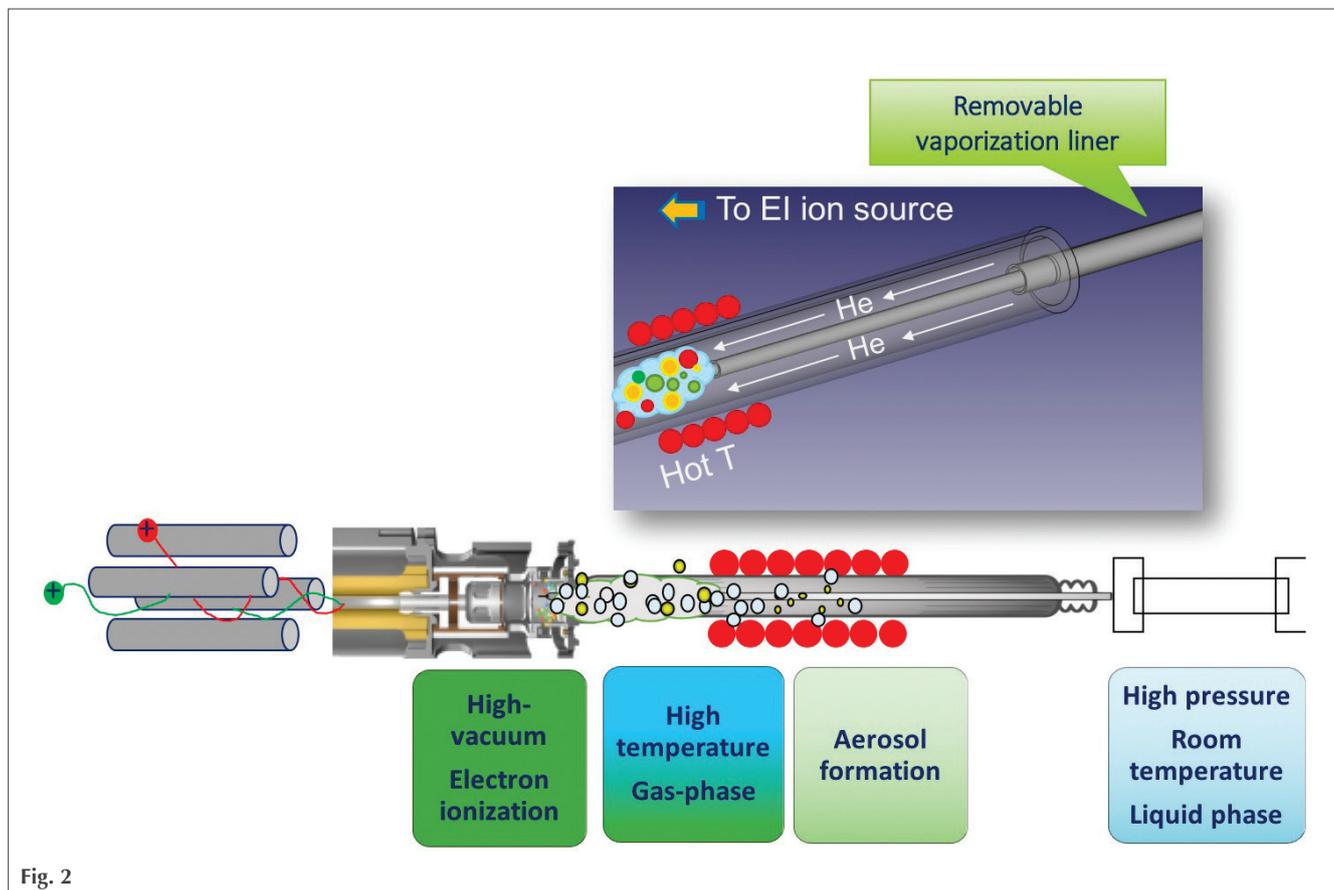


Fig. 2

mediata conversione in fase gassosa senza il rischio di degradazione termica. Il LEI è attualmente in fase di valutazione sia dal punto di vista strumentale che delle possibili applicazioni, i risultati ottenuti sono stati oggetto di recente pubblicazione [7]. La commercializzazione di una tale interfaccia permetterebbe di disporre di un ulteriore valido mezzo per la determinazione e l'analisi di numerose sostanze in vari campi di applicazione. Una freccia in più all'arco degli analisti!

## BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Cappiello, G. Famiglini *et al.*, *Anal. Chem.*, 2007, **79**(14), 5364. <https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/ac070468l>
- [2] H. Truffelli, G. Famiglini *et al.*, *Anal. and Bioanal. Chemistry*, 2011, **400**(9), 2933.
- [3] A. Cappiello, B. Tirillini *et al.*, *Phytochem. Analysis*, 2012, **23**(3), 191.
- [4] A. Cappiello, G. Famiglini *et al.*, *Anal. Chem.*,

2011, **83**(22), 8537.

- [5] G. Famiglini, P. Palma *et al.*, *Anal. Chem.*, 2009, **81**(17), 7373.
- [6] A. Cappiello, G. Famiglini *et al.*, *Anal. Chem.*, 2008, **80**(23), 9343.
- [7] V. Termopoli, G. Famiglini *et al.*, *Anal. Chem.*, 2017, **89**(3), 2049. <https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/acs.analchem.6b04646>

## LC-EI-MS: a New Instrumental Approach

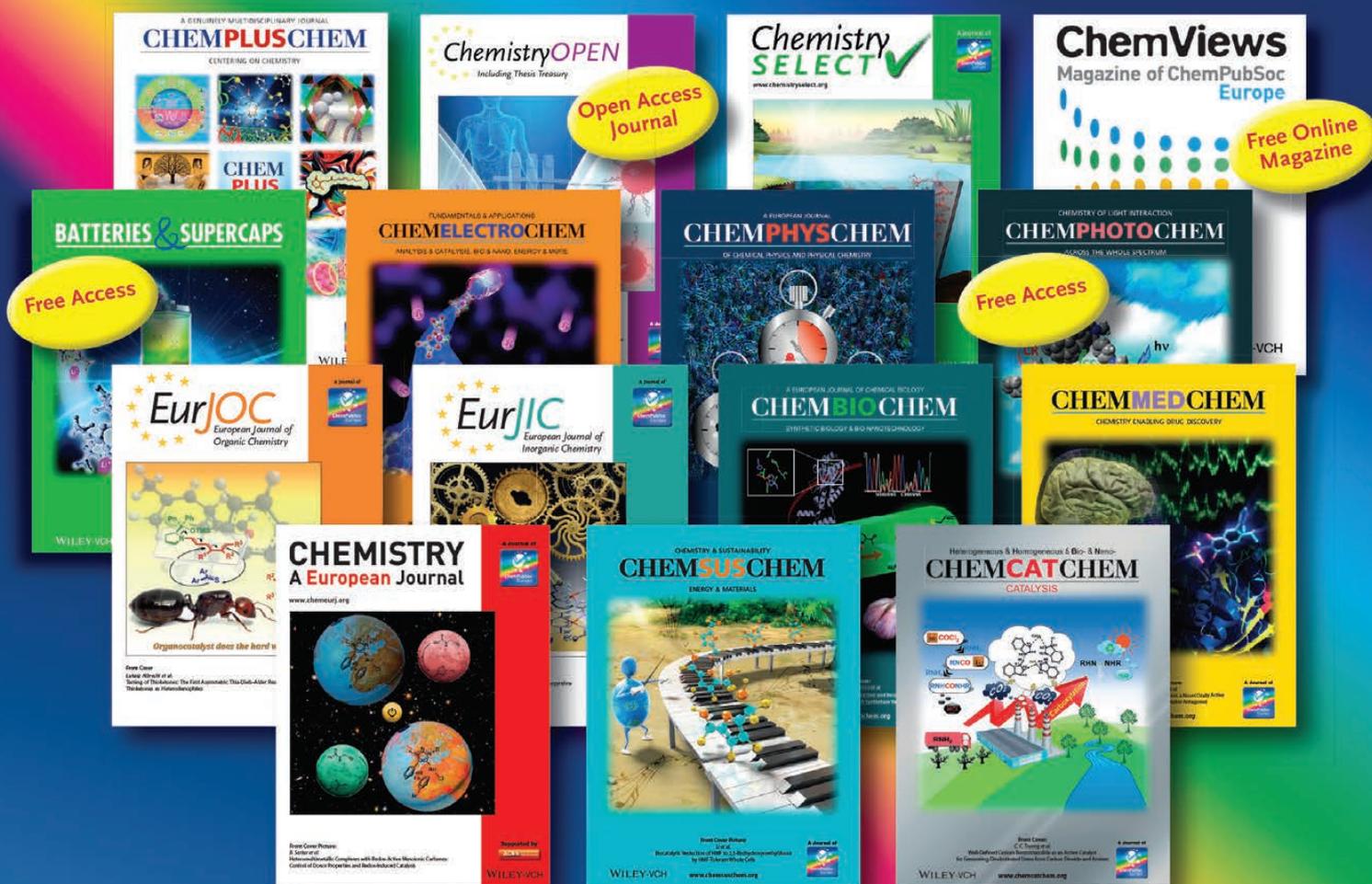
A new interface, called Liquid-EI (LEI), able to couple liquid chromatography (LC) and electron ionization mass spectrometry (MS), is presented. LEI is completely independent from the rest of the instrumentation and can be adapted to any gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) system, as an add-on for a rapid LC-MS conversion. Proof of concept of the interface is here described.

# Individual Member Rate of € 98,-\*

## for members of ChemPubSoc Europe societies



\*[electronic access to your favorite ChemPubSoc Europe title, without local VAT]

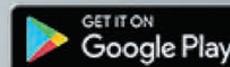


[www.onlinelibrary.wiley.com](http://www.onlinelibrary.wiley.com)



## One App

### 18 chemical society journals



Search for **ChemPubSoc Europe** in the stores

[www.chempubsoc.eu](http://www.chempubsoc.eu)

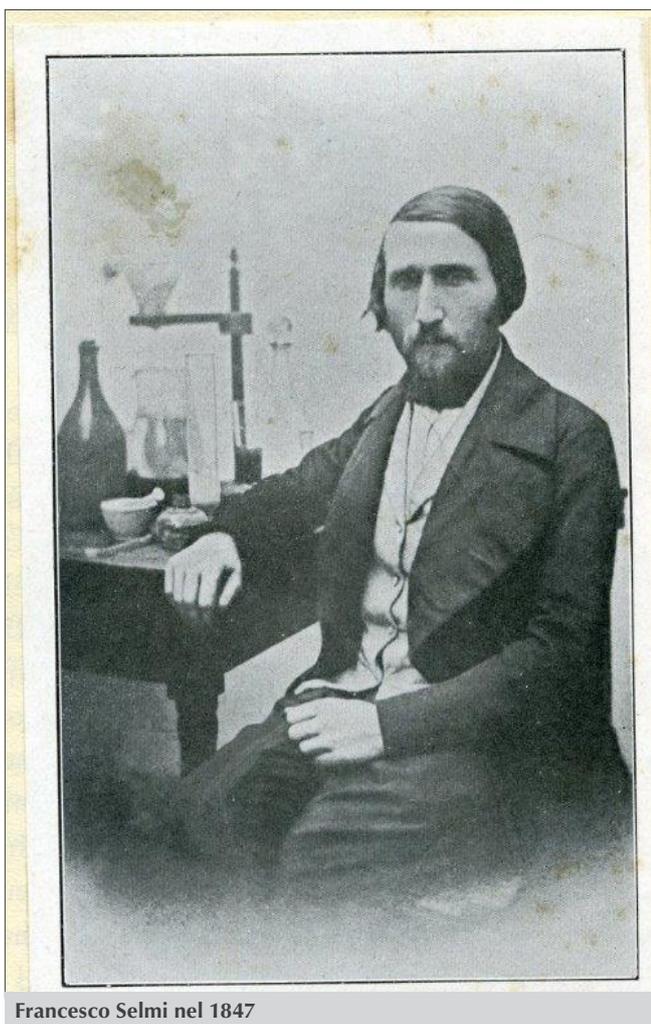
WILEY-VCH



MARCO TADDIA  
GRUPPO NAZIONALE DI FONDAMENTI E STORIA DELLA CHIMICA  
MARCO.TADDIA@UNIBO.IT

## FRANCESCO SELMI, SCIENZIATO ALIENO DAGLI APPLAUSI

*Sono trascorsi poco più di due secoli dalla nascita del chimico-tossicologo Francesco Selmi e Vignola, la cittadina emiliana che gli diede i natali, l'ha celebrato con un ciclo di manifestazioni. Qui lo ricordiamo non solo come scienziato e patriota ma anche per il suo impegno a favore dell'istruzione popolare.*



Francesco Selmi nel 1847

A parte i vignolesi che giustamente lo considerano, al pari dell'architetto tardo-rinascimentale Iacopo Barozzi (1507-1573) una gloria locale, in pochi, anche tra i chimici, si sono accorti che l'anno scorso correva il bicentenario della nascita di Francesco Selmi (Vignola, 1817 - Bologna, 1881). D'altronde, come scrisse Icilio Guareschi, "[Selmi] era alieno dagli applausi e non ha mai fatto discorsi o conferenze in cui continuamente e ripetutamente ricordasse le proprie ricerche o qualche sua benevolenza verso la scienza" [1]. Il trattato di Storia della Chimica di James Riddick Partington (1886-1965) contiene due brevi ma significative citazioni che lo riguardano [2]. La prima si riferisce al contributo sulle ptomaine (dal greco πτώμα, ptóma) pubblicato sul *Berichte* [3] e la seconda a quelli sulle pseudosoluzioni, che precedettero di poco i contributi fondamentali dello scozzese Thomas Graham (1805-1869) sullo stato colloidale. Le cosiddette ptomaine sono basi organiche velenose (es. neurina, putrescina, cadaverina ecc.) che presentano le reazioni generali degli alcaloidi e che si ritrovano nella carne putrefatta. Nell'elenco dei lavori di Selmi [1] ce ne sono diversi dedicati a tale argomento e quello del *Berichte* è solo un breve riassunto.

La scoperta delle ptomaine fu una tappa importante per la chimica forense in quanto permise di evitare che si attribuisse ad avvelenamento doloso, procurato con alcaloidi vegetali, la morte di soggetti



deceduti invece per cause naturali. Selmi era direttamente interessato a tali questioni perché gli furono affidate numerose perizie scientifico-legali e, come sperimentatore scrupoloso ed attento, era impegnato ad evitare errori che avrebbero potuto sviare le indagini giudiziarie. Ne abbiamo un esempio, tra i tanti, nelle “Ricerche chimico-tossicologiche sopra il cervello di uno che si avvelenò con fosforo” [4], orientate ad avvalorare tale eventualità in altri casi oggetto d’indagine. Il suo manuale intitolato “Nuovo processo generale per la ricerca delle sostanze venefiche”, pubblicato da Zanichelli nel 1875 [5], ne testimonia le ampie competenze e lo sforzo per ordinare tale materia in maniera sistematica. Oltre che sulla parte propriamente chimica, è interessante soffermarsi su alcuni saggi di tossicità ivi descritti, come quelli riportati al capitolo “Osservazioni nel caso di una perizia legale”. Selmi racconta che fu invitato dal Tribunale a verificare se nei visceri di un cadavere, disseppellito dopo venti giorni dalla tumulazione, ci fosse qualche sostanza venefica. Una volta estratto l’alcaloide dai visceri, la prassi richiedeva di sperimentarne la tossicità su animali viventi e di confrontare il risultato con la somministrazione di un campione dello stesso alcaloide preso dal laboratorio. Selmi condusse le sue prove su alcuni uccellini e il primo fu un *paronzolo*, ossia una cinciallegra. I piccoli animali erano, a quei tempi, le vittime sacrificali degli esperimenti. Così nella comunicazione “Sopra due arsine formatesi in uno stomaco di maiale salato con anidride arseniosa” leggiamo degli esperimenti compiuti dal Prof. Vincenzo Ciaccio (1824-1901) su alcune rane alle quali venivano iniettate le soluzioni degli alcaloidi estratti dal Selmi [6]. Le descrizioni degli effetti sono piuttosto crude e non lasciano indifferente il lettore sensibile. Per quanto riguarda invece i lavori di Selmi intorno alle emulsioni, alla coagulazione e alle pseudosoluzioni degli azzurri di Prussia, si rimanda alla letteratura che non manca di contributi qualificati [7].

La carriera accademica di Selmi non fu agevole, nonostante le numerose pubblicazioni nei campi sopracitati e in altri qui trascurati per brevità. Si occupò non solo di chimica tossicologica ma anche di chimica fisica (pila a triplice contatto), chimica inorganica, organica e biologica [1]. Ebbe finalmente la cattedra a Bologna ma solo all’età di cinquant’anni. Presso l’Alma Mater, Selmi insegnò Chimica Farmaceutica e si dedicò prevalentemente alla chimica tossicologica.

Si è accennato del suo impegno come patriota risorgimentale, una scelta che lo costrinse a lasciare il Ducato di Modena e a recarsi in esilio. Nel 1848 riparò a Torino, dove fu accolto nel laboratorio dell’amico Ascanio Sobrero (1812-1888), con il quale collaborò nelle ricerche sui composti dello zolfo, e che lo presentò anche all’Accademia delle Scienze [8]. Ebbe missioni non solo scientifiche ma anche politiche e, nel 1859, Cavour e La Farina lo incaricarono di promuovere l’insurrezione del Ducato di Modena, cosa che fece con un proclama inviato da Parma per incitare il popolo alla rivolta. Dopo l’Unità, Selmi divenne Capo di Gabinetto del



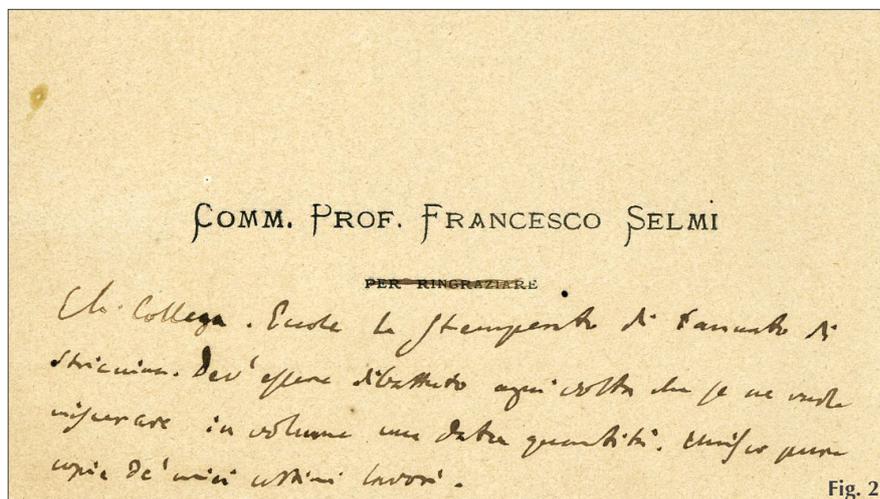
Fig. 1 - Francesco Selmi in età avanzata con la famiglia (per gentile concessione della Biblioteca Comunale di Vignola)

Ministro della Pubblica Istruzione e s'impegnò attivamente per il rinnovamento del sistema scolastico. All'epoca il tasso medio di analfabetismo nella Penisola sfiorava l'80% e si può facilmente immaginare che senso avesse parlare al popolo di cultura scientifica. Ciononostante, alcuni spiriti illuminati erano impegnati da anni nel processo di promozione delle classi meno abbienti, e anche su tale fronte Francesco Selmi fu uno di loro. Lo prova un suo libriccino dal titolo "Principii elementari di chimica minerale" pubblicato dall'editore torinese Pomba [9]. Apparve nella Libreria del Popolo Italiano diretta da Angelo Fava (1808-1881), una collana di trattatelli per un pubblico poco istruito che si ispirava al detto "l'ignoranza è la massima e la peggiore delle povertà" [10]. Se leggiamo l'introduzione di Selmi non possiamo non ricavarne un insegnamento più che mai valido per i nostri tempi in cui la scienza-spettacolo sembra prevalere sull'applicazione perseverante allo studio. Così scriveva Selmi [9]: "Nello stendere questo trattatello... io posi maggior cura che non facessi in altri miei scritti, perché libro consacrato all'istruzione popolare" e continuava "mi astenni dal vezzo che tengono alcuni, in ispecie non italiani, di raccogliere alla rinfusa in brevi pagine un manipolo di fatti i più attraenti e i più spettacolosi della scienza, affine di comporne una specie di lanterna magica scritta, in cui si dilettono, o per meglio dire si trastullino i lettori".

La figura inserita nel testo (Fig. 2) mostra un biglietto autografo di Selmi, molto caro all'autore dell'articolo e qui riprodotto per la prima volta, in cui lo stesso Selmi fornisce al destinatario alcune indicazioni su come trattare un campione di tannato di stricnina che gli aveva spedito a scopo di studio.

## BIBLIOGRAFIA

[1] I. Guareschi, Francesco Selmi e la sua opera scientifica, V. Bona, Torino, 1911, p. 127, Estr. da *Mem. R. Acc. Sci. Torino*, s. 2, t. 62,



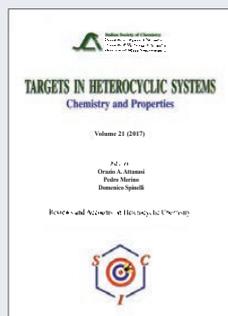
- pp. 125-272.
- [2] J.R. Partington, *A History of Chemistry*, Vol. IV, St. Martin's Press, Mansfield Centre CT, 1972, p. 484, p. 729.
- [3] F. Selmi, *Berichte d. deut. Chem. Gesell.*, 1873, **VI**, 141.
- [4] F. Selmi, *Mem. R. Acc. Bol.*, 1880, **IV**(I), pp. 793-802.
- [5] F. Selmi, Nuovo processo generale per la ricerca delle sostanze venefiche con appendici di argomenti tossicologici od affini, Zanichelli, Bologna, 1875.
- [6] F. Selmi, *Mem. R. Acc. Bol.*, 1880, **IV**(I), pp. 299-305.
- [7] G. Ieluzzi, Francesco Selmi e i sistemi colloidali, in L. Cerruti, F. Turco (a cura di), *Atti del XI Convegno Nazionale di Storia e Fondamenti della Chimica*, Torino 21-24 settembre 2005 (Estratto dal Volume 123, *Memorie di Scienze Fisiche e Naturali, Rendiconti dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL*", serie V, vol. XXIX, parte II, tomo II, 2005, p. 89).
- [8] M. Ciardi, *Reazioni tricolori*, Franco Angeli, Milano, 2010, pp. 116-125.
- [9] F. Selmi, *Principii elementari di chimica minerale*, Pomba, Torino, 1850, pp. 7-8.
- [10] M.C. Morandini, *Scuola e Nazione - Maestri e istruzione popolare nella costruzione dello Stato unitario (1848-1861)*, Vita e Pensiero, Milano, 2003, p. 196.



## LIBRI E RIVISTE SCI

### Targets in Heterocyclic Systems Vol. 21

È disponibile il  
21° volume della serie  
"Targets in Heterocyclic Systems",  
a cura di Orazio A. Attanasi,  
Pedro Merino e Domenico Spinelli  
[http://www.soc.chim.it/libri\\_collane/th/s/vol\\_21\\_2017](http://www.soc.chim.it/libri_collane/th/s/vol_21_2017)



Sono disponibili anche i volumi 1-20 della serie.

I seguenti volumi sono a disposizione dei Soci gratuitamente, è richiesto soltanto un contributo spese di € 10:

- G. Scorrano "La Storia della SCI", Edises, Napoli, 2009 (pp. 195)
- G. Scorrano "Chimica un racconto dai manifesti", Canova Edizioni, Treviso, 2009 (pp. 180)
- AA.VV. CnS "La Storia della Chimica" numero speciale, Edizioni SCI, Roma 2007 (pp. 151)
- AA.VV. "Innovazione chimica per l'applicazione del REACH" Edizioni SCI, Milano, 2009 (pp. 64)

Oltre "La Chimica e l'Industria", organo ufficiale della Società Chimica Italiana, e "CnS - La Chimica nella Scuola", organo ufficiale della Divisione di Didattica della SCI ([www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo](http://www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo)), rilevante è la pubblicazione, congiuntamente ad altre Società Chimiche Europee, di riviste scientifiche di alto livello internazionale:

- ChemPubSoc Europe Journal
- Chemistry A European Journal
- EURJOC
- EURJIC
- ChemBioChem
- ChemMedChem
- ChemSusChem
- Chemistry Open
  
- ChemPubSoc Europe Sister Journals
- Chemistry An Asian Journal
- Asian Journal of Organic Chemistry
- Angewandte Chemie
- Analytical & Bioanalytical Chemistry
- PCCP, Physical Chemistry Chemical Physics

**Per informazioni e ordini telefonare in sede,  
06 8549691/8553968, o inviare un messaggio a  
[manuela.mostacci@soc.chim.it](mailto:manuela.mostacci@soc.chim.it)**

## VETRINA SCI

**Polo SCI** - Polo a manica corta, a tre bottoni, bianca ad effetto perlato, colletto da un lato in tinta, dall'altro lato a contrasto con colori bandiera (visibili solo se alzato), bordo manica dx con fine inserto colore bandiera in contrasto, bordo manica a costine, spacchetti laterali con colore bandiera, cuciture del collo coperte con nastro in jersey colori bandiera, nastro di rinforzo laterale. Logo SCI sul petto. Composizione: piquet 100% cotone; peso: 210 g/mq; misure: S-M-L-XL-XXL; modello: uomo/donna. Costo 25 € comprese spese di spedizione.



**Distintivo SCI** - Le spille in oro ed in argento con il logo della SCI sono ben note a tutti e sono spesso indossate in occasioni ufficiali ma sono molti i Soci che abitualmente portano con orgoglio questo distintivo.

La spilla in oro è disponibile, tramite il nostro distributore autorizzato, a € 40,00.

La spilla in argento, riservata esclusivamente ai Soci, è disponibile con un contributo spese di € 10,00.



**Francobollo IYC 2011** - In occasione dell'Anno Internazionale della Chimica 2011 la SCI ha promosso l'emissione di un francobollo celebrativo emesso il giorno 11 settembre 2011 in occasione dell'apertura dei lavori del XXIV Congresso Nazionale della SCI di Lecce. Il Bollettino Informativo di Poste Italiane relativo a questa emissione è visibile al sito: [www.soc.chim.it/sites/default/files/users/gadmin/vetrina/bollettino\\_illustrativo.pdf](http://www.soc.chim.it/sites/default/files/users/gadmin/vetrina/bollettino_illustrativo.pdf)

Un kit completo, comprendente il francobollo, il bollettino informativo, una busta affrancata con annullo del primo giorno d'emissione, una cartolina dell'Anno Internazionale della Chimica affrancata con annullo speciale ed altro materiale filatelico ancora, è disponibile, esclusivamente per i Soci, con un contributo spese di 20 euro.



**Foulard e Cravatta** - Solo per i Soci SCI sono stati creati dal setificio Mantero di Como ([www.mantero.com](http://www.mantero.com)) due oggetti esclusivi in seta di grande qualità ed eleganza: un foulard (87x87cm) ed una cravatta. In oltre 100 anni di attività, Mantero seta ha scalato le vette dell'alta moda, producendo foulard e cravatte di altissima qualità, tanto che molte grandi case di moda italiana e straniera affidano a Mantero le proprie realizzazioni in seta.

Sia sulla cravatta che sul foulard è presente un'etichetta che riporta "Mantero Seta per Società Chimica Italiana" a conferma dell'originalità ed esclusività dell'articolo. Foulard e cravatta sono disponibili al prezzo di 50 euro e 30 euro, rispettivamente, tramite il nostro distributore autorizzato.

*Per informazioni e ordini telefonare in sede, 06 8549691/8553968,  
o inviare un messaggio a [simone.fanfoni@soc.chim.it](mailto:simone.fanfoni@soc.chim.it)*





molecole molto affini, i tempi di calcolo dovrebbero estendersi a decine di secondi. In questo recente lavoro [F. Paul, *Nature Communications*, 2017, **8**, 1095] gli autori propongono un nuovo approccio, l'MEMMs (Multi Ensemble Markov Models), basato su una combinazione di simulazioni di dinamica molecolare classica e di *enhanced sampling* (come la metadinamica, *umbrella sampling* o *replica exchange*) e l'applicazione del *Markov state model* (MSM) per lo studio della cinetica del peptide PMI (inibitore con attività nanomolare) con la proteina Mdm2. Grazie alla tecnica MEMMs gli autori riescono a ricavare l'informazione cinetica usando micro secondi di simulazione. Durante le simulazioni di dinamica molecolare classica, si osserva la formazione di diversi intermedi, stati metastabili e anche la struttura del complesso cristallografico PMI-Mdm2, mentre la dissociazione inibitore-proteina (un evento raro) non viene mai vista. Di conseguenza, il modello MSM generato con questi dati ha molti stati disconnessi. Per superare questo limite e campionare l'associazione e la dissociazione del peptide in modo reversibile, è stata usata la tecnica

*Hamiltonian replica exchange* in cui si creano diverse repliche del sistema ognuna caratterizzata da una diversa Hamiltoniana (energia totale del sistema) che viene scambiata tra le diverse repliche durante la simulazione. A parte una copia *unbiased*, negli altri sistemi si modifica l'energia delle interazioni proteina-recettore. Il risultato è quello di abbassare la profondità delle buche di minimo sulla superficie di energia potenziale e quindi permettere più facilmente, in questo caso, la dissociazione del complesso. Per combinare i dati delle simulazioni classiche con quelle *biased* e generare il corrispondente MEMMs, gli autori utilizzano il metodo TRAMMBAR. La stima del *residence time* basata su questi dati è risultata in linea con quella sperimentale (range dei secondi). L'analisi del network cinetico evidenzia 14 stati metastabili che interconvertono lentamente (più di 10 microsecondi, vedi Fig. 1). Lo stato più popolato coincide con la struttura del complesso cristallografico e gli stati intermedi servono ad indurre, attraverso diversi percorsi in un modello tipo imbuto, la conformazione bioattiva nel peptide (elica) e a muoversi verso il sito finale.

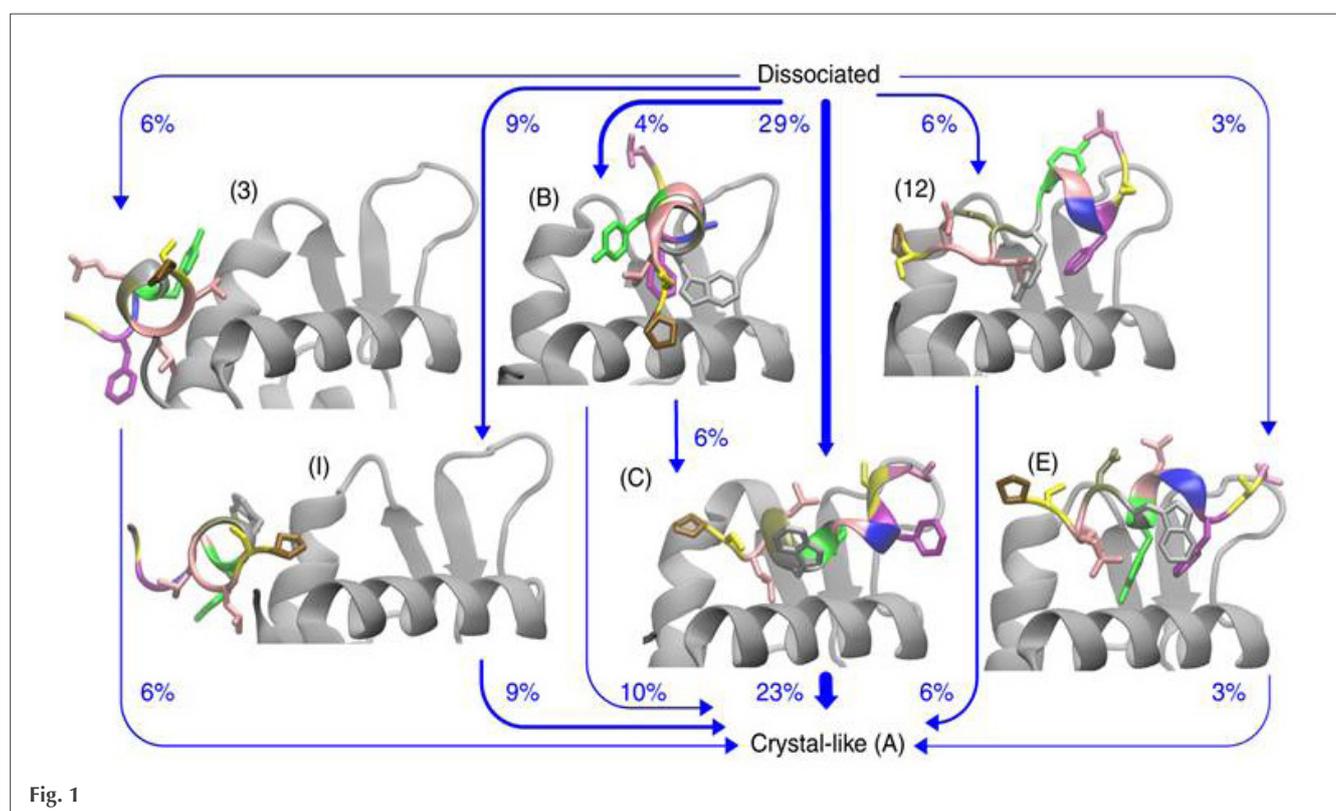


Fig. 1



CLAUDIO DELLA VOLPE  
UNITN, SCI, ASPO-ITALIA  
CLAUDIO.DELLAVOLPE@UNITN.IT

## LA STORIA INFINITA DEI NEONICOTINOIDI

Fu proprio 10 anni fa su queste stesse pagine che iniziò il mio interesse verso i neonicotinoidi, con una serie di articoli sulle api e l'uso ormai abbastanza chiaramente nocivo dei principali neonicotinoidi, una classe di pesticidi largamente usati in agricoltura; in quell'occasione, sto parlando del 2008, si parlava della CCD, una sindrome che colpiva gli alveari ed era in corso una forte discussione, non dissimile da quella che c'è stata sul glifosato, riguardo la pericolosità dei neonicotinoidi.

Partii senza avere un'opinione personale certa; discussi con Petrini, intervistai sia entomologi sia rappresentanti di Agrofarma, con cui finii per polemizzare aspramente; lessi tantissimo e piano piano mi convinsi che le cose stavano esattamente come dicevano gli apicoltori e gli entomologi: *i neonicotinoidi erano ragionevolmente responsabili del problema ed occorreva intervenire*. Misi a confronto le proposte di Agrofarma e quelle di *The Economist*, un giornale non accusabile di essere estremista e che si chiedeva cosa volesse fare la grande industria chimica per risolvere un problema, ormai innegabile. Feci notare che gli argomenti di Agrofarma, di Bayer e di Syngenta erano sostanzialmente indifendibili sia su base scientifica che economica (Agrofarma rivendicava opinioni scientifiche, ma rifiutava i lavori pubblicati su *Science*). Ovviamente mi presi le rampogne durissime di Agrofarma col mio nome sparato in grande nel titolo e con un articolo non firmato; vabbè, allora le cose andavano così (*C&I*, n. 2, maggio 2012) e il blog non esisteva ancora; partii nel novembre di quell'anno.

Dopo dieci anni quella storia, che certo non coinvolgeva solo me ed Agrofarma, ma migliaia di apicoltori in tutta Europa, l'EFSA e un po' tutta l'opinione pubblica informata è arrivata ad un compimento chiaro: i tre neonicotinoidi responsabili della moria delle api sono stati sospesi dalla UE a partire dalla fine di quest'anno,

almeno in campo aperto, ma si potranno continuare ad usare in serra. C'era già stato un pronunciamento nel merito da parte della UE di cui parlai sul blog (<https://ilblogdellasci.wordpress.com/2013/02/04/tonio-le-ape-e-la-chimica/>), cui è seguita una parziale sospensione dell'uso; poi ci sono state le rivelazioni ottenute da Greenpeace sulla base del Freedom of Information Act (<https://unearthed.greenpeace.org/2016/09/22/neonicotinoids-bayer-syngenta-bees/>) lavori riservati che ammettevano ciò che pubblicamente era negato: i neonic a determinate condizioni potevano nuocere alle api.

Durante quest'anno è stato pubblicato un lavoro **di cui abbiamo reso conto** sulla riduzione del 75% degli insetti volanti in Europa; non posso dimostrare che i neonic c'entrino qualcosa, ma certo potrei scommetterlo. Pochi mesi fa la **conclusione EFSA** sulla pericolosità indiscussa dei neonic.



Alla fine è arrivato **il bando di pochi giorni fa** che riguarda l'Europa e parte dal prossimo anno e comunque è ancora una volta parziale: si potranno usare in serra dove si sostiene che l'apporto delle api sia trascurabile. Il bando estende quello sempre parziale già in essere dal 2013 per i tre neonicotinoidi - l'imidacloprid e il clothianidin della Bayer e il tiamethoxam della Syngenta.

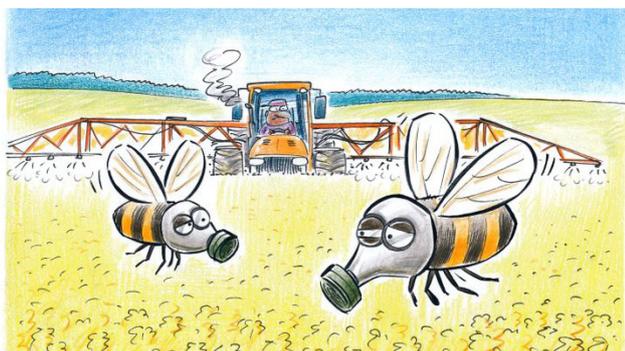


La restrizione alle serre permanenti è considerata essenziale per preservare la "biodiversità", ha spiegato il commissario responsabile della Salute, Vytenis Andriukaitis. "Sono felice - ha aggiunto - che gli Stati membri abbiano votato a favore della nostra proposta per restringere ulteriormente l'uso delle sostanze attive clothianidin, imidacloprid e thiamethoxam". Il 28 febbraio scorso l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (Efsa) aveva concluso che "la maggior parte dei modi in cui i pesticidi neonicotinoidi vengono usati rappresenta un rischio per le api selvatiche e quelle mellifere".

Il Belgio ha già annunciato che chiederà la deroga per l'uso proprio sulle barbabietole per le loro peculiarità, e nel lungo dibattito sulla decisione anche altri Paesi hanno espresso la stessa posizione.

Ovviamente i produttori di neonicotinoidi sono arrabbiatissimi; Bayer e Syngenta, le aziende produttrici dei neonicotinoidi, hanno denunciato la Commissione Europea in Corte di Giustizia Ue, con la sentenza data per imminente. «Col giudizio della Corte previsto per il 17 maggio - si legge in una nota dell'associazione europea per la protezione delle colture - la decisione è prematura e sgradita, anche se non del tutto inattesa».

Tenete presente che il presidente attuale di Agrofarma è un uomo Basf e dunque non credo Agrofarma abbia idee diverse. Vedremo se questo è il punto di arrivo della saga o se i neonic continueranno a uccidere le api.



## BIBLIOGRAFIA

- <http://www.greenreport.it/wp-content/uploads/2018/04/api-neonicotinoidi.jpg>
- [https://www.greenpeace.org/italy/Global/italy/report/2017/agricoltura/neonicotinoid\\_pesticides.pdf](https://www.greenpeace.org/italy/Global/italy/report/2017/agricoltura/neonicotinoid_pesticides.pdf)
- [http://www.repubblica.it/ambiente/2018/04/27/news/l\\_ue\\_vieta\\_tre\\_pesticidi\\_neonicotinoidi\\_pericolosi\\_per\\_le\\_api-194952866/](http://www.repubblica.it/ambiente/2018/04/27/news/l_ue_vieta_tre_pesticidi_neonicotinoidi_pericolosi_per_le_api-194952866/)



## Istruzioni per gli Autori

La *Chimica e l'Industria* è una rivista di scienza e tecnologia e di informazione per i chimici.

Nella rubrica "Attualità" ospita articoli o comunicati brevi su argomenti di interesse rilevante per tutti coloro che operano nella chimica, richiesti dalla redazione o ricevuti come lettere al direttore.

Nella sezione "Science and Technology" pubblica in inglese monografie scientifiche di chimica, ingegneria chimica e tecnologie farmaceutiche, concordate o richieste dal comitato scientifico o dalla redazione.

Nella sezione "Chimica e..." ospita articoli in italiano o in inglese di carattere applicativo, tecnologico e informativo per tutti i settori rilevanti della chimica.

Tutti gli articoli saranno sottoposti al giudizio di almeno un referee.

## Testi

I testi possono essere trasmessi via e-mail, completi di tabelle e figure, con chiara indicazione dei nomi degli autori, scrivendo per esteso anche il nome di battesimo, gli Istituti o Enti presso i quali svolgono la loro attività e relativo indirizzo. Va allegato inoltre un breve riassunto del testo sia in italiano sia in inglese (max 300 battute).

I testi dovranno essere contenuti in non più di 30.000 battute per quanto riguarda la sezione "Science and Technology", e non più di 20.000 battute per quanto riguarda la sezione "Chimica e...". Il numero complessivo di tabelle e figure non dovrebbe essere superiore a 10 per la sezione "Science..." e a 5 per la sezione "Chimica e...". Tutti gli articoli dovranno essere corredati di un'immagine esplicativa dell'argomento da poter utilizzare come foto di apertura.

Il titolo non dovrà essere lungo più di 30 battute.

Immagini, schemi, figure vanno inviate in formato jpg, tiff o gif in file separati. Si raccomanda di uniformare la lingua delle immagini a quella del testo;

I richiami bibliografici (non più di 30-35), da citare all'interno del testo, devono essere numerati progressivamente, con numeri arabi tra parentesi quadre. La bibliografia va riportata in fondo al testo secondo gli esempi:

- [1] D.W. Breck, *Zeolite Molecular Sieves*, J. Wiley, New York, 1974, 320.
- [2] R.D. Shannon, *Acta Crystallogr.*, 1976, **32**, 751.
- [3] U.S. Pat. 4.410.501, 1983.
- [4] Chemical Marketing Reporter, Schnell Publ. Co. Inc. (Ed.), June 15, 1992.
- [5] G. Perego *et al.*, *Proceedings of 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Zeolites*, Tokyo, 1986, Tonk Kodansha, Elsevier, Amsterdam, 129.

La redazione invita inoltre gli Autori ad inviare in allegato (fuori testo) con gli articoli anche fotografie o illustrazioni relative al contenuto, sia di tipo simbolico sia descrittivo, per migliorare l'aspetto redazionale e comunicativo (la direzione se ne riserva comunque la pubblicazione).

Tutto il materiale deve essere inviato per e-mail a: dott. Anna Simonini, [anna.simonini@soc.chim.it](mailto:anna.simonini@soc.chim.it)



Società Chimica Italiana

La *Società Chimica Italiana*, fondata nel 1909 ed eretta in Ente Morale con R.D. n. 480/1926, è un'associazione scientifica che annovera quasi quattromila iscritti. I Soci svolgono la loro attività nelle università e negli enti di ricerca, nelle scuole, nelle industrie, nei laboratori pubblici e privati di ricerca e controllo, nella libera professione. Essi sono uniti, oltre che dall'interesse per la scienza chimica, dalla volontà di contribuire alla crescita culturale ed economica della comunità nazionale, al miglioramento della qualità della vita dell'uomo e alla tutela dell'ambiente.

La *Società Chimica Italiana* ha lo scopo di promuovere lo studio ed il progresso della Chimica e delle sue applicazioni. Per raggiungere questi scopi, e con esclusione del fine di lucro, la *Società Chimica Italiana* promuove, anche mediante i suoi Organi Periferici (Sezioni, Divisioni, Gruppi Interdivisionali), pubblicazioni, studi, indagini, manifestazioni.

Le Sezioni perseguono a livello regionale gli scopi della Società. Le Divisioni riuniscono Soci che seguono un comune indirizzo scientifico e di ricerca. I Gruppi Interdivisionali raggruppano i Soci interessati a specifiche tematiche interdisciplinari.

La Società organizza numerosi convegni, corsi, scuole e seminari sia a livello nazionale che internazionale. Per divulgare i principi della scienza chimica nella scuola secondaria superiore organizza annualmente i *Giochi della Chimica*, una competizione che consente ai giovani di mettere alla prova le proprie conoscenze in questo campo e che seleziona la squadra nazionale per le *Olimpiadi Internazionali della Chimica*.

Rilevante è l'attività editoriale con la pubblicazione, congiuntamente ad altre Società Chimiche Europee, di riviste scientifiche di alto livello internazionale. Organo ufficiale della Società è la rivista *La Chimica e l'Industria*.

### **Nuova iscrizione**

Per la prima iscrizione il Candidato Socio deve essere presentato, come da Regolamento, da due Soci che a loro volta devono essere in regola con l'iscrizione. I Soci Junior (nati nel 1987 o successivi) laureati con 110/110 e lode (Laurea magistrale e Magistrale a ciclo unico) hanno diritto all'iscrizione gratuita e possono aderire - senza quota addizionale - a due Gruppi Interdivisionali.

#### **Contatti**

##### **Sede Centrale**

Viale Liegi 48c - 00198 Roma (Italia)

Tel +39 06 8549691/8553968

Fax +39 06 8548734

Ufficio Soci Sig.ra Maria Carla Ricci

E-mail: [ufficiosoci@soc.chim.it](mailto:ufficiosoci@soc.chim.it)

Segreteria Generale Dott.ssa Barbara Spadoni

E-mail: [segreteria@soc.chim.it](mailto:segreteria@soc.chim.it)

Amministrazione Rag. Simone Fanfoni

E-mail: [simone.fanfoni@soc.chim.it](mailto:simone.fanfoni@soc.chim.it)

Congressi Sig.ra Manuela Mostacci

E-mail: [ufficiocongressi@soc.chim.it](mailto:ufficiocongressi@soc.chim.it)

#### **Supporto Utenti**

Tutte le segnalazioni relative a malfunzionamenti del sito vanno indirizzate a [webmaster@soc.chim.it](mailto:webmaster@soc.chim.it)

Se entro 24 ore la segnalazione non riceve risposta dal webmaster si prega di reindirizzare la segnalazione al coordinatore WEB [giorgio.cevasco@unige.it](mailto:giorgio.cevasco@unige.it)

#### **Redazione "La Chimica e l'Industria"**

Organo ufficiale della Società Chimica Italiana

Anna Simonini

P.le R. Morandi, 2 - 20121 Milano

Tel. +39 345 0478088

E-mail: [anna.simonini@soc.chim.it](mailto:anna.simonini@soc.chim.it)