

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE  
“AMEDEO AVOGADRO”



Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Dottorato di ricerca in Scienze Chimiche  
Ciclo XXVII (2011-2014)

**Sviluppo e ottimizzazione di metodi analitici per  
applicazioni in campo ambientale, energetico e dei nuovi  
materiali.**

Tutor:

Dott.ssa Valentina Gianotti

Candidata:

Giada Favaro

Coordinatore:

Prof. Domenico Osella

## *Introduzione*

Nel corso del dottorato di ricerca qui presentato sono state sviluppate ed ottimizzate metodologie cromatografiche e spettrofotometriche applicabili in campo ambientale, energetico e dei nuovi materiali.

Il primo lavoro, infatti è stato focalizzato sull'ottimizzazione e sulla validazione primaria di un metodo cromatografico HPLC-DAD adatto alla separazione di otto pesticidi: Metamitron, Sulcotrione, Atrazina, Lenacil, Desmedifam, fenmedifam, Etofumesate e la Terbutilazina. I parametri determinati durante la validazione primaria sono stati: precisione, accuratezza, linearità di risposta, LOD (Limite di determinazione), LOQ (Limite di quantificazione) e la sensibilità. Inoltre, quando viene messo a punto un nuovo metodo cromatografico risulta di fondamentale importanza la valutazione delle prestazioni nelle matrici reali. A tale scopo, sono stati analizzati campioni di terreni trattati con una formulazione contenente alcuni dei pesticidi in studio, permettendo il completamento della validazione con la valutazione della presenza/assenza dell'effetto matrice.

Nel secondo lavoro è stato messo a punto un metodo analitico per la determinazione della quantità di monomeri consumata durante la reazione di sintesi di copolimeri statistici polistirene-polimetilmetacrilato P(S-r-MMA). Infatti, un parametro fondamentale da tenere in considerazione quando si effettua una sintesi polimerica è il grado di conversione, ovvero il rapporto tra la quantità di reagente consumato dalla reazione e la quantità di reagente inizialmente presente nell'ambiente di reazione. E' stata scelta in particolare la tecnica cromatografica HPLC-DAD per poter determinare con esattezza la quantità dei due monomeri consumata e quindi valutare in modo accurato il grado di conversione della reazione di polimerizzazione. Anche in questo caso il metodo ottimizzato è stato validato in termini di precisione, accuratezza, linearità di risposta, LOD (Limite di determinazione), LOQ (Limite di quantificazione) e la sensibilità. Il metodo così ottimizzato e validato presenta le caratteristiche adeguate per permettere, non solo di studiare le reazioni di polimerizzazione ma anche la sensibilità adeguata per essere utilizzato per la determinazione dell'eventuale rilascio e la migrazione di tracce di stirene e metilmetacrilato negli oggetti di uso quotidiano e alimenti. Il polistirene viene infatti normalmente utilizzato per la produzione di contenitori per uso alimentare e di giocattoli per bambini, mentre il metilmetacrilato viene normalmente usato per la produzione delle resine acriliche utilizzate nelle protesi dentarie. Vista la tossicità dello stirene e del

metilmetacrilato, e i loro effetti sulla salute, risulta importante poter valutare l'eventuale rilascio di questi composti da parte degli oggetti e manufatti di uso quotidiano. .

Infine, l'ultimo lavoro è stato incentrato sulla razionalizzazione dei fattori che possono influire sull'uptake e sulla efficienza delle dye-sensitized solar cell (DSSC). Le DSSC, (celle di *Graetzel* o celle fotoelettrochimiche) sono dei dispositivi in grado di convertire l'energia solare in energia elettrica in maniera simile alla fotosintesi. In questi dispositivi uno strato sottile di nanoparticelle di ossido di titanio simula la funzione che l'NADP ha nelle piante, il colorante è utilizzato come fonte di elettroni, come l'acqua per le piante, e lo iodio rappresenta l'accettore/trasportatore di elettroni in analogia al biossido di carbonio nella fotosintesi. Uno degli step più importanti nella fabbricazione di una cella DSSC è il dye uptake, infatti sono molti i fattori che possono influire sull'adsorbimento del colorante, da parte del film di  $\text{TiO}_2$  presente sul foto-elettrodo, e quindi sull'efficienza della cella. Quindi inizialmente si è partiti dal sistema più semplice: è stata studiata, mediante l'utilizzo di un piano fattoriale  $2^3$ , l'interazione tra il colorante e una pasta di  $\text{TiO}_2$  in presenza e in assenza di un antiaggregante (Acido chenodeossicolico, CDCA). Dopo di che si è passati allo studio del sistema reale: è stato effettuato un analogo piano fattoriale  $2^3$  su foto-elettrodi commerciali per DSSC. In questo modo è stato possibile identificare quali fattori influissero sull'uptake del colorante e in che modo. Il dye-uptake, seppur fondamentale, però è solo uno dei vari parametri che possono influire sull'efficienza delle celle DSSC. Il passo successivo è stato quello di assemblare delle celle DSSC e verificarne la riproducibilità potendo così determinare l'effetto apportato dagli altri parametri che influiscono maggiormente sull'efficienza delle celle DSSC sull'efficienza. Più in dettaglio sono stati studiati:

1. la tipologia di foto-elettrodi ( tipo di deposizione della pasta di  $\text{TiO}_2$ , trattamenti di sintering, );
2. la natura dell'elettrolita;
3. la valutazione dell'efficacia del trattamento  $\text{TiCl}_4$  sui foto-elettrodi.
4. la valutazione di contro-elettrodi prodotti in laboratorio o acquisiti esternamente

## Sommario

Introduzione .....	2
PARTE TEORICA .....	8
<b>CAPITOLO 1</b> .....	9
1 PIANIFICAZIONE DEGLI ESPERIMENTI.....	10
1.1 Analisi dei risultati del trattamento statistico dei dati.....	10
<b>1.2</b> Disegni fattoriali completi.....	10
1.3 Randomizzazione .....	13
1.4 Calcolo dell'effetto dei fattori.....	13
1.5 Metodi rapidi per il calcolo degli effetti.....	14
1.6 Regressione lineare multipla.....	16
1.7 Determinazione degli effetti rilevanti.....	16
1.8 Stima dell'errore degli effetti.....	17
1.9 Test del modello e dei risultati .....	18
1.10 Analisi dei residui .....	18
1.11 Algoritmo di Yates inverso.....	20
1.12 Test di curvatura .....	21
1.13 Piano a Stella .....	22
<b>CAPITOLO 2</b> .....	23
2 Validazione Metodi.....	24
2.1 Precisione .....	24
2.2 LOD & LOQ .....	25
2.3 Linearità.....	25
2.4 Specificità.....	26
2.5 Range.....	26
2.6 Accuratezza .....	26
2.7 Robustezza.....	27
2.8 Calcolo della deviazione standard dell'intercetta e della pendenza della retta di calibrazione .....	27
2.9 t-test per la significatività dell'intercetta.....	28
2.10 t-test per il parallelismo tra rette di regressione.....	29
2.11 ANOVA Analisi della Varianza .....	30
2.11.1 Test ANOVA sulle medie .....	30
<b>CAPITOLO 3</b> .....	32
3 Le celle di Gratzel .....	33
3.1 Funzionamento di una DSSC .....	34
3.2 I fattori che influenzano l'efficienza delle dye-sensitized solar cells .....	35

3.3	Fotosensibilizzante .....	36
3.3.1	Ancoraggio del Dye sulla superficie del colorante .....	36
3.4	Elettrolita .....	38
3.5	Rigenerazione del fotosensibilizzante ossidato .....	39
3.6	Ossido conduttivo trasparente TCO .....	39
3.7	Contro-elettrodo .....	39
3.8	La corrente nera (dark current).....	40
3.9	Misurazione efficienza cella.....	40
3.10	Materiali per l'assemblaggio delle celle .....	40
3.11	Efficienza delle celle DSSC.....	41
	<b>CAPITOLO 4</b> .....	44
	4 PESTICIDI: CARATTERISTICHE ED IMPLICAZIONI AMBIENTALI.....	45
4.1	Ingresso nella catena alimentare, bioaccumulo e rischio per il consumatore .....	45
4.2	Valutazione del rischio per la salute umana da esposizione ad agrofarmaci .....	48
4.3	Ecotossicologia.....	50
	Parte Sperimentale.....	54
	<b>CAPITOLO 5</b> .....	55
	5 Messa a punto e validazione di un metodo cromatografico per la separazione di otto pesticidi[69].....	56
5.1	Analiti .....	58
5.1.1	Atrazina .....	58
5.1.2	Ethofumesate.....	59
5.1.3	Sulcotrione .....	60
5.1.4	Phenmedipham.....	61
5.1.5	Desmedipham.....	62
5.1.6	Lenacil.....	63
5.1.7	Metamitron.....	64
5.1.8	Terbutilazina .....	65
5.2	Materiali e metodi .....	66
5.2.1	Solventi e reagenti.....	66
5.2.2	Strumenti .....	66
5.2.3	Preparazione soluzioni .....	67
5.2.4	Preparazione fase mobile .....	67
5.2.5	Pretrattamento campioni .....	68
5.2.6	Campioni reali.....	68
5.3	Prove Preliminari .....	69
5.3.1	Analisi UV-Vis .....	69
5.4	Ottimizzazione del metodo cromatografico .....	70

5.5	Ottimizzazione delle condizioni di estrazione SPE.....	72
5.6	Validazione del metodo.....	73
5.7	Conclusioni.....	79
<b>CAPITOLO 6.....</b>		<b>80</b>
6	Determinazione della conversione in polimerizzazioni radicaliche controllate [68].....	81
6.1	Analiti.....	81
6.1.1	Stirene .....	81
6.1.2	Metil metacrilato .....	83
6.1.3	Anisolo .....	84
6.1.4	Copolimero random poli-stirene poli-metilmetacrilato .....	85
6.2	Materiali & Metodi .....	88
6.2.1	Strumentazione.....	88
6.2.2	Reattivi .....	88
6.2.3	Filtraggio fase mobile e campioni reali.....	89
6.2.4	Soluzioni Standard/Madre.....	89
6.2.5	Campioni reali.....	89
6.2.6	Analisi Cromatografica .....	90
6.2.7	Analisi Spettrofotometrica .....	90
6.3	Prove Preliminari .....	91
6.4	Ottimizzazione del Metodo.....	92
6.4.1	Prove preliminari.....	92
6.4.2	Analisi cromatografica dei campioni reali .....	100
6.4.3	Pretrattamento dei campioni .....	105
6.5	Validazione del Metodo.....	107
6.5.1	Calibrazione del metodo: costruzione delle rette di calibrazione .....	107
6.5.2	Calibrazione del metodo: calcolo della deviazione standard sulla pendenza e sull'intercetta delle rette di calibrazione. Test di significatività sull'intercetta .....	108
6.5.3	Analisi della varianza (ANOVA).....	109
6.5.4	Calcolo dei limiti di rivelabilità (LOD) e dei limiti di quantificazione (LOQ) .....	113
6.5.5	Precisione e specificità.....	113
6.5.6	Valutazione dell'effetto matrice.....	117
6.5.7	Determinazione della stabilità dei campioni .....	120
6.5.8	Applicazione ai campioni reali .....	122
6.6	Grado di conversione della reazione di polimerizzazione .....	140
6.7	Conclusioni .....	144
<b>CAPITOLO 7.....</b>		<b>145</b>
7	Dye uptake in DSSC: razionalizzazione degli effetti sulla resa di uptake e sulla efficienza della cella[55].....	146

7.1	Analiti.....	146
7.1.1	D5.....	146
7.1.2	TiO <sub>2</sub> .....	147
7.2	Materiali e metodi .....	148
7.2.1	Solventi e reagenti.....	148
7.2.2	Strumenti.....	148
7.2.3	Preparazione delle soluzioni del piano sperimentale e della pasta di P25 .....	149
7.2.4	Preparazione soluzione TiCl <sub>4</sub> .....	149
7.2.5	Preparazione foto-elettrodi/Deposizione della pasta di TiO <sub>2</sub> .....	149
7.2.6	Preparazione contro-elettrodi.....	150
7.2.7	Assemblaggio celle .....	151
7.3	Studio dell'adsorbimento di colorante sulla pasta di ossido di titanio P25.....	152
7.4	Studio dell'assorbimento del colorante su foto-elettrodi commerciali per DSSC .....	154
7.5	Analisi termo gravimetriche.....	157
7.6	Razionalizzazione delle fasi di preparazione delle celle-Valutazione dell'efficienza .....	160
7.6.1	Verifica della riproducibilità nella procedura di assemblaggio delle celle.....	160
7.6.2	Valutazione dell'influenza sull'efficienza dell'utilizzo di elettrodi attivati e non.....	163
7.6.3	Scelta dell'elettrolita .....	166
7.6.4	La valutazione dell'efficacia del trattamento TiCl <sub>4</sub> sui foto-elettrodi.....	169
7.6.5	Valutazione di contro-elettrodi prodotti in laboratorio con differenti metodologie. .	174
7.7	Conclusioni.....	179
	Conclusioni.....	181
	Bibliografia.....	182

# PARTE TEORICA

---



# ***CAPITOLO 1***

# *1 PIANIFICAZIONE DEGLI ESPERIMENTI*

La scelta del piano sperimentale ottimale può essere effettuata utilizzando tecniche ormai consolidate che consentono di effettuare il minor numero possibile di esperimenti. Lo scopo della teoria del disegno sperimentale è proprio quello di effettuare il minor numero possibile di esperimenti ottenendo al tempo stesso la massima qualità e quantità di informazione.

## *1.1 Analisi dei risultati del trattamento statistico dei dati.*

Il modello di regressione fornisce, attraverso i coefficienti delle variabili, tutte le informazioni necessarie per valutare l'importanza dei fattori nel modellare il comportamento del sistema. Per esempio, i fattori caratterizzati da un coefficiente molto grande (in valore assoluto), sono generalmente i fattori più rilevanti nel modellare la risposta misurata e quindi i fattori su cui puntare la propria attenzione per conseguire determinati risultati. Il tener conto del segno fornisce un'ulteriore informazione circa la variazione della risposta misurata a seguito di una loro variazione ben definita. Un coefficiente positivo indica quindi che la risposta tende ad aumentare se il fattore corrispondente viene aumentato e viceversa.

Inoltre, attraverso opportune valutazioni della *qualità* del modello, per esempio mediante l'analisi dei residui ed altre tecniche, spesso si può stabilire se sia necessario introdurre termini non lineari o di interazione per migliorare il modello stesso, se siano stati considerati tutti i fattori sperimentali rilevanti, se vi siano anomalie di comportamento del sistema o di distribuzione dell'errore sperimentale nel dominio sperimentale.

## *1.2 Disegni fattoriali completi*

I disegni fattoriali sono stati proposti per la prima volta da Ronald Fisher nel 1920.

Lo scopo è di poter stimare il più correttamente possibile quale possa essere l'influenza sulla risposta della variazione di ciascun fattore in presenza, ma indipendentemente, dal

cambiamento di altri fattori, e l'influenza della variazione contemporanea ed indipendente di due o più fattori. Con i disegni fattoriali tutti questi effetti possono essere determinati indipendentemente gli uni dagli altri.

Nei disegni fattoriali completi ciascun fattore viene investigato a livelli fissi e si effettuano gli esperimenti ottenuti da tutte le possibili combinazioni di valori ammessi per ciascuna variabile. Questo significa che un disegno fattoriale completo per 3 fattori a 2 livelli contiene  $2 \times 2 \times 2 = 8$  esperimenti ed in generale il numero di esperimenti è uguale a  $K^n$  con K numero dei livelli investigati e n numero di variabili considerate.

Il modo in cui vengono effettuati gli esperimenti fa sì che ciascuna risposta sperimentale venga utilizzata più di una volta in diverse combinazioni con le altre per il calcolo di:

- risposta media,
- gli effetti principali (anche dei fattori originali),
- gli effetti delle interazioni a due fattori (cioè gli effetti di sinergia o antagonismo tra due fattori),
- gli effetti delle interazioni a tre fattori (cioè gli effetti di sinergia o antagonismi tra tre fattori),
- gli effetti delle interazioni di tutti i fattori presenti.

Per quanto riguarda la costruzione dei disegni fattoriali completi a due livelli, quella che viene chiamata la forma standard prevede che si scriva una prima colonna in cui si alternano un segno - e un segno +, per tante volte quante sono gli esperimenti totali ( $2^n$ ). La seconda colonna vede l'alternanza di due segni - e di due segni +. La j-esima colonna vede l'alternanza di  $2^{j-1}$  segni meno e  $2^{j-1}$  segni più e così via fino a che tutti i fattori non sono stati completati. La risultante matrice di segni - e + è la matrice sperimentale per un disegno fattoriale completo.

Nella Tabella 1 sono riportati i disegni fattoriali completi da 1 a 5 fattori:

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>
-	-	-	-	-
+	-	-	-	-
-	+	-	-	-

+	+	-	-	-
-	-	+	-	-
+	-	+	-	-
-	+	+	-	-
+	+	+	-	-
-	-	-	+	-
+	-	-	+	-
-	+	-	+	-
+	+	-	+	-
-	-	+	+	-
+	-	+	+	-
-	+	+	+	-
+	+	+	+	-
-	-	-	-	+
+	-	-	-	+
-	+	-	-	+
+	+	-	-	+
-	-	+	-	+
+	-	+	-	+
-	+	+	-	+
+	+	+	-	+
-	-	-	+	+
+	-	-	+	+
-	+	-	+	+
+	+	-	+	+
-	-	+	+	+
+	-	+	+	+
-	+	+	+	+
+	+	+	+	+

**Tabella 1**

La rappresentazione grafica (Figura 1), che spesso è molto utile per poter dare un'interpretazione immediata degli effetti, rappresenta ciascun esperimento con un punto nello spazio dei fattori. Chiaramente questa rappresentazione è utilizzabile direttamente soltanto nel caso in cui il numero di fattori considerati sia piccolo, poiché diversamente, utilizzandola, ci si deve limitare a studiare un sottoinsieme dei fattori presenti, conseguendo una visione parziale del problema.

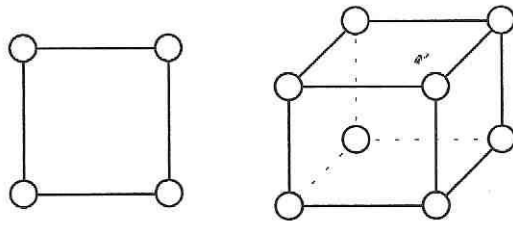


Figura 1

### 1.3 Randomizzazione

Per poter trattare statisticamente i risultati degli esperimenti, i fattori che producono l'errore sperimentale dovrebbero essere indipendenti gli uni dagli altri. Quando gli errori non sono causali ma dipendenti dal tempo è necessario ricorrere alla randomizzazione. In questa procedura i vari esperimenti vengono eseguiti in ordine casuale, in modo che anche gli errori sistematici dipendenti dal tempo possano influire "casualmente" sul dato finale.

### 1.4 Calcolo dell'effetto dei fattori.

I disegni fattoriali consentono di calcolare in modo molto semplice l'effetto dei fattori. Questo deriva dal fatto che i fattori presenti nella matrice sperimentale sono ortogonali gli uni agli altri, sono cioè indipendenti tra loro.

Supponiamo che siano stati effettuati gli esperimenti riportati nella Tabella 2, misurando per ogni esperimento la risposta riportata nella colonna Y.

Esp. n.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y
1	-1	-1	-1	
2	+1	-1	-1	
3	-1	+1	-1	
4	+1	+1	-1	

5	-1	-1	+1	
6	+1	-1	+1	
7	-1	+1	+1	
8	+1	+1	+1	

Tabella 2

Per prima cosa si calcola la risposta media che si ottiene dalla media delle 8 risposte ottenute durante la sperimentazione (colonna Y): passiamo ora al calcolo dell'effetto dei fattori, che definiamo come il cambiamento che viene indotto nella risposta per una variazione del fattore considerato dal valore minimo (corrispondente al -) al valore massimo (corrispondente al +).

Le prime due righe del piano sperimentale corrispondono a due esperimenti che differiscono soltanto per il valore di X1 a cui viene fatto funzionare l'impianto: quindi dalla differenza tra la resa dell'esperimento 2 ( $Y_2$ ) e la resa dell'esperimento 1 ( $Y_1$ ) si può stimare l'effetto che ha la variazione X1 sulla resa, indipendentemente dagli altri fattori che restano invariati.

Anche nel caso della seconda coppia di esperimenti tra i due esperimenti cambia soltanto il valore di X1, mentre gli altri due fattori restano costanti.

Quindi dalla differenza delle risposte per questi due esperimenti si ottiene la stima dell'effetto che ha il cambiamento di X1 sulla resa dell'impianto. Si noti che in questo caso il valore assunto dagli altri due fattori, X2 e X3, è diverso rispetto alla prima coppia di esperimenti.

Stime analoghe dell'effetto di X1 sulla resa si possono ottenere considerando a due a due gli altri esperimenti della tabella. La differenza tra le quattro stime dell'effetto di X1 sulla resa è dovuto al fatto che sono state ottenute in condizioni di volta in volta costanti nell'ambito della coppia di esperimenti, ma diverse da coppia a coppia, degli altri fattori.

È come se si fossero effettuate 8 misure di cui 4 al valore alto e 4 al valore basso di questo fattore. Questo procedimento deve essere ripetuto per gli altri 2 fattori.

### *1.5 Metodi rapidi per il calcolo degli effetti.*

Un metodo più rapido per il calcolo degli effetti dei fattori prende il nome di algoritmo di Yates. Per utilizzare questo metodo, la matrice sperimentale deve essere scritta disponendo gli esperimenti nell'ordine standard descritto precedentemente.

Conviene, per chiarezza, illustrare l'utilizzo dell'algoritmo di Yates con un esempio. Consideriamo quindi il nostro impianto chimico:

T	P	C	Y	(1)	(2)	(3)	divisore	effetto	fattore
-	-	-	40	104	188	388	8	48.5	media
+	-	-	64	84	200	184	4	46	T
-	+	-	28	110	52	-40	4	10	P
+	+	-	56	90	132	12	4	3	TP
-	-	+	24	24	-20	12	4	3	C
+	-	+	86	28	-20	80	4	20	TC
-	+	+	10	62	4	0	4	0	PC
+	+	+	80	70	8	4	4	1	TPC

**Tabella 3**

In Tabella 3 è presentata la tabella che deve venir costruita secondo l'algoritmo di Yates: le risposte vengono utilizzate a coppie e la colonna (1) si ottiene dalla colonna Y nel seguente modo: la prima metà di valori (4 in questo caso), si ottiene dalla somma delle 4 coppie di risposte, le rimanenti 4 cifre si ottengono come differenza delle 4 coppie di risposte, sottraendo per ciascuna coppia il primo termine dal secondo.

La colonna (2) si ottiene dalla colonna (1) operando allo stesso modo e discorso analogo vale per la colonna (3), partendo dalla colonna (2). In generale si devono calcolare tante colonne quante sono le variabili del disegno fattoriale completo.

Il risultato che si ottiene nella colonna 3, diviso per il divisore, uguale alla metà del numero di esperimenti, fatta eccezione per il termine che corrisponde alla media, che viene diviso per il numero totale di esperimenti effettuati.

Il risultato corrisponde alla stima dell'effetto (identificato come descritto nel paragrafo riguardante le diverse rappresentazioni dei disegni fattoriali a due livelli) considerando i fattori che compaiono con segno positivo in ciascun esperimento.

Questo modo di effettuare il calcolo degli effetti dei fattori è veramente molto rapido, anche rispetto alla tecnica della matrice dei segni.

## *1.6 Regressione lineare multipla.*

Con l'avvento dei computer, però, si tende sempre di più ad effettuare il calcolo dei fattori in modo diverso; infatti, il disegno fattoriale può essere utilizzato per calcolare un modello di regressione con il metodo dei minimi quadrati lineari.

Per far questo è sufficiente utilizzare la matrice dei fattori codificati (scalati) a  $\pm 1$ .

Consideriamo il solito esempio dell'impianto chimico, con tre fattori  $x_1, x_2, x_3$ .

Il modello di regressione che si calcolerà, al fine del tener conto dell'intercetta (media), degli effetti principali e di tutte le interazioni, sarà del tipo:

$$y = c_0 + c_1x_1 + c_2x_2 + c_3x_3 + c_{12}x_1x_2 + c_{13}x_1x_3 + c_{23}x_2x_3 + c_{123}x_1x_2x_3$$

## *1.7 Determinazione degli effetti rilevanti.*

Una volta calcolati gli effetti dei fattori, lo scopo successivo, come visto, consiste nello stabilire quali di questi siano significativamente diversi da 0. Questo porta a definire quali fattori o interazioni contribuiscano a modellare la funzione risposta. Utilizzando le variabili o interazioni significative si può costruire successivamente un modello matematico che può essere utilizzato per spiegare la funzione risposta e/o per predire il comportamento del sistema all'interno del range di validità del modello.

La determinazione degli effetti rilevanti può essere fatta attraverso un confronto dell'effetto calcolato con l'errore sperimentale, o meglio, con l'incertezza sulla stima dell'effetto. Questo confronto può venire eseguito in modo rigorosamente statistico mediante un t test in cui la distribuzione t di riferimento avrà un numero di gradi di libertà pari al numero di gradi di libertà utilizzati per la stima dell'errore dell'effetto ed una varianza pari alla varianza dell'effetto stesso.

Operando in questo modo si può stabilire, al livello di confidenza desiderato, se il valore di un effetto sia significativamente diverso da 0. Il test si esegue nel modo consueto, confrontando il valore dell'effetto con:

$$t_{\alpha} S_b$$



dove  $t$  è il valore della  $t$  di Student per  $v$  gradi di libertà al livello di confidenza  $\alpha$  ed  $s_b$  è l'errore stimato per l'effetto  $b$ . Se l'effetto ha un valore maggiore di quello di  $t_{\alpha} s_b$ , l'effetto stesso deve essere considerato significativo ad un livello di confidenza  $\alpha$ .

## 1.8 Stima dell'errore degli effetti

L'errore sperimentale, da cui si può calcolare la stima dell'errore degli effetti, può essere stimato mediante repliche della stessa misura (spesso si effettua a questo scopo un certo numero di repliche di un esperimento posto al centro del dominio sperimentale), ovvero con repliche di esperimenti diversi.

Il valore stimato per ciascun effetto deriva da un calcolo del tipo:

$$\text{effetto} = \bar{y}_+ - \bar{y}_-$$

Se si può considerare che gli esperimenti effettuati ai valori alti  $\bar{y}_+$  e bassi  $\bar{y}_-$  (-) siano distribuiti intorno a medie diverse, ma con la stessa dispersione (ipotesi di omoscedasticità), allora valgono le leggi della statistica campionaria, per cui, data  $s^2$  la varianza delle due popolazioni di cui gli  $N_+$  ed  $N_-$  esperimenti costituiscono rispettivamente un campione, si ha:

$$V(\bar{y}_+) = \frac{s^2}{N_+}; \quad V(\bar{y}_-) = \frac{s^2}{N_-}$$

ed inoltre, assumendo l'indipendenza degli errori effettuati nelle due condizioni sperimentali diverse, si ottiene:

$$V(\text{effetto}) = V(\bar{y}_+ - \bar{y}_-) = \left( \frac{1}{N_+} + \frac{1}{N_-} \right) s^2$$

che si semplifica, se è stato effettuato lo stesso numero di repliche oppure se la stima dell'errore è ottenuta esternamente al disegno fattoriale (per esempio con repliche dell'esperimento centrale), in:

$$V(\text{effetto}) = V(\bar{y}_+ - \bar{y}_-) = \left( \frac{1}{N/2} + \frac{1}{N/2} \right) s^2 = \frac{4}{N} s^2$$

Una volta noto l'errore sperimentale, il calcolo dell'incertezza degli effetti si effettua dunque mediante l'espressione:

$$\sqrt{V(\text{effetto})} = s_b = 2 \sqrt{\frac{s_e^2}{n}}$$

### 1.9 Test del modello e dei risultati

L'adeguatezza del modello di regressione può essere valutata in molti modi. Uno dei test proposti, che può essere effettuato in fase iniziale per verificare se il modello calcolato sia significativamente migliore del modello di ordine zero, rappresentato dal valore medio delle risposte, consiste in un test F. Tale test viene effettuato nel seguente modo:

$$F_{calc} = \frac{\sum_{i=1,n} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \frac{1}{p-1}}{\sum_{i=1,n} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \frac{1}{n-p}}$$

dove  $y_i$  è il valore stimato della risposta dell'esperimento  $i$ -esimo mediante il modello di regressione,  $n$  è il numero di esperimenti,  $p$  è il numero di parametri presenti nel modello (numero di fattori e interazioni più la media),  $\bar{y}$  è la media delle risposte ed  $y_i$  è la risposta sperimentale dell' $i$ -esimo esperimento. Nella formula data,  $(p-1)$  e  $(n-p)$  sono i gradi di libertà delle due varianze che vengono confrontate: a numeratore vi è quella che viene chiamata somma dei quadrati dovuti alla regressione mentre a denominatore vi è la cosiddetta somma dei quadrati dei residui. Se il valore di  $F_{calc}$  è maggiore del corrispondente valore tabulato della F di Fisher per  $p-1$  ed  $n-p$  gradi di libertà, ad un livello di confidenza  $\alpha$  (generalmente si usa  $\alpha=0.05$ , da cui il livello di confidenza è al 95% o  $\alpha=0.01$  che corrisponde ad un livello di confidenza al 99%), ci si deve aspettare che almeno uno dei coefficienti stimati sia significativamente diverso da 0.

Tuttavia il modo più semplice per valutare l'adeguatezza di un modello passa per l'analisi dei residui, cioè degli errori che si commettono nel calcolo della risposta per gli esperimenti effettuati utilizzando il modello calcolato.

### 1.10 Analisi dei residui

Se il modello è adeguato, i residui devono derivare esclusivamente dall'errore sperimentale. Quindi ci si deve attendere che gli stessi residui siano distribuiti normalmente intorno allo 0, esattamente come ci si aspettava di osservare per gli effetti calcolati se le risposte fossero state casuali. Quindi, dopo aver calcolato i residui stessi, si possono utilizzare le carte di probabilità normalizzata per rappresentarli, in modo analogo a quanto fatto per gli effetti, per verificare se esistono delle anomalie nella loro distribuzione. Se vi sono residui anomali, significa che probabilmente vi è un errore sistematico e quindi il modello non è adeguato.

Un'altra rappresentazione utile consiste nel riportare i residui in funzione della risposta corrispondente. Nella Figura 2 sono riportati alcuni esempi di andamenti tipici:

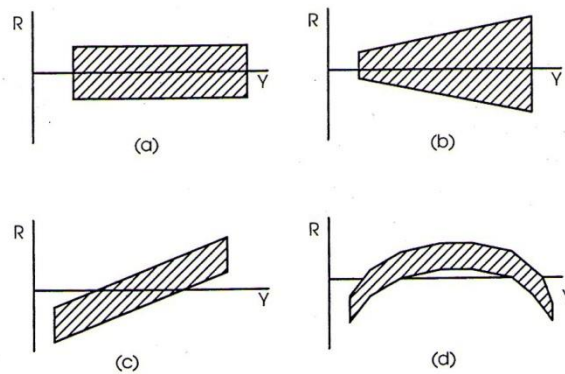


FIGURA 2

Figura 2

Il risultato che ci si aspetta è una distribuzione casuale dei punti, sopra e sotto l'asse delle ascisse, con i limiti maggiore (sopra l'asse delle ascisse) e minore (sotto l'asse delle ascisse) costituiti approssimativamente da due linee parallele all'asse stesso, come in figura 2 (a).

Questo tipo di rappresentazione può mettere in evidenza svariati andamenti patologici che indicano un'inadeguatezza del modello di base. Per esempio, se i residui si dispongono in modo tale che i limiti massimo e minimo dei residui divergono o convergono (figura 2 (b)), si ha un'indicazione dell'esistenza di una distribuzione dell'errore non omoscedastica, non indipendente cioè dal valore della risposta. In questo caso viene violata una delle assunzioni che erano state fatte all'inizio della discussione dei disegni fattoriali, cioè la costanza dell'errore nel dominio sperimentale. Per ovviare a questo inconveniente ed ottenere una distribuzione dell'errore pressoché costante, si può ricorrere ad un cambiamento della metrica della variabile risposta attraverso l'utilizzo di alcune trasformazioni, come per esempio il logaritmo, la log-normale, o la trasformazione di Box-

Cox. Una volta effettuata la trasformazione i calcoli devono essere ripetuti con la nuova risposta come si può vedere al paragrafo 2.5.

In figura 2 (c) si ha il comportamento tipico dell'aver tralasciato un fattore rilevante o dell'aver commesso qualche errore nel calcolo del miglior modello di regressione, con l'introduzione di un errore sistematico.

Altri casi interessanti si hanno quando la distribuzione dei residui assume un andamento parabolico, come in figura 2 (d), caso in cui probabilmente al modello manca un termine quadratico.

Un'altra rappresentazione che può tornare utile consiste nel disporre i residui in funzione dell'ordine di esecuzione degli esperimenti. Se la distribuzione temporale dei residui non è casuale, vi sono indicazioni di una dipendenza dell'errore dal tempo, per esempio per una delle ragioni citate quando si è parlato della randomizzazione, quindi si devono analizzare le modalità di effettuazione della sperimentazione ed il sistema stesso per cercare di comprenderne la causa di un simile comportamento. I normali programmi dei computer per il calcolo di modelli di regressione forniscono generalmente il valore dei residui per i punti sperimentali disponibili.

Tuttavia, il calcolo dei residui può venire effettuato in modo molto rapido anche senza l'ausilio dei calcolatori mediante *l'algoritmo di Yates inverso*.

### 1.11 Algoritmo di Yates inverso

Innanzitutto, si deve partire dal risultato del metodo di Yates per il calcolo dell'effetto dei fattori ma si deve scrivere la matrice sperimentale, e quindi tutti i dati, in ordine inverso a quello standard (vedi Tabella 4)

T	P	C	fattore	(0)	(1)	(2)	(3)	div.	$Y_{calc}$	$Y_{exp}$	residuo
+	+	+	TPC	0	0	80	612	8	76.5	80	3.5
-	+	+	PC	0	80	532	84	8	10.5	10	-0.5
+	-	+	TC	80	-40	-80	692	8	86.5	86	-0.5
-	-	+	C	0	572	164	164	8	20.5	24	3.5
+	+	-	TP	0	0	80	452	8	56.5	56	-0.5

-	+	-	P	-40	-80	612	244	8	30.5	28	-2.5
+	-	-	T	184	-40	-80	532	8	66.5	64	-2.5
-	-	-	media	388	204	244	324	8	40.5	40	-0.5

Tabella 4

Per un disegno fattoriale  $2^k$ :

1. la colonna k-esima dell'algoritmo di Yates standard viene scritta in ordine inverso
2. i valori corrispondenti ad effetti non significativi vengono posti uguali a 0
3. si opera con l'algoritmo di Yates per  $k$  volte (somme e differenze a coppie successive)
4. nella colonna k-esima si ottengono i valori delle risposte stimate moltiplicati per  $2^k$ .

### 1.12 Test di curvatura

Se si sono utilizzati nella fase di screening i disegni fattoriali a 2 livelli ed avendo a disposizione una stima dell'errore sperimentale, attraverso l'esecuzione di alcune repliche dell'esperimento posto al centro del dominio sperimentale è possibile eseguire un test F per verificare la significatività della curvatura. In effetti, se il modello vero è costituito da un iperpiano, il valore della risposta media per gli esperimenti effettuati al centro del dominio sperimentale deve essere poco differente dal valore calcolabile come media delle risposte ottenute ai vertici del dominio sperimentale. Quindi si può costruire il seguente test:

$$F = \frac{(\bar{Y}_l - \bar{Y}_0)^2}{s^2 \left( \frac{1}{n_l} + \frac{1}{n_0} \right)}$$

dove i due valori di  $\bar{Y}$  si riferiscono rispettivamente alla media delle risposte per gli esperimenti sui vertici ed al centro del disegno sperimentale, gli  $n$  sono rispettivamente il numero di esperimenti effettuati sui vertici ed al centro, mentre  $s^2$  è il valore dell'errore sperimentale stimato.

Questa stima può essere ottenuta direttamente da alcune repliche dell'esperimento centrale, oppure come varianza pooled, se anche gli esperimenti ai vertici sono stati replicati.

Se si ha che  $F > F_{1,v,\alpha}$ , cioè che il valore calcolato per F eccede il valore delle tabelle per 1,  $v$  gradi di libertà si può concludere che al livello di confidenza  $\alpha$  considerato vi è una

curvatura significativa del sistema in esame, una curvatura che non può essere ovviamente spiegata con il modello lineare utilizzato. Il numero di gradi di libertà,  $v$ , è il numero di gradi di libertà con cui viene determinato l'errore sperimentale ed è uguale a  $n_0-1$  se le repliche vengono effettuate soltanto al centro del dominio, mentre vale  $n_0 - n - 1$ , ( $n$  essendo il numero di esperimenti del disegno sperimentale fattoriale) se si sono eseguite  $n_0$  repliche dell'esperimento al centro ed uno stesso numero di repliche di ciascun esperimento del piano fattoriale. La curvatura presuppone che almeno uno dei coefficienti dei termini quadratici dell'ipotetico modello del secondo ordine sia significativamente diverso da 0, ma non può dare, ovviamente, alcuna informazione circa quale di questi coefficienti sia diverso da 0.

I disegni sperimentali più utilizzati quando si intenda calcolare un modello completo del secondo ordine sono i disegni Compositi, i disegni di Hoke e di Box-Behnken ed i disegni di Doehlert.

### *1.13 Piano a Stella*

Il piano a stella (Star Design) rappresenta l'approccio più simile al metodo tradizionale di studiare una variabile alla volta. Nella sua forma più semplice il dominio viene investigato eseguendo due esperimenti per ogni fattore sperimentale, uno a destra e l'altro a sinistra del centro, disposti simmetricamente rispetto a questo. Agli esperimenti lungo gli assi si aggiunge l'esperimento al centro che di solito viene replicato alcune volte, per poter valutare l'errore sperimentale. A volte il dominio viene studiato con un disegno a stella asimmetrico.

Questo piano sperimentale consente il calcolo di un modello del secondo ordine senza interazioni. L'esistenza di 3 livelli per ogni fattore sperimentale in effetti permette di valutare la curvatura della funzione risposta.

## ***CAPITOLO 2***

## 2 *Validazione Metodi*

La validazione del metodo verifica l' idoneità dei metodi analitici e può essere classificata in primaria e secondaria. La validazione primaria è un processo sperimentale il cui scopo è stabilire i limiti operativi e le performance del nuovo metodo analitico. I parametri (identificano le prestazioni globali del metodo) che vengono normalmente determinati durante la validazione primaria sono:

- precisione
- linearità
- accuratezza
- limite di rilevabilità
- limite di quantificazione
- selettività/specificità
- range

La validazione secondaria (Robustezza) è la capacità del metodo di non essere significativamente influenzato da piccole variazioni del metodo analitico. La validazione dovrebbe fornire un'indagine realistica sul numero e la varietà degli effetti riscontrati durante l'uso del metodo, coprendo l'intervallo di concentrazione usato e le tipologie di campioni che rientrano nel campo di applicazione del metodo analitico.

### 2.1 *Precisione*

La precisione si definisce come il grado di concordanza di valori indipendenti ottenuti con un procedimento di analisi in condizioni ben specificate. La precisione viene normalmente studiata su due livelli:

- ripetibilità;
- riproducibilità.

La ripetibilità è la misura della precisione nelle stesse condizioni sperimentali e in un piccolo intervallo temporale (within-day). La riproducibilità è definita come la variazione della risposta di un metodo analitico nelle stesse condizioni sperimentali, ma in tempi



diversi (between-day). La precisione viene normalmente rappresentata dalla deviazione standard percentuale.

## 2.2 *LOD & LOQ*

Il limite di rilevabilità (LOD) è la minore concentrazione di analita che può essere determinata ma non necessariamente quantificata, cioè il limite inferiore di applicabilità del metodo. LOD può essere calcolato utilizzando la deviazione standard ( $\sigma$ ) della risposta e la pendenza della curva di calibrazione. La deviazione standard può essere determinata sia dalla  $\sigma$  dei bianchi sia dalla  $\sigma$  della intercetta  $y$  della regressione lineare.

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma}{s}$$

Il limite di quantificazione (LOQ) può essere calcolato in tre modi diversi. Il primo approccio consiste nell'uso di una valutazione visiva. LOQ viene determinato analizzando il campione a livelli di concentrazioni note e stabilendo il minimo livello per il quale l'analita può essere quantificato con una precisione ed accuratezza accettabile. Il secondo approccio determina il rapporto segnale rumore confrontando i segnali misurati a basse concentrazioni note del campione e del bianco. LOQ è la minima concentrazione in cui l'analita può essere quantificato e corrisponde al rapporto S/R pari a 10:1. Il terzo approccio calcola LOQ dall'equazione:

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{s}$$

$S$  rappresenta la pendenza della curva di calibrazione

$\sigma$  rappresenta la deviazione standard dell'intercetta  $y$  della regressione lineare

## 2.3 *Linearità*

E' l'abilità del metodo di ottenere un risultato direttamente, o meglio definito da una trasformazione matematica, proporzionale alla concentrazione di analita nel range studiato. Le variabili che possono essere usate per quantificare l'analita sono le aree dei picchi, l'altezza dei picchi, ecc. La quantificazione degli analiti dipende dalla legge di Lambert Beer per metodi spettroscopici su un range di concentrazione. La linearità viene

determinata visivamente attraverso la costruzione di un grafico dove si riporta il segnale in funzione della concentrazione di analita. Successivamente verrà calcolata la curva di calibrazione attraverso il metodo dei minimi quadrati.

## 2.4 Specificità

La specificità è l'abilità di valutare inequivocabilmente un analita in presenza di altri composti. Per valutare la specificità viene generalmente analizzata la matrice del campione in assenza dell'analita e, dalla risposta, si verifica se ci sono segnali che possono interferire o sovrapporsi al segnale della sostanza da analizzare. Nel caso delle metodiche HPLC un requisito ragionevole per determinarne la specificità è che vi sia una separazione alla linea di base dell'analita da tutte le altre sostanze che possono essere presenti.

## 2.5 Range

Il range di una procedura analitica è l'intervallo tra la maggiore e la minore concentrazione di analita nel campione per il quale è stato dimostrato che la procedura presenta un buon livello di precisione, accuratezza e linearità. Il range è normalmente espresso nelle stesse unità usate nei risultati dei test ottenuti dalla procedura analitica.

## 2.6 Accuratezza

Misura della concordanza della media dei dati sperimentali ed il valore vero. Quindi misura la capacità del metodo analitico di fornire valori vicini a quelli reali.

$$a = \frac{\bar{x} \cdot \mu}{\mu} \cdot 100$$

$\bar{x}$  media delle misure

$\mu$  valore vero

## 2.7 Robustezza

Studio sperimentale intra-laboratorio dove viene valutata l'influenza di piccoli cambiamenti, alle condizioni sperimentali, sul responso calcolato o misurato. Le modifiche introdotte riflettono i cambiamenti che si possono avere quando il metodo viene riprodotto in un altro laboratorio, da un'altra persona, utilizzando strumenti diversi, etc.

Il test della robustezza può essere suddiviso in 6 steps:

- selezione e identificazione dei fattori operazionali che devono essere studiati;
- Selezione dei livelli dei fattori studiati. Normalmente per la valutazione della robustezza i livelli studiati sono 2 o 3;
- Scelta del disegno fattoriale;
- Svolgimento degli esperimenti descritti dal piano fattoriale. Parte sperimentale del test sulla robustezza;
- Calcolo degli effetti dei fattori sulla risposta del metodo, per identificare i fattori rilevanti;

## 2.8 *Calcolo della deviazione standard dell'intercetta e della pendenza della retta di calibrazione*

La retta di calibrazione ci permette di determinare la concentrazione degli analiti studiati in campioni incogniti e di stimare i limiti di determinazione e di quantificazione del metodo analitico.

Quindi il calcolo degli errori sui valori dell'intercetta e della pendenza diventa molto importante. La stima di questi errori richiede il calcolo di alcuni parametri statistici. Il primo parametro che è stato calcolato è  $S_{y/x}$ , che ci da la stima del l'errore casuale dell'asse y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Dove:

$y_i - \hat{y}_i$  sono i residui su  $y$  ( $\hat{y}_i$  viene calcolato sostituendo il valore  $x$  di concentrazione nella retta di calibrazione).

$n-2$ , dove  $n$  è il numero di punti usati per la calibrazione e 2 è il numero di gradi di libertà persi, infatti solo una linea passa per due punti.

Quando il valore di  $S_{y/x}$  è noto, è possibile calcolare la deviazione standard della pendenza e dell'intercetta usando le seguenti equazioni:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Deviazione standard della pendenza

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Deviazione standard dell'intercetta

I valori così calcolati di  $S_a$  e  $S_b$  possono essere usati per calcolare il limite di confidenza sui valori di pendenza ed intercetta, che sono definiti dalle equazioni:

$$a \pm t_{(n-2)S_a} \quad \text{per l'intercetta}$$

$$b \pm t_{(n-2)S_b} \quad \text{per la pendenza}$$

Il valore tabulato di  $t$  si riferisce ad un livello di confidenza del 95% e per  $n-2$  gradi di libertà.

## 2.9 *t-test per la significatività dell'intercetta*

Per capire se il valore dell'intercetta è significativamente diverso da zero è stato effettuato un  $t$ -test. Ipotesi  $H_0$ : il valore dell'intercetta è statisticamente diversa da zero.

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{S}$$

dove:

$\bar{x}$  è il valore calcolato dell'intercetta

$n$  è il numero di punti della retta di regressione

$s$  è il valore della deviazione standard dell'intercetta

Il valore di  $t$  così calcolato viene comparato con il valore tabulato della distribuzione statistica di  $t$ , al livello di confidenza scelto (normalmente 95%) e per  $n-1$  gradi di libertà.

Se:

$|t|_{calcolato} > t_{tabulato}$  l'ipotesi  $H_0$  è falsa quindi il valore dell'intercetta è statisticamente diverso da zero e verrà espressa nella retta di calibrazione.

$|t|_{calcolato} < t_{tabulato}$  l'ipotesi  $H_0$  è vera quindi il valore dell'intercetta non è statisticamente diverso da zero e la curva di calibrazione verrà espressa:  $y=(a \pm S_a)x$

## 2.10 *t-test per il parallelismo tra rette di regressione*

Per valutare se due o più rette di regressione, con coefficienti angolari  $b_1, b_2, b_3 \dots$  calcolato su un campione di dati  $n_1, n_2, n_3 \dots$ , sono parallele le pendenze di queste rette possono essere comparate da un  $t$ -test per verificare l'ipotesi nulla  $H_0: \beta_1 = \beta_2$  contro l'ipotesi alternativa  $H_1: \beta_1 \neq \beta_2$ .

Il  $t_{(N-4)}$  è calcolato secondo l'equazione 5:

$$t_{(N-4)} = \frac{b_1 - b_2}{es(b_1 b_2)} \quad \text{eq.5}$$

Dove:

$b_1$  è la pendenza della prima retta di calibrazione calcolata sul campione di dati  $n_1$

$b_2$  è la pendenza della seconda retta di calibrazione calcolata sul campione di  $n_2$

$es(b_1 b_2)$  è l'errore standard della differenza tra le due pendenze  $b_1$  e  $b_2$

Il valore di  $t_{(N-4)}$  così calcolato viene comparato con il valore tabulato della distribuzione statistica di  $t$ , al livello di confidenza scelto (normalmente 95%) e per  $n-1$  gradi di libertà.

Se:

$|t|_{calcolato} > t_{tabulato}$  l'ipotesi  $H_0$  è falsa quindi le rette non sono parallele.

$|t|_{calcolato} < t_{tabulato}$  l'ipotesi  $H_0$  è vera quindi le rette sono parallele.

## 2.11 ANOVA Analisi della Varianza

### 2.11.1 Test ANOVA sulle medie

L'analisi della varianza (ANOVA, Analysis of Variance) è una tecnica di analisi dei dati, facente parte della statistica inferenziale, che consente di verificare ipotesi relative a differenze tra le medie di due o più popolazioni. Questa tecnica statistica essendo un test parametrico può essere applicato solo in presenza di una distribuzione libera di dati.

Nell'impostazione ANOVA, la varianza osservata in una particolare variabile è partizionata in componenti attribuibili alle diverse fonti di variazione. Infatti la devianza totale SST, *sum of squares* somma totale dei quadrati degli scarti, può essere scomposta in due componenti: *devianza interna ai gruppi* SSW (Sum of Squares Within) che è la somma dei quadrati degli scarti tra le osservazioni e la relativa media di gruppo, ovvero la variabilità delle osservazioni all'interno di ogni gruppo e la *devianza tra i gruppi* SSB (Sum of Squares between) che è la somma dei quadrati degli scarti (differenza tra i valori medi di gruppo e la media generale), ovvero la variabilità tra i diversi gruppi.

Le devianze appena descritte, considerando  $a$  trattamenti/gruppi costituiti da  $n$  osservazioni  $x_{ij}$ , sono le seguenti:

$$SST = SSB + SSW$$

$$\sum_{j=1}^a \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 = n \cdot \sum_{j=1}^a (\bar{x}_j - \bar{\bar{x}})^2 + \sum_{j=1}^a \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$$

Mentre i gradi di libertà (gdl) per ognuna delle componenti della variabilità sono:

$$(n \cdot a - 1) = (a - 1) + a \cdot (n - 1)$$

Le varianze MS si ottengono dal rapporto della devianza con i rispettivi gradi di libertà:

$$SSB / (a - 1) + SSW / a(n - 1) = MSB + MSW$$

Il test statistico implica l'introduzione di una ipotesi nulla  $H_0$  a cui si contrappone una ipotesi alternativa  $H_1$ , che sono esaustive e mutuamente esclusive. Si assume come ipotesi

nulla che non vi siano differenze tra i trattamenti e che le fluttuazioni osservate siano legate al caso:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_a$$

Come ipotesi alternativa si assume che l'assunzione di partenza sia falsa, ovvero che vi sia almeno un trattamento appartenente ad un'altra popolazione:

$$H_0 = \mu_1 \neq \mu_2 \dots \text{ e/o } \mu_j \neq \mu_a$$

Il rapporto tra le varianze  $MSB / MSW$  segue la distribuzione F, quindi può essere utilizzato per esaminare l'ipotesi sulla significatività della differenza tra la variabilità dovuta al trattamento e quella residua:

$$MSB/MSW = F_{((a-1), a(n-1))} \text{ con } \alpha = 0,05$$

Se il rapporto tra le due varianze  $F_0$  è maggiore del valore tabulato di  $F_{tab}$ , per  $(a-1)$ ,  $a(n-1)$  gradi di libertà ed un livello di confidenza pari al 95%, l'ipotesi  $H_0$  viene rigettata quindi i gruppi considerati non possono essere considerati uguali. Viceversa se  $F_0$  risulta minore di  $F_{tab}$  l'ipotesi nulla è vera e i gruppi risultano appartenere alla stessa popolazione.

## ***CAPITOLO 3***



### 3 Le celle di Gratzel

Le piante, mediante complesse serie di reazioni, sono in grado di convertire l'energia solare in energia chimica. Queste reazioni avvengono in organelli cellulari chiamati *cloroplasti*, in cui sono presenti i pigmenti fotosintetici. I portatori di carica che vengono utilizzati nella sintesi dei carboidrati hanno origine in questi organelli cellulari. I pigmenti possono essere considerati delle antenne in grado di assorbire i fotoni. Questa energia, trasferita poi a una molecola di colorante vicina, innescherà il trasferimento di elettroni dall'acqua al NADP, al quale seguirà poi la sintesi dei carboidrati.

Nelle celle di *Graetzel*, chiamate anche celle solari sensibilizzate al colorante o celle fotoelettrochimiche, il NADP è sostituito da uno strato sottile di nanoparticelle di ossido di titanio, il colorante è utilizzato come fonte di elettroni, come l'acqua per le piante, e lo iodio rappresenta l'accettore/trasportatore di elettroni in analogia al biossido di carbonio nella fotosintesi.

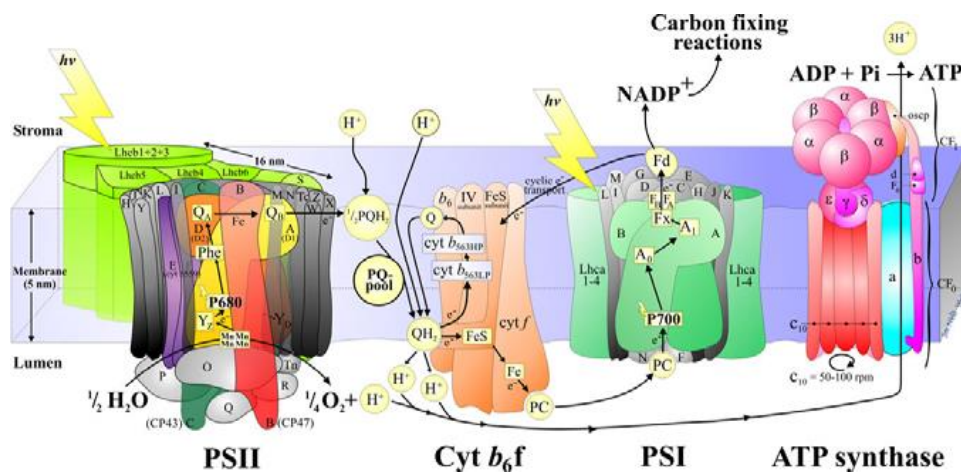


Figura 3 Complessi coinvolti nella reazione di fotosintesi.

Quindi le celle di *Grätzel* sono dei dispositivi in grado di convertire l'energia solare in energia elettrica in maniera simile alla fotosintesi.

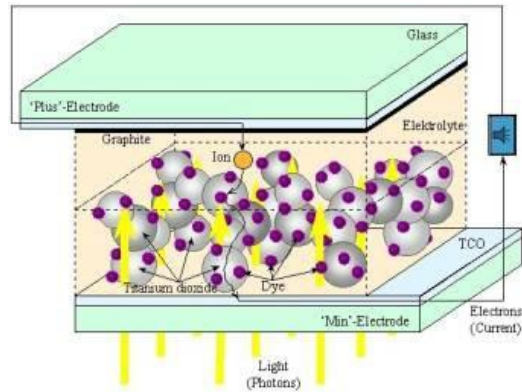


Figura 4

La cella è costituita:

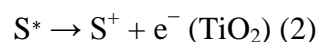
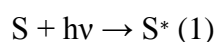
- Foto-elettrodo;
- Colorante;
- Contro-elettrodo;
- Elettrolita.

Le celle sono quindi costituite da un foto-elettrodo, su cui è depositato uno strato di ossido di titanio nanocristallino con elevato fattore di rugosità, dal colorante organico adsorbito dall'ossido stesso, dall'elettrolita che assicura la rigenerazione del colorante e in fine dal contro-elettrodo, come mostrato in figura 2.

### 3.1 Funzionamento di una DSSC

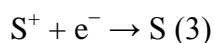
I seguenti passaggi convertono i fotoni in corrente:

Il fotone incidente viene assorbito dalle molecole fotosensibilizzanti adsorbite sulla superficie di  $\text{TiO}_2$ . I fotoni eccitano queste molecole dallo stato fondamentale (S) allo stato eccitato ( $S^*$ ). Gli elettroni eccitati vengono iniettati nella banda di conduzione del film di  $\text{TiO}_2$  dell'elettrodo. Ciò comporta l'ossidazione del fotosensibilizzante ( $S^+$ ).

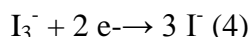


Gli elettroni iniettati nella banda di conduzione del  $\text{TiO}_2$  sono trasportati tra le nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$  mediante diffusione verso il TCO. E gli elettroni raggiungono finalmente il contro elettrodo attraverso il circuito esterno.

Il fotosensibilizzante ossidato ( $S^+$ ) accetta elettroni dal mediatore redox  $I^-$ , rigenerando lo stato fondamentale (S), e  $I^-$  viene ossidato a  $I_3^-$ .



Il mediatore redox ossidato,  $I_3^-$ , diffonde verso il contro elettrodo e si riduce a ioni  $I^-$ .



Le performance di una DSSC dipendono da quattro livelli energetici: lo stato eccitato (LUMO) e lo stato fondamentale (HOMO) del fotosensibilizzante, il livello di Fermi dell'elettrodo  $TiO_2$  locato vicino al livello della banda di conduzione e il potenziale redox del mediatore ( $I^-/I_3^-$ ) nell'elettrolita. La foto-corrente così ottenuta è determinata dalla differenza di energia tra l'HOMO e il LUMO del dye, analogo al band gap ( $E_g$ ) per i semiconduttori inorganici.

Il gap di energia tra il LUMO del fotosensibilizzante e la banda di conduzione del biossido di titanio ( $\Delta E_1$ ) risulta essere molto importante, il livello energetico del LUMO deve essere sufficientemente negativo rispetto alla banda di conduzione del  $TiO_2$  per poter iniettare gli elettroni. Invece L'HOMO deve essere sufficientemente positivo rispetto al potenziale redox della mediatore  $I^-/I_3^-$  per poter accettare gli elettroni ( $\Delta E_2$ ). (Il livello di Fermi è il più alto livello occupato in un sistema di fermioni alla temperatura dello zero assoluto.)

Il massimo voltaggio è attribuito al gap energetico tra il livello di Fermi (banda di conduzione) e il potenziale redox della coppia redox.

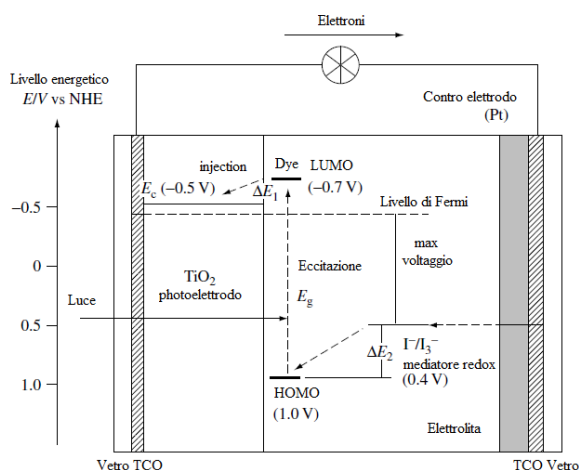


Figura 5 Diagramma energetico delle celle solari dye-sensitized

### 3.2 I fattori che influenzano l'efficienza delle dye-sensitized solar cells

Per poter ottenere le migliori performance è indispensabile capire a fondo i fenomeni/fattori che controllano i singoli componenti che costituiscono le celle DSSC:

- film nano-poroso dell'ossido: struttura, morfologia e proprietà elettriche ed ottiche;
- fotosensibilizzante: proprietà foto-fisiche, foto-chimiche e redox;
- elettrolita: proprietà elettriche e visco-elastiche;
- mediatore redox: proprietà ottiche e redox;
- Contro-elettrodo: proprietà ottiche ed elettriche.

A causa del così alto numero di parametri in gioco risulta molto difficile fabbricare in maniera riproducibile questi dispositivi [1, 2].

### *3.3 Fotosensibilizzante*

Il fotosensibilizzante, come parte cruciale nelle celle DSSC, deve soddisfare le seguenti caratteristiche:

Lo spettro di assorbimento del pigmento dovrebbe comprendere tutta la regione visibile e anche parte del vicino infrarosso (NIR).

- Il colorante deve possedere gruppi di ancoraggio per potersi legare alla superficie del semiconduttore.
- L'energia del livello dello stato eccitato del colorante deve essere maggiore rispetto a quella della banda di conduzione del semiconduttore, in modo da avere un trasferimento elettronico efficiente tra il colorante e il semiconduttore.
- Per la rigenerazione del colorante, il potenziale di ossidazione del Dye deve essere più positivo rispetto al potenziale dell'elettrolita.
- Bisogna evitare l'aggregazione delle molecole di colorante sulla superficie del semiconduttore, mediante utilizzo di coadsorbenti o attraverso l'ottimizzazione della struttura molecolare del Dye.

Per un colorante la stabilità termica, elettrochimica e la fotostabilità sono fondamentali.

#### *3.3.1 Ancoraggio del Dye sulla superficie del colorante*

I meccanismi di ancoraggio del colorante sulla superficie del semiconduttore possono essere raggruppate in sei modalità:

- Interazione covalente data dal legame diretto o mediante agenti di collegamento
- Interazione elettrostatiche: scambio ionico, ion-pairing o interazioni donatore-accettore.
- Legami idrogeno
- Interazioni idrofobiche tra i derivati degli acidi grassi a catena lunga.
- Fisisorbimento di molecole su superfici solide in cui sono coinvolte le forze di Van der Waals.
- Intrappolamento fisico all'interno dei pori o cavità del host.

L'efficienza delle celle solari dipende fortemente dalla modalità di assorbimento del colorante. I gruppi di ancoraggio più utilizzati per le DSSC, per la loro relativa stabilità e facilità di sintesi, sono l'acido carbossilico e i suoi derivati come per esempio gli esteri. Tuttavia, ci sono diverse modalità di legame tra l'acido carbossilico e la superficie dell'ossido (Figura 6): unidentate, bidentate chelating, bidentate bridging e due legami idrogeno differenti. Attraverso una misura FT-IR si ottengono dei dati vibrazionali sull'assorbimento del dye sulla superficie dell'ossido, che possono essere utilizzati per determinare le modalità di legame. Per ottenere questa informazione viene utilizzata la regola di Deacon-Philips:

$$\Delta\nu = \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$$

calcolando la frequenza di separazione tra lo stretching asimmetrico e simmetrico dei modi dell'unità carbossilica.

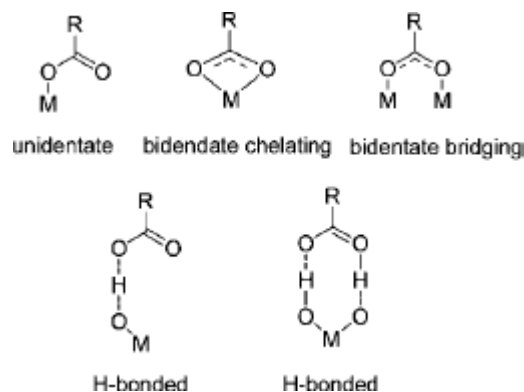


Figura 6

### 3.4 Elettrolita

Gli elettroliti più utilizzati nelle celle DSSC contengono la coppia redox  $I/I_3^-$ , la quale agisce da mediatore tra il foto-elettrodo e il contro-elettrodo. Normalmente si utilizzano miscele di ioduri come LiI, NaI, KI, ioduro di tetraalkylammonio ( $R_4NI$ ), e derivati imidazolici nel range di concentrazione 0,1-0,5 M e  $I_2$  da 0,05 a 0,1 M dissolti in solventi non protici (acetonitrile, propionitrile, methoxyacetonitrile, propilene carbonato, e loro miscele).

Le performance delle celle DSSC sono influenzate dal contro catione dello ioduro [3] (ad esempio  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , e  $R_4N^+$ ), in particolare l'efficienza aumenta al diminuire del raggio cationico ed è massima con lo ioduro di Litio. Vengono normalmente aggiunte altre sostanze all'elettrolita in modo da migliorarne le proprietà, come ad esempio la *tert*-butilpiridina che sopprime di fenomeni di ricombinazione e i liquidi ionici organici con anione ioduro la cui funzione è quella di aumentare la concentrazione dei portatori di carica.

Derivati imidazolici come il 1,2-dimethyl-3-hexylimidazolo ioduro (DMHImI) e il 1,2-dimethyl-3-propylimidazolium ioduro (DMPImI), portano ad una diminuzione della resistenza della soluzione dell'elettrolita e quindi a un miglioramento delle performance fotovoltaiche [4, 5].

Un altro fattore molto importante è il solvente che si userà nell'elettrolita. Il solvente utilizzato deve essere non tossico, avere bassa viscosità per avere così un'alta mobilità dei portatori di carica [6], non essere molto volatile alle condizioni operative, non provocare il desorbimento del colorante, essere inerte rispetto le componenti del dispositivo e possibilmente economico. Il solvente con il quale si sono ottenuti i migliori risultati, è l'acetonitrile. Questo solvente risulta però tossico e volatile alle condizioni operative. Vengono però utilizzati molti altri solventi come il metossiacetonitrile (Ferber et al. 2000), metossipropionitrile (Rijnberg et al. 1998), glutaronitrile (Kohle et al. 1997), butirronitrile (Kay & Grätzel; 1996), etilene carbonato (O'Regan & Grätzel 1991) e il propilene carbonato (Smestad et al. 1994).

### *3.5 Rigenerazione del fotosensibilizzante ossidato*

Il trasferimento elettronico dallo ione I<sup>-</sup> al fotosensibilizzante ossidato o la rigenerazione del dye sono i principali processi da realizzare per ottenere la separazione delle cariche. Queste reazioni sono molto più veloci rispetto alla ricombinazione della carica tra gli elettroni iniettati nel film e il dye ossidato, e la rapida rigenerazione del dye ossidato contribuisce al raggiungimento della separazione della carica.

### *3.6 Ossido conduttivo trasparente TCO*

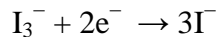
Come substrati per il film di TiO<sub>2</sub> vengono utilizzati ossidi conduttivi trasparenti. Per le alte prestazioni delle celle solari, il substrato deve avere bassa resistenza di strato ed elevata trasparenza. Inoltre, la resistenza di strato dovrebbe essere quasi indipendente dalla temperatura fino a 500°C, a causa della sinterizzazione dell'elettrodo di TiO<sub>2</sub> che viene condotta dai 450 ai 500°C.

### *3.7 Contro-elettrodo*

Il contro-elettrodo è costituito da un substrato di ossido trasparente conduttivo (TCO, 5-10 ug cm<sup>-2</sup>, o di spessore di 200 nm) su cui viene vaporizzata una soluzione di platino. Il lieve aumento della foto-corrente, ottenuto dalla deposizione del platino, è dovuto dalla riflessione della luce da parte del nuovo strato. L'attività elettro-catalitica dell'elettrodo TCO-Pt, per la riduzione degli ioni tri-ioduro, viene inoltre migliorata dalla formazione di colloidali di platino sulla superficie dell'elettrodo [9]. I colloidali di platino si ottengono depositando piccole quantità di una soluzione alcolica di H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> sulla superficie del substrato TCO-Pt, seguito da essiccazione e riscaldamento. Le proprietà del contro-elettrodo-Pt influenzano direttamente il fill factor della cella solare.

### 3.8 *La corrente nera (dark current)*

A causa dell'alta porosità del film di TiO<sub>2</sub>, sia il colorante che l'elettrolita possono occupare un qualsiasi sito libero del film, e trovarsi di conseguenza vicini. La corrente scura/nera (dark current) è la ricombinazione degli elettroni iniettati nel semiconduttore con gli ioni I<sub>3</sub><sup>-</sup>, ed è uno dei processi primari nelle DSSC. Questo fenomeno riduce significativamente il massimo voltaggio ottenibile, ed è equivalente alla ricombinazione lacuna-elettrone che si verifica nelle giunzioni p-n delle celle solari al silicio.



In teoria, questo fenomeno può avvenire sulla superficie dell'ossido di stagno a causa dell'incompleto ricoprimento del film da parte del biossido di titanio, ma in realtà avviene all'interfaccia TiO<sub>2</sub>/elettrolita a causa della grande area superficiale del film nano-cristallino. La corrente nera può essere soppressa grazie ad un co-adsorbente che isola i siti liberi della superficie dell'ossido dall'interazione degli ioni I<sub>3</sub><sup>-</sup>, per esempio l'acido chenodeossicolico.[1]

### 3.9 *Misurazione efficienza cella*

Molto importante per definire in modo univoco l'efficienza dei dispositivi fotovoltaici è considerare nella misura delle curve di polarizzazione la distribuzione spettrale della radiazione. A livello internazionale le condizioni standard di misura delle prestazioni dei convertitori solari fanno riferimento alla curva misurata utilizzando lo spettro della radiazione solare a massa d'aria AM = 1.5 ovvero alla radiazione del sole che ha attraversato una volta e mezzo l'atmosfera terrestre. L'irraggiamento in queste condizioni è di 1000 W/m<sup>2</sup>. Le misure inoltre sono svolte convenzionalmente alla temperatura di 25°C

### 3.10 *Materiali per l'assemblaggio delle celle*

Per prevenire la perdita dell'elettrolita e l'evaporazione del solvente è necessario un materiale sigillante che sia chimicamente e fotochimicamente stabile rispetto ai



componenti dell'elettrolita e ai solventi richiesti. Il Surlyn (Du Pont), copolimero dell'etilene e dell'acido acrilico, soddisfa queste richieste.

### 3.11 Efficienza delle celle DSSC

L'efficienza quantica, in una cella solare, è un parametro pari al numero di coppie elettrone-lacuna generate per singolo fotone incidente. È una misura della capacità della cella di convertire in elettricità una radiazione incidente a una data lunghezza d'onda. L'efficienza di conversione fotoni-corrente (IPCE), è data dal rapporto tra il numero di elettroni che danno luogo a una corrente in un circuito esterno e il numero di fotoni incidenti, ad una certa  $\lambda$ .

L'IPCE si ottiene dalla seguente equazione:

$$\text{IPCE}[\%] = \frac{1240[\text{eV nm}] \cdot J_{SC}[\mu\text{Acm}^{-2}]}{\lambda[\text{nm}] \cdot \Phi[\mu\text{Wcm}^{-2}]} \cdot 100$$

Dove  $J_{sc}$  è la corrente di corto circuito generata da una radiazione monocromatica di lunghezza d'onda  $\lambda$  e di intensità  $\Phi$ .

Integrando i valori di efficienza ottenuti al variare della lunghezza d'onda sull'intero spettro solare si ottiene l'efficienza complessiva della cella illuminata con luce bianca:

$$\eta = \frac{J_{SC} \cdot V_{OC} \cdot ff}{I_0} \cdot 100$$

Dove la  $V_{OC}$  è la tensione di circuito aperto,  $I_0$  è la potenza solare totale incidente sulla cella che è pari, in condizioni standard, (AM 1,5) a  $100\text{mW cm}^{-2}$  mentre f.f. è il fill factor o fattore di riempimento.

Le capacità di produrre tensione su un carico esterno e allo stesso tempo corrente attraverso esso, da cui deriva la produzione di potenza elettrica in condizioni di illuminazione, sono descritte dalla curva corrente-tensione (I-V), ottenute applicando un carico variabile alla cella e misurandone la corrente generata.

Quando il carico applicato alla cella è sufficientemente grande da non consentire il passaggio di corrente, condizione di circuito aperto, la tensione tra anodo e catodo è detta  $V_{OC}$ . In condizioni di corto circuito, la corrente prodotta dalla cella assume il valore massimo  $I_{SC}$ .

La massima potenza o potenza di picco ( $P_m$ ), il massimo della curva di potenza, si ottiene dalla moltiplicazione della corrente di picco  $I_m$  con la tensione di picco  $V_m$  (Figura 7).

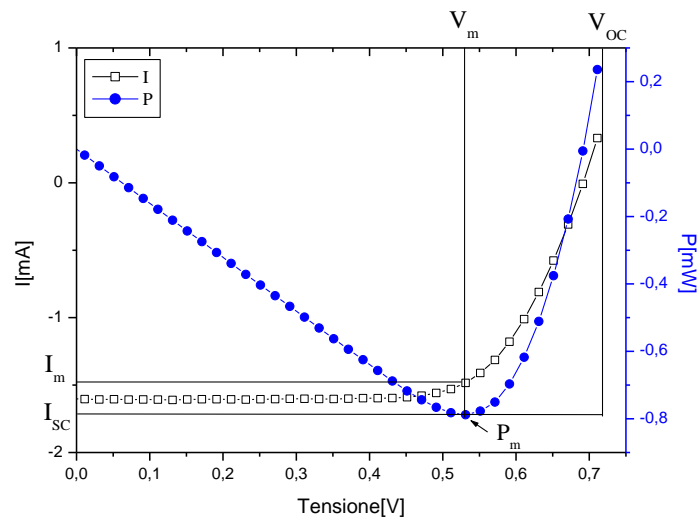


Figura 7

Il fattore di riempimento caratterizza la quadratura della curva corrente-tensione e viene descritto dalla seguente equazione:

$$FF = \frac{V_m \cdot I_m}{V_{OC} \cdot I_{SC}}$$

Dalla Figura 7 si può dedurre che il fill factor non è altro che il rapporto fra le aree dei rettangoli formati, rispettivamente, dalle coordinate  $V_m$  e  $I_m$  e dalle coordinate  $V_{oc}$  e  $I_{sc}$ , e rappresenta un indicatore della idealità della cella.

Una dye sensitized solar cell, può essere rappresentata mediante un circuito equivalente semplificato di questo tipo:

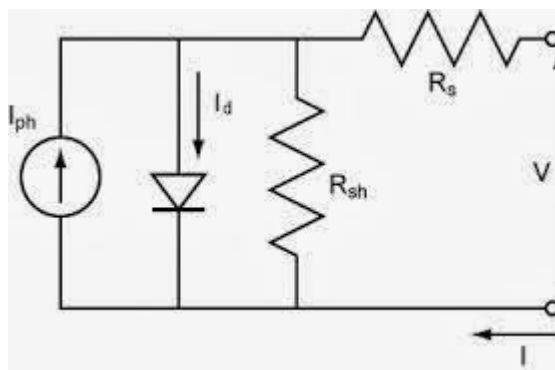


Figura 8

In cui  $R_s$  è la resistenza in serie che si genera nei punti di contatto tra i vari strati e nei contatti stessi, mentre  $R_{sh}$  è la resistenza in parallelo che tiene conto delle correnti che vengono dissipate a causa della ricombinazione. Per avere buone performance,  $R_s$  deve essere quanto più piccola possibile, mentre  $R_{sh}$  deve tendere ad infinito. [10].

In Figura 9 si può osservare come le resistenze  $R_s$  e  $R_{SH}$  influiscano sulle curve I-V, e di conseguenza sull'efficienza delle celle DSSC.

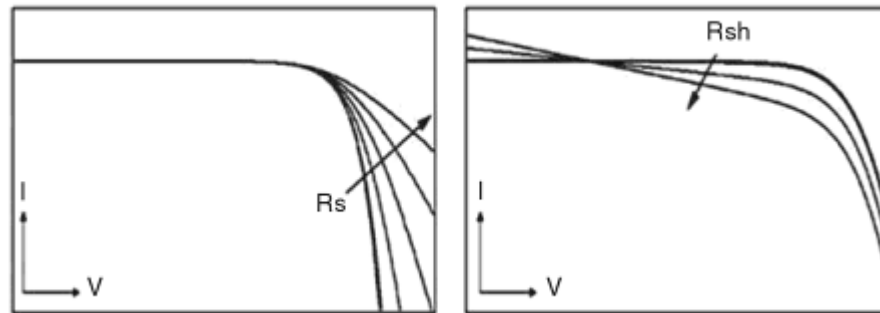


Figura 9. Illustrazione dell'influenza sulle curve I-V delle DSSC dell'aumento delle resistenze  $R_s$  e  $R_{SH}$ .

Quindi per migliorare le performance delle celle DSSC bisogna ottimizzare la  $V_{OC}$ ,  $I_{sc}$  e il f.f.

## ***CAPITOLO 4***

## ***4 PESTICIDI: CARATTERISTICHE ED IMPLICAZIONI AMBIENTALI***

### ***4.1 Ingresso nella catena alimentare, bioaccumulo e rischio per il consumatore***

I contaminanti [11], nel loro percorso attraverso i sistemi naturali, possono intercettare gli organismi viventi ed entrare nella catena alimentare, dando origine a potenziali fenomeni di tossicità o di accumulo negli organismi esposti.

L'entità di tali fenomeni e le relative velocità dipendono essenzialmente dalle proprietà chimico-fisiche della sostanza, dalle vie e dal tempo di esposizione, nonché dai meccanismi di assunzione e di eliminazione (inclusi i fenomeni metabolici) presenti nell'organismo.

Nel caso dell'uomo, ad esempio, i contaminanti, veicolati dai sistemi circolatori e linfatici, possono raggiungere un "recettore biologico", detto target, dove esplicare il loro effetto tossico (dovuto ad alterazioni biochimiche o fisiologiche), oppure possono essere accumulati in siti di deposito dove permangono per tempi più o meno lunghi. Inoltre, possono subire un processo metabolico che ne favorisce l'eliminazione. In alcuni casi, tuttavia, i metaboliti formati possono avere un'attività biologica più elevata, rispetto alla molecola che li ha generati.

Ogni sostanza, sia essa di origine naturale o sintetica, è tossica quando raggiunge una certa concentrazione nell'organismo e in particolare nel sito d'azione. Questa concentrazione tossica può essere ottenuta in seguito ad un'esposizione che può essere di tipo: orale, attraverso l'alimentazione, cutanea, attraverso l'epidermide ed inalatoria, attraverso le vie respiratorie.

Nel caso di vertebrati terrestri, come ad esempio l'uomo, la via alimentare risulta essere quella preponderante. Fin dai tempi remoti, del resto, la nostra specie ha imparato a stabilire una relazione causa/effetto tra l'assunzione di acqua o cibo contaminato e i fenomeni di intossicazione acuta. Molto più recente è invece la consapevolezza che si possono verificare degli effetti estremamente negativi sulla salute umana come conseguenza dell'assunzione, per lunghi periodi di tempo, di quantità limitate di contaminanti presenti negli alimenti (tossicità cronica).

La presenza nell'ambiente di una notevole quantità di molecole naturali o di sintesi tossiche, potenzialmente presenti come residui negli alimenti, ha stimato gli organi

preposti alla salute pubblica e l'industria alimentare a rivolgere una particolare attenzione al loro controllo. Gli alimenti, quindi, svolgono un ruolo fondamentale nel trasporto di queste sostanze dall'ambiente all'uomo. Il passaggio da un compartimento ambientale all'altro viene definito catena alimentare.

Nel corso dell'evoluzione gli organismi hanno sviluppato una serie di barriere contro i potenziali danni derivanti dal contatto con l'ambiente esterno. Tuttavia, per loro stessa natura, gli esseri viventi sono di fatto obbligati a interagire con l'ambiente per ricavarne gli elementi essenziali alla propria sopravvivenza.

Di conseguenza, le sostanze tossiche possono facilmente eludere queste barriere sfruttando le stesse vie, attraverso le quali, avviene lo scambio con l'esterno. L'assorbimento, ovvero l'ingresso del potenziale tossico nell'organismo, rappresenta quindi il primo passo per l'espletarsi di un effetto tossico; ovviamente, perché esso si verifichi, si presuppone un contatto tra la sostanza e un tessuto (diverso a seconda delle vie di esposizione) o, più precisamente, attraverso le membrane cellulari. In seguito al ripetuto contatto è possibile si attivino, in maniera più o meno marcata, effetti di tipo tossico o fenomeni di arricchimento in concentrazione di sostanze in tracce nell'organismo esposto.

I principali processi attraverso i quali si verifica un arricchimento in concentrazione nell'organismo come conseguenza di un'esposizione ambientale sono i fenomeni di:

- bioconcentrazione;
- bioaccumulo;
- biomagnificazione.

Possono essere reversibili o praticamente irreversibili e, per un certo livello di esposizione, dipendono dal tempo di contatto tra l'organismo e la sostanza. Le sostanze maggiormente accumulabili richiedono tempi di esposizione relativamente lunghi, per cui organismi a vita breve, come ad esempio alghe e batteri, sono meno soggetti a questi processi rispetto agli organismi superiori a vita lunga.

Il fenomeno di bioconcentrazione può essere definito come quel processo attraverso il quale gli organismi viventi, specialmente quelli acquatici, si arricchiscono di una sostanza dall'ambiente circostante attraverso le stesse superfici che consentono scambi gassosi, in particolare la respirazione. È un semplice processo di ripartizione della sostanza tra due fasi: una abiotica (ad esempio l'acqua) e una biotica (ad esempio il pesce).

Il bioaccumulo ha un'accezione più ampia: questo termine viene utilizzato quando si considerano tutte le possibili vie di entrata (respirazione, ingestione, contatto) del contaminante che portano ad un suo incremento in termini di concentrazione negli organismi viventi. Molto spesso è utilizzato quando il processo attraverso il quale si verifica l'incremento non è conosciuto.

La biomagnificazione, invece, rappresenta un fenomeno di accumulo crescente di una sostanza lungo la catena trofica (preda-predatori).

Trattandosi quindi di un fenomeno legato esclusivamente alla via alimentare può essere considerato un caso particolare di bioaccumulo.

In linea teorica, tutte le sostanze potenzialmente potrebbero bioconcentrare o bioaccumulare (includendo in questo termine anche la biomagnificazione), tuttavia, perché questi fenomeni siano evidenziabili:

- la sostanza deve persistere nell'ambiente per un tempo sufficiente da permettere il suo ingresso nell'organismo, in modo da raggiungere concentrazioni più alte rispetto all'esterno;
- i meccanismi metabolici (all'interno dell'organismo) non devono essere estremamente attivi (ad esempio gli idrocarburi clorurati) altrimenti i due fenomeni sarebbero scarsamente rilevanti (ad esempio gli alcani);
- le sostanze devono avere un range di LogKOW compreso tra 2 e circa 6,5.

Per valutare il rischio da residui di agrofarmaci negli alimenti occorre seguire una procedura che è costituita da quattro passaggi:

- 1) Identificazione del pericolo
- 2) Caratterizzazione del pericolo
- 3) Valutazione dell'esposizione
- 4) Caratterizzazione del rischio.

In quest'ultimo passaggio si integrano tutte le informazioni, sia di tipo quantitativo che di tipo qualitativo, raccolte precedentemente. Ovvero si interpretano tutte le indicazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche di una sostanza chimica in riferimento agli individui (tutta o parte di una popolazione) che a tale sostanza vengono esposti, tenendo comunque sempre presente che è la dose, e quindi la concentrazione, a determinare un effetto.

Si può affermare che l'esposizione agli alimenti, oltre ad avere un ruolo fondamentale nel trasporto di agrofarmaci dall'ambiente all'uomo, è un atto intenzionale.

La stima del rischio per l'uomo presenta non poche difficoltà dal punto di vista della trattazione dei dati. Infatti, se le conoscenze e gli studi sugli effetti sono generalmente di elevato livello e noti, le situazioni che possono determinare una possibile esposizione possono essere diverse. E' necessario, infatti, partire sempre dal presupposto che le caratteristiche da identificare non sono sempre le stesse per tutte le sostanze attive. Alcuni fattori come la presenza naturale negli alimenti, le abitudini alimentari e culturali devono essere tenuti bene in considerazione.

Gli alimenti contengono quindi, intenzionalmente o meno, un'ampia varietà di sostanze "indesiderate" quali tossine naturali, micotossine oltre ai residui da agrofarmaci e, come già ribadito, poiché la tossicità di una sostanza è funzione della probabilità che sia assorbita e che di conseguenza possa reagire con un potenziale target, la stima delle quantità assunte o ingerite ovvero la valutazione dell'esposizione, rappresenta un passaggio fondamentale.

#### *4.2 Valutazione del rischio per la salute umana da esposizione ad agrofarmaci*

La tossicologia [12] è la scienza che si occupa dell'identificazione e quantificazione degli effetti di un qualsiasi agente tossico su un organismo ad esso esposto. L'effetto tossico rappresenta la risultante di una serie di fenomeni che regolano il destino di una sostanza chimica all'interno dell'organismo, che descrivono:

- L'assorbimento della sostanza: a seconda della via di esposizione i processi che regolano l'assorbimento cambiano influenzando l'interazione con l'organismo.
- La distribuzione: una volta introdotta nell'organismo la sostanza entra nel circolo sanguigno e viene distribuita a tutto l'organismo o solo parzialmente in dipendenza delle sue caratteristiche.
- Il metabolismo: all'interno dell'organismo la maggior parte delle sostanze viene biotrasformata. Le reazioni avvengono principalmente, ma non esclusivamente, nel fegato.
- L'escrezione della sostanza: facilitata dai processi di biotrasformazione, attraverso varie vie (urinarie, feci, sudore, lacrime).



Per poter attraversare le membrane e quindi essere assorbite, le sostanze devono superare un doppio strato lipidico: devono perciò avere un certo grado di lipofilità per passare senza dispendio di energia (trasporto passivo). La lipofilità, caratteristica della maggior parte degli xenobiotici, fa sì che questi tendano ad accumularsi nell'organismo, soprattutto nel tessuto adiposo, raggiungendo dosi tossiche. Poiché l'eliminazione avviene attraverso soluzioni o mezzi acquosi, le sostanze lipofile non sono facilmente escreibili: per questo motivo, l'organismo è in grado di trasformare, attraverso una serie di reazioni enzimatiche, le sostanze estranee lipofile in molecole maggiormente idrofile, in modo tale da facilitarne l'escrezione e impedirne l'accumulo nell'organismo. La valutazione del rischio ecotossicologico può essere suddivisa in quattro fasi:

- Identificazione del pericolo: è opportuno distinguere il concetto di pericolo da quello di rischio. Infatti, mentre il pericolo è una caratteristica intrinseca della sostanza, il rischio esprime la probabilità che si verifichi un evento tossico mediato dall'esposizione alla sostanza stessa. In base a questa differenza, nel caso in cui non ci fosse alcuna possibilità di essere esposti, il rischio associato all'esposizione ad una sostanza estremamente tossica (elevato pericolo) sarà tendente a zero. L'identificazione del pericolo si occupa fondamentalmente dell'aspetto qualitativo e permette di rispondere alle domande: che cosa fa la sostanza? Che effetti produce? Dal punto di vista tossicologico questo aspetto è coperto essenzialmente da studi di tossicità acuta.

- Valutazione del rischio: l'effetto tossico è estremamente dipendente dalla dose: qualsiasi sostanza è in grado di assumere un effetto tossico se assunta in una dose sufficiente. Uno degli aspetti cruciali della tossicologia è infatti trovare una risposta alla domanda: a quale concentrazione/livello si produce l'effetto? Dalla conoscenza della dose necessaria a produrre un danno, si può capire se la presenza di una sostanza nell'ambiente, o se l'ingestione di una sostanza presente come residuo di un alimento, può essere sufficiente a causare un effetto tossico e dare indicazioni sulle misure da intraprendere per proteggere la salute. La concentrazione di una sostanza nell'organismo dipende dalla durata e dalla frequenza dell'esposizione: il livello efficace, ovvero la concentrazione alla quale l'effetto si verifica, può essere raggiunto sia dopo una singola esposizione, se è sufficientemente elevata, sia per esposizioni prolungate a dosi che, singolarmente, non sono tossiche. Tra i vari effetti si possono distinguere:

- l'effetto critico: è quello che si manifesta alle dosi più basse o che ha una maggiore rilevanza dal punto di vista tossicologico;
  - la NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), cioè la dose più alta alla quale non si registrano effetti;
  - La LOAEL (Low Observed Adverse Effect Level), cioè la dose minima in grado di provocare un effetto.
- Valutazione dell'esposizione: riguarda la stima della concentrazione dello xenobiotico a cui la popolazione è esposta. Si può valutare la dose di esposizione esterna all'organismo (quando si stima per calcolo la concentrazione della sostanza in una matrice ambientale e/o alimentare) o considerare la dose di esposizione interna, vale a dire la concentrazione della sostanza (e/o dei suoi metaboliti rilevanti) presente nei vari distretti corporei e principalmente nel sito bersaglio. Questo approccio viene seguito soprattutto quando sono disponibili dei buoni biomarker di esposizione, che permettono la conduzione di studi di biomonitoraggio. Nel caso di esposizione a pesticidi, la popolazione maggiormente esposta è costituita da operatori agricoli, astanti e popolazione in generale, ma ovviamente le modalità di esposizione sono diverse e vengono descritte da opportuni scenari di esposizione.
- Caratterizzazione del rischio: è la fase di integrazione di tutte le informazioni raccolte in quelle precedenti. Sulla base dei dati disponibili si fa una previsione sulla frequenza e la gravità degli effetti, evidenziati a livello sperimentale e/o epidemiologico, che possono verificarsi in una popolazione esposta ad un livello noto della sostanza in esame.

### *4.3 Ecotossicologia*

L'uso sempre maggiore di sostanze chimiche potenzialmente tossiche che possono venire riversate in corsi d'acqua direttamente o indirettamente, richiede un controllo sempre maggiore delle immissioni, della qualità dell'acqua e degli effetti che possono avere queste sostanze.

L'ecotossicologia [13] è la disciplina che studia gli effetti dannosi di sostanze chimiche sugli organismi che popolano gli ecosistemi. Un saggio ecotossicologico è una prova che utilizza un sistema biologico come bersaglio.

La tossicità di una sostanza è una caratteristica sia qualitativa, in quanto l'azione tossica dipende dall'interazione della struttura molecolare con le molecole biologiche, sia quantitativa, in quanto l'azione tossica si manifesta solo quando si superano determinati livelli di concentrazione nell'ambiente o in alcune parti dell'organismo.

I saggi ecotossicologici si basano sulla determinazione degli effetti tossici su organismi appartenenti a diversi livelli trofici e a diversi ecosistemi, selezionati sulla base di caratteristiche tali da renderli idonei all'utilizzo come bioindicatori di stress ambientale.

Nel test tossicologico l'organismo utilizzato viene posto a contatto, per un determinato periodo, con la sostanza in esame e viene valutato l'effetto di quest'ultima sulle funzioni vitali dell'organismo.

In base alla durata dei test si può determinare l'effetto acuto o cronico di una sostanza:

- l'effetto tossico acuto si evidenzia in un lasso di tempo breve e prevede la valutazione di criteri facilmente evidenziabili quali, ad esempio, l'immobilizzazione o la morte degli organismi impiegati nei saggi.
- l'effetto tossico cronico si sviluppa in un periodo di tempo più elevato, può coinvolgere più generazioni di individui esposti e produce risposte che non compromettono la sopravvivenza degli organismi.

Nei test eco tossicologici detti anche bio-assay si ricorre a strutture biologiche correlabili all'uomo per saggiare la capacità tossica dei composti chimici, l'azione sull'ambiente e sulla biocenosi e la possibilità di alterare gli ecosistemi in tempi medio-lunghi.

Per poter essere considerato un buon metodo, un test biochimico deve soddisfare diversi requisiti:

- sensibilità dell'organismo ad un vasto spettro di contaminanti;
- presenza di un'ampia letteratura sulla specie utilizzata, sulla sua tolleranza, sulla biologia,...
- omogeneità della popolazione test;
- breve ciclo di vita della specie;
- importanza ecologica per l'ambiente studiato;
- rapidità e semplicità di esecuzione;
- standardizzazione e riproducibilità;
- capacità di discriminare diversi livelli di tossicità;
- economicità.

Per valutare il grado di tossicità dei pesticidi in esame e dei loro prodotti di degradazione viene utilizzato il test di tossicità acuta che utilizza un batterio bioluminescente gram-

negativo di ambiente marino: il *Vibrio fischeri*. Il test acuto si basa sulla naturale diminuzione di bioluminescenza di batteri in presenza di inquinamento. I risultati si ottengono dopo 15 minuti di esposizione.

Il dato ottenuto dai test tossicologici viene reso in termini di I% (percentuale di inibizione), che esprime l'inibizione indotta nell'attività dell'individuo studiato (capacità di movimento, bioluminescenza emessa, crescita) dopo un determinato periodo di esposizione al campione da analizzare. Più alta sarà la percentuale di inibizione, più tossico risulterà un campione nei confronti di un determinato organismo (Tabella 5).

I%	Giudizio sul campione
da 0 a 20	Non tossico
da 20 a 50	Debolmente tossico
$\geq 50$	Tossico

Tabella 5 criteri per il giudizio di tossicità di un campione

Con questo criterio, per ogni campione che risulti tossico ( $I\% \geq 50$ ) si può ricavare l'EC50 (Effective Concentration 50), ossia la concentrazione di campione che induce un effetto inibente pari al 50%, diluendo il campione con acqua. Ad esempio un valore di  $EC50 = 80\%$  indica che per ottenere un effetto inibente del 50% è necessario diluire il campione nella proporzione 80/20 con acqua, mentre per un valore di  $EC50 = 20\%$  la diluizione necessaria è 20% di campione e 80% di acqua. Nel secondo caso quindi la specie è molto più tossica che nel primo caso, in quanto per avere lo stesso effetto è necessaria una diluizione 4 volte maggiore.

Nel caso specifico del test eco tossicologico con il batterio *Vibrio fischeri* lo scopo è l'individuazione, in campioni d'acqua, della presenza di agenti tossici in grado di produrre un effetto nocivo in un breve periodo di tempo (15 min). Per l'analisi si utilizzano batteri bioluminescenti gram negativi marini, appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*.

La prova si basa sulla riduzione dell'emissione luminosa da parte di batteri bioluminescenti sottoposti a contatto con una sostanza che risulta tossica a un controllo. La produzione di luce è dovuta ad una reazione enzimatica in cui l'enzima luciferasi ossida un'aldeide alifatica ad acido carbossilico con emissione luminosa. Il risultato è riportato come EC50, che consiste nella concentrazione efficace della sostanza tossica in grado di causare un decremento del 50% della luminosità batterica rispetto al controllo dopo un tempo fissato di esposizione. Questo test dà garanzie di ripetibilità e accuratezza rispetto a quelli che

utilizzano altri organismi; lo svantaggio consiste nel fatto che esso può presentare falsi positivi, essendo il batterio particolarmente sensibile ad alcune sostanze, quali il rame.

I batteri hanno dimensioni inferiori ad 1  $\mu\text{m}$  di diametro che porta ad un elevato rapporto superficie/volume, che, insieme alla loro semplice morfologia, fa sì che vi sia un grande numero di siti target in corrispondenza della membrana citoplasmatica, dove è collocata la maggior parte delle funzioni metaboliche.

# Parte Sperimentale

---

## ***CAPITOLO 5***

## *5 Messa a punto e validazione di un metodo cromatografico per la separazione di otto pesticidi[69]*

L'uso eccessivo di pesticidi ed erbicidi sta guadagnando sempre più attenzione come una fonte significativa di inquinamento; anche se i pesticidi più pericolosi, tossici e talvolta cancerogeni della prima metà del secolo sono stati sostituiti in agricoltura, i loro effetti non sono ancora stati completamente rimossi.

Le coltivazioni della barbabietola da zucchero e del grano sono spesso presenti su campi adiacenti o alternati sullo stesso campo, e si caratterizzano per l'ampio uso di erbicidi di pre e post-emergenza; le diverse formulazioni commerciali di questi pesticidi sono costituiti da uno o più principi attivi utilizzati in miscela, caratterizzati da differenti proprietà chimico-fisiche. Di conseguenza sono richiesti metodi multi-residuo che consentano la determinazione simultanea dei diversi principi attivi presenti in commercio.

Sette dei più diffusi pesticidi utilizzati nelle colture di barbabietola da zucchero e grano, appartenenti a diverse classi chimiche, sono stati qui studiati: metamitron, sulcotrione, lenacil, desmedifam, fenmedifam, etofumesate e terbutilazina. Inoltre anche l'atrazina è stata inclusa negli analiti target, anche se vietata in Italia dal 1992 e vietata nei Paesi dell'Unione Europea dal 2007. Infatti, dalla campagna di monitoraggio effettuato dal laboratorio italiano governativo dedicato al monitoraggio ambientale (Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale - ARPA), l'atrazina sembra essere ancora presente in concentrazioni rilevanti e stabili in campioni di acqua e terreno.

In letteratura non è disponibile un metodo per la determinazione simultanea degli otto analiti sopra elencati. In particolare, solo per il metamitron e la terbutilazina viene sfruttata la cromatografia liquida ad iniezione diretta accoppiata con la spettrometria di massa electrospray tandem (ESI-MS / MS) [14] invece l'atrazina, il desmedifam, l'etofumesate e il fenmedifam sfruttano la gas cromatografia accoppiata con la spettrometria di massa tandem a triplo quadrupolo (GC- qQQ-MS / MS) [15] oppure la cromatografia liquida ad alte prestazioni a fase normale o inversa con rilevatore diode array (NP / NR-HPLC-DAD) [16,17] dove vengono determinati simultaneamente.

Individualmente, il sulcotrione è stato determinato mediante LC-MS / MS [18,19], mentre il lenacil è stato determinato mediante HPLC con rilevatore amperometrico [20], RP-HPLC-UV [21] e cromatografia capillare elettrocinetica micellare (MEKC) [22]. I metodi più frequentemente utilizzati per la determinazione dell'atrazina e della terbutilazina sfruttano l'HPLC [23-28] e il GC [15,29-30].



Pertanto, nel presente lavoro è stato sviluppato un metodo HPLC rapido in grado di rilevare e determinare simultaneamente gli otto pesticidi sopra menzionati in diverse matrici ambientali.

Infatti l'HPLC è uno strumento ampiamente utilizzato, ben accettato e versatile per analisi in campo ambientale e risulta pertanto idoneo per lo sviluppo di un nuovo, a basso costo e veloce metodo per la determinazione dei pesticidi sopra menzionati. La performance del metodo è stata verificata mediante l'intero processo di validazione primaria [39] dal momento che solo un metodo convalidato assicura che i dati siano statisticamente significativi [40-41].

## 5.1 Analiti

Di seguito vengono riportate le proprietà chimico-fisiche e le caratteristiche più importanti degli erbicidi presi in esame:

### 5.1.1 Atrazina

Peso molecolare: 215,7 u.m.a.

Forma: polvere incolore

Punto di fusione: 175,8 °C

Punto di ebollizione: 205°C

Solubilità in acqua: 33 mg/L a pH=7 e 22°C

pKa: 1,7

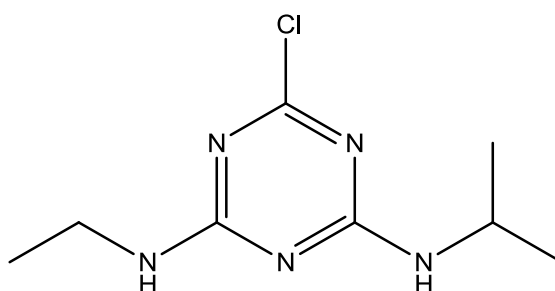


Figura 10

L'atrazina, la cui struttura viene riportata in Figura 10, (insieme alla terbutilazina), è un principio attivo, introdotto nel 1958, ad azione erbicida appartenente alla classe delle clorotriazine, nel più esteso gruppo delle triazine.

Come tutte le clorotriazine, è un erbicida ad assorbimento radicale e in misura minore fogliare, usato in pre-emergenza e in post-emergenza, e si adatta al diserbo principalmente di mais, sorgo e canna da zucchero.

In genere l'atrazina viene impiegato nei campi coltivati in quantità di pochi kilogrammi per ettaro, per provocare la morte delle piante erbacee che infestano il terreno. In concentrazioni superiori è stata utilizzata per eliminare completamente ogni forma di vita vegetale, ad esempio per creare aree di parcheggio.

Dal punto di vista biochimico, la funzione di questa sostanza si svolge bloccando il processo di fotosintesi della pianta.

Poiché la solubilità in acqua non è elevatissima, non si spiega il problema ambientale post dall'uso dell'atrazina: l'elevata persistenza ambientale con conseguente rinvenimento nelle acque superficiali e di falda. Se consideriamo però le dosi d'impiego piuttosto elevate (1,5-2 Kg/ha per applicazione), si capisce come anche una solubilità apparentemente esigua diventi considerevole.

Il legame abbastanza saldo con i colloidi del terreno, specialmente quelli organici, è uno dei motivi di persistenza nell'ambiente e quindi di rilascio continuato, prolungato nel tempo, di principio attivo dal terreno verso le acque.

Ad accrescere la durezza nell'ambiente dell'atrazina come di altre clorotriazine contribuisce la scarsità di biodecompositori in grado di metabolizzare completamente queste sostanze per la difficoltà che questi incontrano nell'utilizzarle.

Ne è proibita l'utilizzazione in alcuni paesi europei tra cui l'Italia (definitivamente dal 1992), ma nel mondo continua ad essere uno dei principi attivi ad azione erbicida più usati, con 38 milioni di kg venduti ogni anno.

Gli studi sull'atrazina hanno alternativamente confermato e smentito la cancerogenicità del composto e ad oggi non è classificato come cancerogeno certo, è tuttavia temuto per i suoi effetti di "hormonal disruptor". Studi sugli anfibi sembrerebbero confermare l'interferenza dell'atrazina sull'equilibrio degli ormoni sessuali di questi animali anche a bassissime concentrazioni, causando una femminizzazione dei soggetti maschi.

### 5.1.2 Etofumesate

Peso molecolare: 286.3 uma

Forma: polvere bianca cristallina.

Punto di fusione: 70-72°C

Solubilità: varia da 50 mg L<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O agli oltre 600 g L<sup>-1</sup> in acetone.

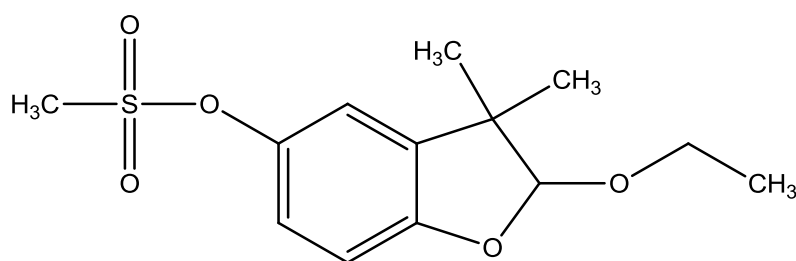


Figura 11

L'etofumesate, Figura 11, viene utilizzato in pre- o post-emergenza nel diserbo della barbabietola da zucchero e del tabacco. Il suo ampio spettro d'azione comprende numerose graminacee annuali e alcune dicotiledoni.

Verso *Galinsoga parviflora*, *Lamium* spp., *Matricaria* spp., *Senecio vulgaris* non riesce ad esplicare un'azione molto efficace, vista la grande resistenza; in presenza di queste infestanti si consigliano miscelazioni con altri prodotti al fine di aumentarne gli effetti.

I principali prodotti commerciali sono “Nortron” (Bayer CropScience), “Keeper” (Barclay), “Betamix Progress” (miscela con desmedifam e fenmedifam, Bayer CropScience) e “Goldpost” (miscela con fenmedifam, Barclay).

La tossicità acuta verso i mammiferi (topi) è superiore a 5000 mg Kg-1 per somministrazione orale, superiore a 2000 mg Kg-1 per somministrazione cutanea è superiore a 3.97 mg L-1 per inalazione.

Il valore di LD50 per gli uccelli è superiore a 3552 mg Kg-1, per i pesci LC50 dopo 96h è di 11.9-20.2 mg L-1; il valore di LC50 dopo 48h è di 13.5-22.0 mg L-1 per la *Daphnia*, le alghe presentano un EC50 di 3.9 mg L-1 e le api un LD50 > 50 µg/ape.

### 5.1.3 *Sulcotrione*

Peso molecolare: 328.8 uma

Forma: solido bianco.

Punto di fusione: 139°C.

Solubilità: in acqua è di 165 mg L-1 a 25 °C ed è solubile in acetone o clorobenzene.

pKa: 3.13 a 23 °C.

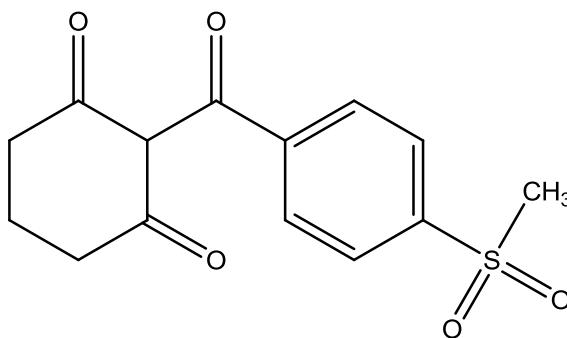


Figura 12

Il sulcotrione, la cui struttura viene riportata in Figura 12, è un erbicida selettivo di post-emergenza appartenente alla famiglia dei trichetoni, che agisce contro numerose dicotiledoni ed alcune importanti graminacee. Agisce prevalentemente per via fogliare con un complementare assorbimento radicale. I sintomi sulle malerbe appaiono dopo 3-4 giorni e si manifestano con imbianchimenti, seguiti dal completo disseccamento delle infestanti. I prodotti commerciali contenenti sulcotrione sono “Galleon” e “Mikado” della Bayer CropScience.

Per somministrazione orale il valore di LD50 per i ratti è superiore a 5000 mg Kg<sup>-1</sup>; sui conigli risulta essere superiore a 4000 mgKg<sup>-1</sup>e per inalazione il valore di LC50 è superiore a 1.6 mgL<sup>-1</sup>. Per gli uccelli il valore di LC50 da assunzione nella dieta è superiore a 5620 mg Kg<sup>-1</sup>. Per i pesci il valore risulta essere LC50 superiore a 200 mg L<sup>-1</sup>. Per la Daphnia si osserva un LC50 superiore a 200 mg L<sup>-1</sup> dopo 48 h e per le alghe verdi un valore di EC50 dopo 96 h pari a 1.2 mg L<sup>-1</sup>. Infine vengono riportati i dati per le api e si osservano valori di LD50 superiore a 200 µg/ape.

#### 5.1.4 Fenmedifam

Peso molecolare: 300,3 u.m.a.

Forma: cristalli incolori.

Punto di fusione: 143-144°C.

Solubilità: in acqua a temperatura ambiente 4,7 mg/L. Solubile in solventi polari organici (in acetone circa 200 mg/L, in metanolo circa 50 mg/L a 20°C).

pKa: minore di 0,1.

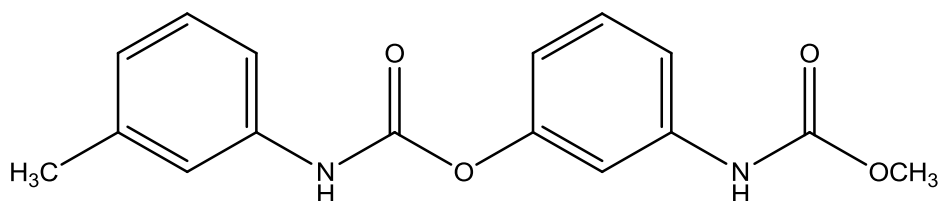


Figura 13

Il fenmedifam (Figura 13) è un erbicida di pre e post-emergenza che, insieme al desmedifam, appartiene alla famiglia dei carbammati (ac.carbammico NH<sub>2</sub>-COOH).

Utilizzato per l'eliminazione di malerba in coltivazioni di barbabietola da zucchero e foraggio, spinaci, fragole.

Questo prodotto causa gravi danni all'ecosistema poiché presenta un'alta tossicità nonostante presenti una bassa permanenza nell'ambiente. Si osservano per somministrazione orale il valore di LD50 per i ratti è superiore a 8000 mg Kg-1, per somministrazione cutanea sui maiali si osserva un LD50 superiore a 4000 mg Kg-1 . Il dato riportato per gli uccelli risulta essere un LC50 da assunzione nella dieta maggiore di 2500 mg Kg-1. Per i pesci si ha LC50 superiore a 1,4 mg L-1 dopo 96 h; per la Daphnia un LC50 superiore a 3,8 mg L-1 dopo 72 h, per le alghe verdi il valore di EC50 dopo 96 h è superiore a 1.4 mg L-1 e per le api, per contatto, si osserva un LC50 superiore a 16 µg/ape.

### 5.1.5 Desmedifam

Peso molecolare: 300,3 u.m.a.

Forma: cristalli incolori.

Punto di fusione: 120°C.

Solubilità: 7 mg/L (a pH 7 e 20°C). Facilmente solubile in solventi organici polari (in acetone 400 mg/L, in metanolo 180 mg/L a 20°C).

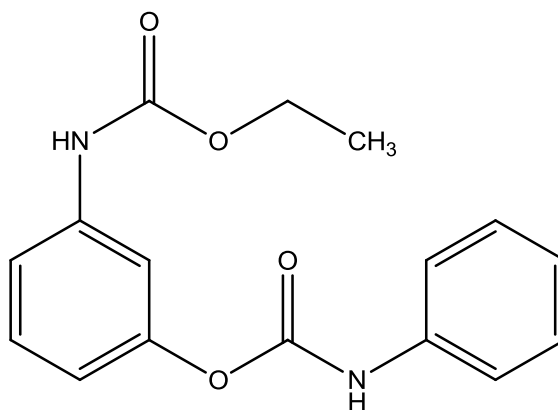


Figura 14

Il Desmedifam (Figura 14), come il fenmedifam è un erbicida di contatto appartenete alla famiglia dei carbammati, utilizzato in situazioni di pre-emergenza agendo in seguito all'assorbimento delle piante per via fogliare causandone la morte nell'arco di pochi giorni o e pre-trapianto.

Anche questo prodotto causa gravi danni all'ecosistema poiché presenta un'alta tossicità nonostante presenti una bassa permanenza nell'ambiente: si osservano valori per la somministrazione in uccelli quali anatra un DL50 superiore a 2000 mg/kg e per la quaglia

un DL50 superiore a 5000 mg/kg . Per vermi e lombrichi il valore risulta essere DL50 superiore a 466 mg/kg.

### 5.1.6 *Lenacil*

Peso molecolare: 234,3 u.m.a.

Forma: solido bianco cristallino.

Punto di fusione: 315,6-316,8°C.

Solubilità: in acqua distillata 3 ppm (a 25°C). Solubile nella maggior parte dei solventi organici (in acetone 690 ppm, in metanolo 1500 ppm a 20°C).

pKa: 10,3.

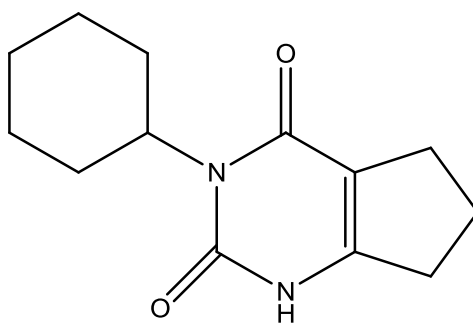


Figura 15

Il lenacil, la cui struttura viene riportata in Figura 15, è un erbicida selettivo appartenente al gruppo chimico delle diazine, utilizzato in situazioni di pre-emergenza ed esplica la sua azione per assorbimento radicale sui germinelli. Essendo poco solubile, entro 15-20 giorni dalla sua somministrazione necessita di una pioggia o di una irrigazione di almeno 15 mm. È sconsigliato l'impiego in terreni particolarmente sciolti (suoli sabbiosi e poveri di humus) ed in genere persiste nel terreno per 4-6 mesi.

Alle normali dosi d'impiego ed in condizioni di umidità favorevoli, controlla la maggior parte delle malerbe annuali, quando sono germinate al momento del trattamento ed infatti è utilizzato in una vasta gamma di colture tra cui: fragole, barbabietola da zucchero, porro e spinaci spesso in combinazione con altri pesticidi come ethosomesate, metamitron e phenmediphan.

Dalle ricerche effettuate si è risaliti a determinati parametri di tossicità: per somministrazione orale il valore di LD50 per i ratti è superiore a 1100 mg Kg-1, per

somministrazione cutanea sui conigli si ha un LD50 superiore a 5000 mg Kg-1 e per inalazione viene riscontrato un valore di LC50 superiore a 5.2 mgL-1. Per gli uccelli il valore risulta essere di LC50 da assunzione nella dieta superiore a 5620 mg Kg-1; per i pesci si ha un LC50 superiore a 134 mg L-1. Per la Daphnia si osserva un LC50 superiore a 33 mg L-1 dopo 48 h, per le alghe verdi un EC50 dopo 96 h pari a 1.4E-2 mg L-1 e per le api un LD50 superiore a 160 µg/ape.

### 5.1.7 Metamitron

Peso molecolare: 202,2 u.m.a.

Forma: cristalli incolori, inodori.

Punto di fusione: 166,6°C.

Solubilità: in acqua 1,7 gr/L a 20°C.

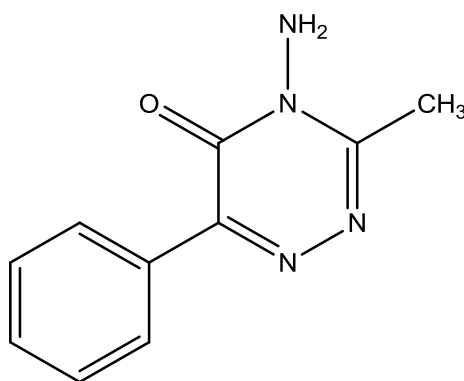


Figura 16

Il metamitron, la cui struttura viene riportata in Figura 16, come l'atrazina e la terbutylazina è un erbicida sintetico appartenente al gruppo chimico delle triazine, assorbito per via radicale e per via fogliare, utilizzato per debellare malerbe in situazioni di pre-emergenza e post-emergenza in colture di fragole e barbabietole da foraggio e da zucchero in terreni sabbiosi e poveri di humus.

Agisce per assorbimento fogliare e radicale; una volta entrato in circolo viene traslocato a livello dei cloroplasti dove riesce a interferire sulla fotosintesi.

Può essere impiegato dall'autunno fino alla post-emergenza precoce; anch'esso può essere utilizzato in unione a fenmedifan, lenacil ed etofumesate. Persiste nel terreno per 3-6 mesi. Le ricerche sui parametri di tossicità mostrano per somministrazione orale il valore di



LD50 per i ratti è superiore a 4000 mg Kg-1, per gli uccelli il valore di LD50 da assunzione nella dieta risulta essere superiore a 1875 mg Kg-1; per i pesci dopo 96h si registra un valore di LC50 superiore a 326 mg L-1; per la Daphnia il valore di LC50 risulta essere superiore a 101 mg L-1 dopo 48 h, per le alghe verdi il valore di EC50 dopo 72 h risulta essere pari a 1.5 mg L-1 e per lombrichi e vermi si osserva un LD50 superiore a 1050 mg Kg-1.

### 5.1.8 Terbutilazina

Figura 5.16

Peso molecolare: 229,7 u.m.a.

Forma: polvere incolore.

Punto di fusione: 177-179°C.

Solubilità: in acqua 8,5 mg/L a pH 7 e 20°C.

pKa: 2

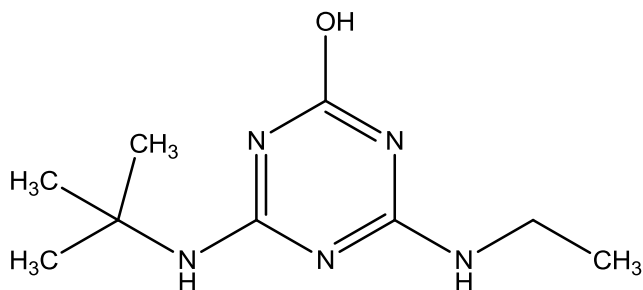


Figura 17

La terbutilazina (Figura 17), come l'atrazina, è un erbicida appartenente al gruppo chimico delle triazine, che viene assorbito per via radicale, è utilizzato per il diserbo del mais da malerbe; la sua azione è favorita da piogge che precedono o seguono il trattamento o da irrigazioni in caso di prolungata siccità. Essendo poco solubile, resta localizzato negli strati superficiali del terreno per un periodo compreso tra 4-12 mesi.

A partire dal 1 gennaio 2008 non è più consentito utilizzare erbicidi contenenti la sola terbutilazina.

I vecchi formulati a base di tale sostanza, infatti, potevano essere venduti e impiegati al massimo entro il 31 dicembre 2007. Con la nuova campagna agraria sono in commercio e

vanno impiegati esclusivamente formulati che contengono la terbutilazina in miscela con altre sostanze attive diserbanti.

Le ricerche sui parametri di tossicità evidenziano per somministrazione orale il valore di LD50 per i ratti è superiore a 4000 mg Kg<sup>-1</sup>, per i pesci dopo 96h il valore di LC50 è superiore a 8.32 mg L<sup>-1</sup>, per la Daphnia si osserva un LC50 superiore a 101 mg L<sup>-1</sup> dopo 48 h, per le alghe verdi si ha un EC50 dopo 72 h pari a 0.131 mg L<sup>-1</sup>, per lombrichi e vermi un valore di LD50 superiore a 1150 mg Kg<sup>-1</sup>.

## 5.2 *Materiali e metodi*

### 5.2.1 *Solventi e reagenti*

- Metanolo VWR per HPLC di grado analitico;
- Acido trifluoro acetico  $\geq 65\%$  Carlo Erba;
- Acqua ultrapura MilliQ;
- Soluzioni tampone;
- Ammoniaca  $\geq 30\%$  Carlo Erba.
- Filtri in polipropilene 0,45 e 0,20 $\mu\text{m}$  (Merck, Darmstadt, Germany).
- Pesticidi
  - ✓ Atrazina Pestanal, Analytical Standard $>95\%$
  - ✓ Desmedifam Pestanal, Analytical Standard $>95\%$
  - ✓ Etofumesate Pestanal, Analytical Standard $>95\%$
  - ✓ Lenacil Pestanal, Analytical Standard $>95\%$
  - ✓ Metamitron Pestanal, Analytical Standard $>95\%$
  - ✓ Terbutilazina Pestanal, Analytical Standard $>95\%$
  - ✓ Fenmedifam Pestanal, Analytical Standard $>95\%$
  - ✓ Sulcotrione Pestanal, Analytical Standard $>95\%$

### 5.2.2 *Strumenti*

- HPLC-UV-DAD. Reverse-phase Gemini C18 column (Phenomenex, BO, Italy) 100.0 x 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$  particle size. The injection volume is 100  $\mu\text{L}$ .
- pHmetro EUTECH Instruments pH 700

- bilancia analitica

### 5.2.3 Preparazione soluzioni

E' stata preparata una soluzione madre di concentrazione pari a 50,0mg/L di 100ml di volume, per ogni pesticida. Sono stati pesati e trasferiti in un matraccio da 100ml 5mg di pesticida, e si è poi portato a volume con metanolo. Nella seguente tabella si riportano i mg pesati e la concentrazione della soluzione madre di ogni pesticida:

<b>Pesticida</b>	<b>mg</b>	<b>mg/L</b>
Atrazina	0,00526	52,6
Desmedifam	0,00524	52,4
Etofumesate	0,00503	50,3
Lenacil	0,00519	51,9
Metamitron	0,00600	60,0
Femnedifam	0,00497	49,7
Sulcotrione	0,00499	49,9
Terbutilazina	0,00583	58,3

Tabella 6

Le soluzioni da analizzare sono state preparate mediante diluizione dalla soluzione madre e ripreparate ogni giorno non utilizzandole mai due volte. Le soluzioni madre così preparate sono state conservate in frigo in bottiglie di vetro scure per evitarne la degradazione.

### 5.2.4 Preparazione fase mobile

Tutti i solventi utilizzati, per la preparazione delle fasi mobili, sono stati precedentemente filtrati:

- Metanolo: filtro in polipropilene

- Acqua: filtro in cellulosa rigenerata

Per le variazioni di pH sono stati usati l'acido trifluoroacetico e l'ammoniaca.

### 5.2.5 *Pretrattamento campioni*

Sono state testate differenti cartucce per l'estrazione in fase solida (SPE): SPE strata Polymeric (100 mg, 1 mL, Phenomenex, BO, Italy), EN LiChrolut, (200 mg, 3 mL, Merck, Tokyo, Japan), SPE strata C18-e, (100 mg, 1 mL, Phenomenex, BO, Italy).

Di seguito si riportano le condizioni ottimizzate: uno step di condizionamento effettuato sequenzialmente con 2.0 mL di metanolo e 2.0mL di acqua ultra pura, carico di 2.000L dei campioni, lavaggio con 2.0mL di acqua ultra pura e l'eluizione finale con 1.0mL di metanolo con le SPE strata C18-e cartridge.

L'estrazione accelerata con solvente (ASE) è stata applicata ai campioni di terreno nelle seguenti condizioni: 5,00 g del campione sono stati posizionati nella cella di estrazione, che è stata poi riempita con la terra di diatomee. Sono stati effettuati tre cicli di estrazione di 15min a 150°C con 5.00 mL di diclorometano come solvente; l'estratto è stato fatto evaporare e poi ripreso con 1.00mL di metanolo.

### 5.2.6 *Campioni reali*

I campioni reali provengono da un campo del paese Lu Monferrato, dove vengono coltivati a rotazione di 5 anni la barbabietola da zucchero, il granoturco e il grano. Quando sono stati prelevati i campioni il grano era la coltivazione attiva. Sono stati analizzati tre tipi di campioni: un campione di terreno (S) proveniente dal campo trattato, mediante la formulazione BETANAL EXPERT (Bayer CropScience, formulazione: etofumesate (151 g L<sup>-1</sup>), desmedifam (25 g L<sup>-1</sup>) and fenmedifam (75 g L<sup>-1</sup>)), due settimane prima del prelievo, un campione proveniente dalla frazione acquosa del terreno (WS) e un campione acquoso prelevato nei pressi del campo, che raccoglie l'eventuale inquinamento derivante dal processo di lisciviazione (W). I campioni raccolti sono stati conservati, alla temperatura di 10°C, in contenitori ermeticamente chiusi.

Il campione WS è stato ottenuto, mediante centrifugazione a 8000 r.p.m. per 20 min, dal campione S, dopo di che la fase liquida è stata filtrata prima con filtri in polipropilene a

0,45  $\mu\text{m}$  e infine con filtri a 0,2  $\mu\text{m}$ . L'estrazione del campione S è stata effettuata mediante l'ASE come descritto nel paragrafo precedente.

### 5.3 Prove Preliminari

#### 5.3.1 Analisi UV-Vis

Il primo passo è stato quello di registrare uno spettro UV-Vis degli otto pesticidi in metanolo nel range 200-400nm. Come si può osservare dallo spettro riportato in Figura 18 i massimi di adsorbimento sono disposti a differenti valori di  $\lambda$ . I valori delle  $\lambda$  selezionate per ogni analita, che verranno quindi utilizzati per ricavare successivamente le aree degli analiti, sono i seguenti: metamitron (309 nm), sulcotrione (232 nm), atrazina (223 nm), lenacil (272 nm), desmedifam and fenmedifam (237 nm), etofumesate (227 nm) e terbutilazina (225 nm).

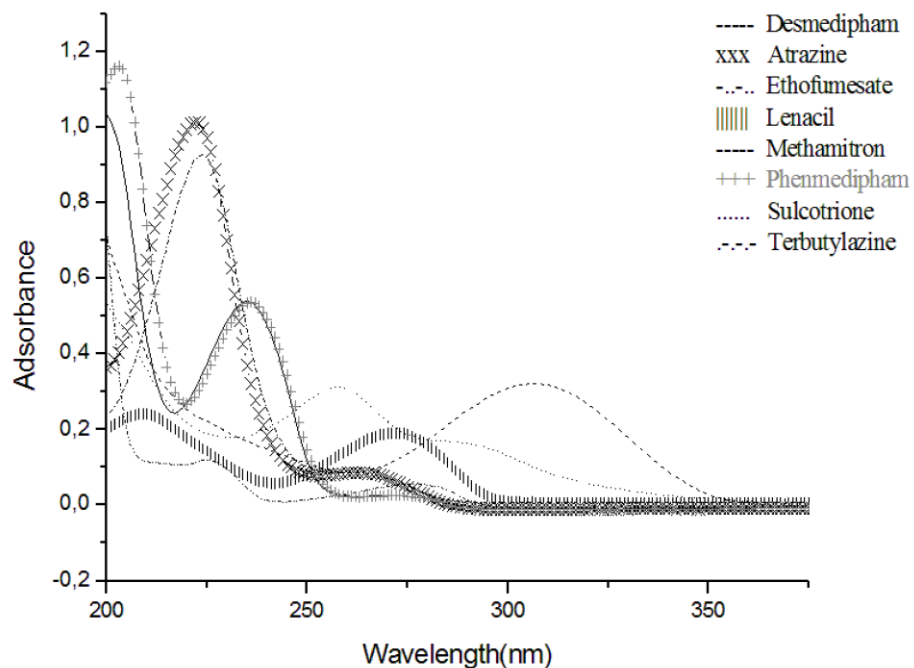


Figura 18 Spettro UV-Vis degli otto pesticidi, in metanolo, alla concentrazione di  $5\text{mg L}^{-1}$  riportati nel range 200-400nm.

## 5.4 Ottimizzazione del metodo cromatografico

Dopo un'attenta ricerca in letteratura si è deciso di utilizzare come fase mobile una miscela di acqua metanolo variandone le proporzioni e il pH. Il pH acido della fase mobile è stato scelto considerando i valori di pKa degli analiti, che vanno da 1,0 a 10,3, per favorire la predominanza delle specie neutre ed acide ed aumentare così i tempi di ritenzione. Si è deciso quindi di partire da una fase mobile 45:55 v/v metanolo/ acqua a pH 3,10, con flusso 0.7 mL min<sup>-1</sup> e temperatura colonna 25°C, il cui cromatogramma è riportato in Figura 19.

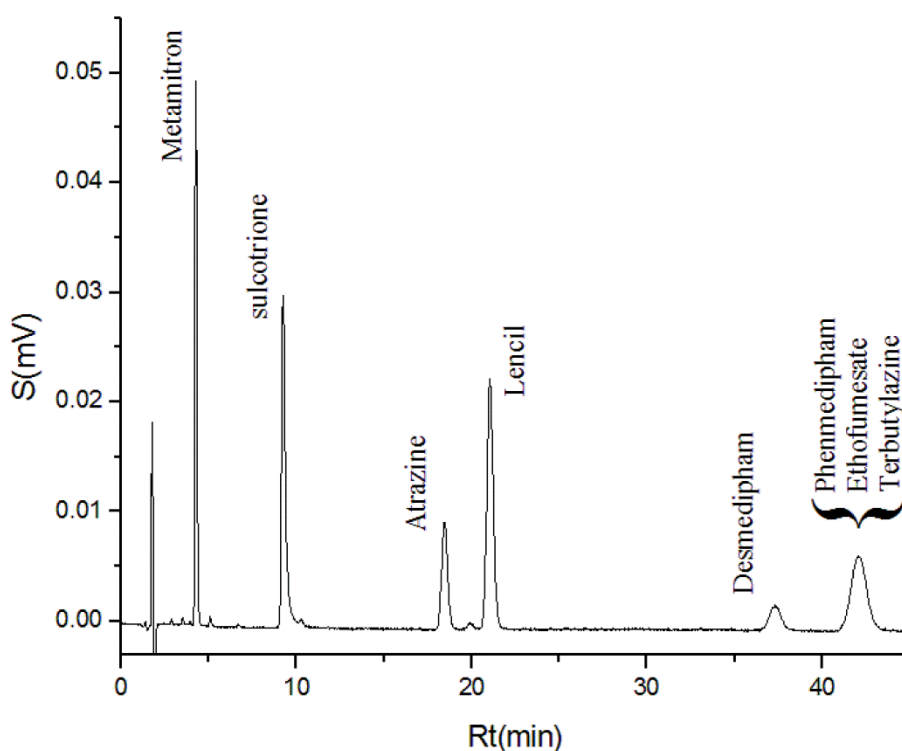


Figura 19) Cromatogramma HPLC-DAD della separazione di una miscela degli 8 pesticidi in studio (2,00 mg L<sup>-1</sup> ognuno). Fase stazionaria: colonna a fase inversa Gemini C18 (Phenomenex, BO, Italy) 100.0 x 4.6 mm, dimensioni particelle 3 µm. Fase mobile: metanolo/acqua 45:55 v/v, a pH 3.00, flusso 0.7 mL min<sup>-1</sup>, temperatura colonna 25.0 °C. Cromatogramma estratto a 274 nm mediante rivelatore DAD.

In queste condizioni si è ottenuta un'incompleta separazione in 42.1 minuti.

Osservando il cromatogramma risulta evidente che per ottenere una migliore risoluzione di tutti gli analiti e in particolare migliorare la risoluzione tra l'etofumesate, il fenmedifam e

la terbutilazina, le variabili da modificare risultano essere la concentrazione di metanolo, il pH della fase mobile e il flusso.

Come prima modifica si è deciso di aumentare il flusso della fase mobile da 0,7 a 1,0 mL min<sup>-1</sup> in modo da diminuire il tempo totale dell'analisi. La separazione ottenuta, risulta ancora incompleta ma il tempo di analisi è stato notevolmente ridotto a 27,0 min (Figura 20).

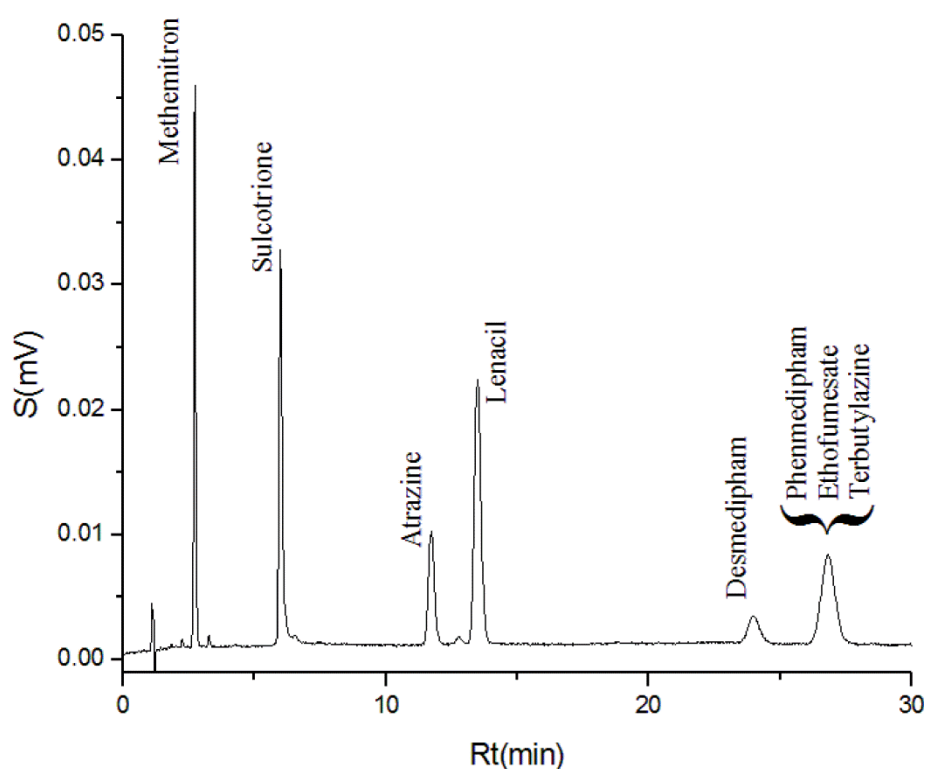


Figura 20 Cromatogramma HPLC-DAD della separazione di una miscela degli 8 pesticidi in studio (2,00 mg L<sup>-1</sup> ognuno). Fase stazionaria: colonna a fase inversa Gemini C18 (Phenomenex, BO, Italy) 100.0 x 4.6 mm, dimensioni particelle 3 µm. Fase mobile: metanolo/acqua 45:55 v/v, a pH 3.00, flusso 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura colonna 25.0 °C. Cromatogramma estratto a 274 nm mediante rivelatore DAD.

A questo punto si è deciso di aumentare la percentuale di metanolo al 48% in modo da riuscire a separare i picchi dei pesticidi che coeluiscono a tempi di ritenzione alti. In queste condizioni si è ottenuta la completa separazione degli otto pesticidi, e aumentando la temperatura della colonna è stato possibile anche diminuire il tempo di analisi fino a 18,6 min (Figura 21).

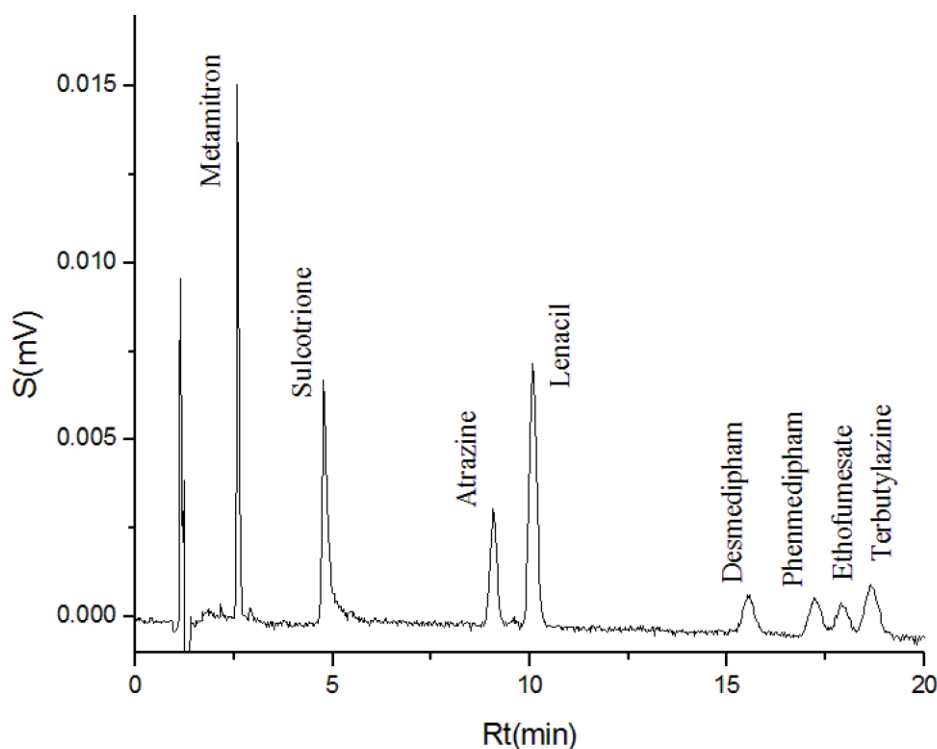


Figura 21 Cromatogramma HPLC-DAD della separazione di una miscela degli 8 pesticidi in studio ( $0,7 \text{ mg L}^{-1}$  ognuno). Fase stazionaria: colonna a fase inversa Gemini C18 (Phenomenex, BO, Italy)  $100.0 \times 4.6 \text{ mm}$ , dimensioni particelle  $3 \mu\text{m}$ . Fase mobile: metanolo/acqua 48:52 v/v, a pH 3.00, flusso  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura colonna  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cromatogramma estratto a  $274 \text{ nm}$  mediante rivelatore DAD.

### 5.5 Ottimizzazione delle condizioni di estrazione SPE

Sono state comparate le performance di tre differenti cartucce SPE. Le cartucce utilizzate in questo lavoro, Strata RP-18, Strata-X e Lichrolut EN, sono comunemente usate nell'estrazione a fase solida di inquinanti organici delle acque superficiali. La comparazione è stata quindi effettuata con dei campioni di acqua ultra pura spiccati con una miscela degli otto pesticidi alla concentrazione di  $1.00 \text{ mg/L}$  ognuno. I campioni estratti con questo metodo sono stati analizzati con il metodo RP-HPLC-DAD ottimizzato. Il confronto è stato effettuato cambiando solo lo step di eluizione lasciando invariati gli altri step.

In particolare, il volume del campione nello step di carico è stato fissato a  $2.000 \text{ L}$ , poiché questo valore rappresenta un compromesso tra la necessità di raggiungere il più alto tasso di pre-concentrazione possibile e la necessità di preservare le cartucce dalla saturazione.



La fase di condizionamento è stata effettuata con 2.0mL di metanolo e 2.0mL di acqua ultra pura, mentre il lavaggio è stato effettuato con 2.0mL di acqua ultra pura.

Per quanto riguarda lo step di eluizione, sono state testate differenti soluzioni di eluizione:

- Metanolo puro;
- Metanolo/acqua 50/50 e 80/20 v/v, sia a pH 3.7 che a pH 10.0;
- Acqua ultra pura a pH 3.7 e 10.0

Da questi esperimenti l'utilizzo della cartuccia Strata RP-18 e l'utilizzo di metanolo puro nello step di eluizione è risultata essere la combinazione migliore, da cui si è ottenuto un valore di recupero sempre maggiore del 50%. Sono state effettuate tre repliche dell'intera procedura SPE su soluzioni a tre livelli di concentrazione per ogni analita (0.1, 0.5, 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), i recuperi medi ottenuti sono riportati in Tabella 7.

Pesticide	Mean Recovery % (%RSD)		
	0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
metamitron	90 $\pm$ 4	88 $\pm$ 4	91 $\pm$ 4
sulcotrione	93 $\pm$ 6	90 $\pm$ 5	92 $\pm$ 3
atrazina	102 $\pm$ 8	99 $\pm$ 4	103 $\pm$ 4
lenacil	88 $\pm$ 4	88 $\pm$ 6	87 $\pm$ 5
desmedifam	70 $\pm$ 5	72 $\pm$ 4	72 $\pm$ 6
fenmedifam	66 $\pm$ 4	69 $\pm$ 7	71 $\pm$ 5
terbutilazina	50 $\pm$ 5	52 $\pm$ 4	52 $\pm$ 4
etofumesate	85 $\pm$ 7	84 $\pm$ 4	85 $\pm$ 5

Tabella 7: Valori di recupero per gli 8 pesticidi estratti mediante SPE usando le concentrazioni ottimizzate sulle cartucce Strata RP-18 a tre differenti livelli di concentrazione.

## 5.6 Validazione del metodo

L'idoneità del metodo verrà verificata tramite una validazione primaria, processo sperimentale il cui scopo è stabilire i limiti operativi e le performance del nuovo metodo analitico attraverso il calcolo dei parametri che determinano le prestazioni globali del metodo.

### 5.6.1 Validazione primaria del metodo

Il metodo è stato validato in termini di precisione inter e intra-day, linearità e sensibilità. Mediante la costruzione e l'analisi delle curve di calibrazione è possibile determinare l'attendibilità del metodo. Per ogni pesticida è stata costruita una retta di calibrazione a sette livelli di concentrazione, da 0.10  $\text{mg L}^{-1}$  a 1.30  $\text{mg L}^{-1}$ , replicando ogni punto 3 volte. E' stato effettuato un t-test per verificare la significatività dell'intercetta. In Tabella 8 si

riportano le rette di calibrazione, i coefficienti di correlazione e i risultati del test di significatività dell'intercetta.

Pesticidi	R <sup>2</sup>	Equazione di calibrazione	Significatività dell'intercetta	
			t <sub>calc</sub>	t <sub>tab</sub> (α=0.05,ν=6)
Atrazina	0.9971	$y = (6.0 \pm 0.1) \cdot 10^5 x$	1.321	1.943
Desmedifam	0.9974	$y = (3.5 \pm 0.1) \cdot 10^5 x$	0.631	1.943
Etofumesate	0.9949	$y = (7.4 \pm 0.3) \cdot 10^4 x$	0.120	1.943
Lenacil	0.9980	$y = (10.7 \pm 0.2) \cdot 10^4 x$	1.734	1.943
Metamitron	0.9969	$y = (20.8 \pm 0.5) \cdot 10^4 x - (4.4 \pm 0.4) \cdot 10^4$	<u>2.783</u>	1.943
Fenmedifam	0.9920	$y = (3.4 \pm 0.2) \cdot 10^5 x - (1.9 \pm 0.2) \cdot 10^4$	<u>2.742</u>	1.943
Sulcotrione	0.9979	$y = (12.4 \pm 0.2) \cdot 10^4 x - (5.0 \pm 0.2) \cdot 10^4$	<u>6.476</u>	1.943
Terbutilazine	0.9987	$y = (53.4 \pm 0.7) \cdot 10^4 x$	0.341	1.943

Tabella 8

Sono stati poi calcolati i limiti di rilevabilità LOD e di quantificazione LOQ mediante le formule riportate in *Materiali e metodi*. Come si può osservare dalla Tabella 9 i valori di LOD e LOQ sono sempre inferiori rispettivamente a 0.13 mg L<sup>-1</sup> e 0.45 mg L<sup>-1</sup>. In queste condizioni cromatografiche la Terbutilazina presenta la migliore sensibilità.

Pesticidi	LOD (mgL <sup>-1</sup> )	LOQ(mgL <sup>-1</sup> )
Atrazina	0,06	0,19
Desmedifam	0,09	0,30
Etofumesate	0,08	0,27
Lenacil	0,05	0,16
Metamitron	0,06	0,20
Femnediam	0,13	0,45
Sulcotrione	0,05	0,17
Terbutilazina	0,04	0,13

Tabella 9

E' stata poi calcolata la precisione within-day e between-day, espressa come deviazione standard relativa percentuale DSR, sulle aree e sui tempi di ritenzione considerando tre livelli di concentrazione replicati tre volte. In Tabella 10 e Tabella 11 si riportano rispettivamente gli RDS dei tempi di ritenzione e delle aree.

Pesticidi	Precisione between-day (3 repliche) t <sub>R</sub>			Precisione within-day (3 repliche) t <sub>R</sub>		
	0.5 mg L <sup>-1</sup>	0.7 mg L <sup>-1</sup>	1.5 mg L <sup>-1</sup>	0.5 mg L <sup>-1</sup>	0.7 mg L <sup>-1</sup>	1.0 mg L <sup>-1</sup>

	<i>D.S. %</i>			<i>D.S. %</i>		
<i>Atrazina</i>	5.02	2.39	1.46	0.40	0.77	0.10
<i>Desmediam</i>	2.50	2.56	1.47	0.21	0.28	0.03
<i>Etofumesate</i>	1.19	1.41	1.35	0.31	0.79	0.09
<i>Lenacil</i>	11.42	2.64	1.45	0.28	0.40	0.10
<i>Metamitron</i>	9.51	3.73	1.47	0.29	1.45	0.12
<i>Fenmediam</i>	1,30	1,69	1,29	0,25	0,38	0,03
<i>Sulcotrione</i>	7.23	1.73	1.43	0.30	0.29	0.06
<i>Terbutilazina</i>	0.22	2.01	1.31	1.01	0.14	0.39

Tabella 10 Ripetibilità within-day and between-day del metodo a tre livelli di concentrazione rispetto ai tempi di ritenzione.

<i>Pesticidi</i>	<i>Precisione between-day (3 repliche) Area</i>			<i>Precisione within-day (3 repliche) Area</i>		
	<i>0.5 mg L<sup>-1</sup></i>	<i>0.7 mg L<sup>-1</sup></i>	<i>1.5 mg L<sup>-1</sup></i>	<i>0.5 mg L<sup>-1</sup></i>	<i>0.7 mg L<sup>-1</sup></i>	<i>1.0 mg L<sup>-1</sup></i>
	<i>D.S. %</i>			<i>D.S. %</i>		
<i>Atrazina</i>	8.76	11.39	2.08	4.74	4.61	0.73
<i>Desmediam</i>	4.64	7.39	19.13	5.64	1.34	13.99
<i>Etofumesate</i>	9.27	20.96	2.66	5.77	11.26	3.87
<i>Lenacil</i>	4.68	5.08	6.38	1.11	6.59	9.32
<i>Metamitron</i>	11.82	22.97	2.28	7.79	4.71	3.60
<i>Fenmediam</i>	4.89	6.91	2.88	3.07	2.62	0.85
<i>Sulcotrione</i>	1.36	6.84	2.89	2.47	2.53	1.05
<i>Terbutilazina</i>	11.89	12.82	4.24	0.12	6.99	1.67

Tabella 11 Ripetibilità within-day and between-day del metodo a tre livelli di concentrazione rispetto alle aree.

Come si può osservare dalle tabelle Tabella 10 e Tabella 11 le deviazioni standard within-day, come ci si aspettava, sono in media inferiori alle deviazioni standard between-day sia per i tempi di ritenzione che per le aree. Gli RDS dei tempi di ritenzione risultano inferiori agli RDS delle aree.

Per verificare la significatività della regressione è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA), riportata, insieme al test sulla linearità del modello, in Tabella 12. L'ipotesi nulla,  $H_0: b_1=b_2=\dots b_j=0$ , è stata rifiutata per ogni analita, infatti tutti i valori critici calcolati di F superano quelli tabulati. La linearità del modello, per il range indagato in questo studio, è stata confermata.

<i>Pesticidi</i>	<i>Validazione della Regressione</i>		<i>Linearità del modello</i>	
	$F_{calc}$	$F_{tab(\alpha=0,05, v1, v2)}$	$F_{calc}$	$F_{tab(\alpha=0,05, v1, v2)}$
<i>Terbutlazine</i>	1239,49	4,494	0,338	2,958
<i>Metamitron</i>	847,92	4,381	0,473	2,958
<i>Sulcotrione</i>	2297,41	4,381	0,963	2,958
<i>Atrazina</i>	881,61	4,381	0,430	2,958
<i>Lenacil</i>	1066,85	4,381	0,359	2,958
<i>Desmedifam</i>	212,60	4,667	0,190	2,958
<i>Etofumesate</i>	550,61	4,965	0,546	2,958
<i>Fenmedifam</i>	692,94	4,667	2,891	2,958

Tabella 12

Visti i risultati fino a qui riportati si può affermare che il modello in esame è lineare, e preciso, nel range di concentrazioni tra 0,10 e 1.30 mg L<sup>-1</sup>. Infatti i valori di R<sup>2</sup> sono sempre maggiori di 0,9920 mentre i valori di LOD e LOQ sono sempre inferiori rispettivamente a 0,13 e 0,45 mg L<sup>-1</sup>.

#### 5.6.1.1 Effetto matrice

Il metodo ottimizzato e validato è stato applicato ai 3 campioni reali W, WS e S preparati come descritto nella sezione Materiali e metodi. A causa della possibile presenza di altri componenti nei campioni W, WS e S è stato aggiunto un gradiente centrale in metanolo, in modo da eluire i composti indesiderati.

I cromatogrammi dei tre campioni sono riportati in Figura 22.

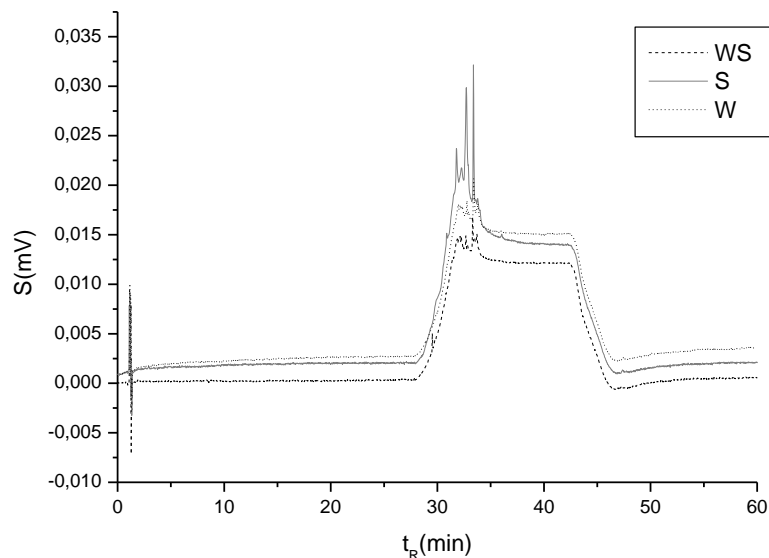


Figura 22: Cromatogramma HPLC-DAD dei tre campioni reali WS, S e W. Fase stazionaria: colonna a fase inversa Gemini C18 (Phenomenex, BO, Italy) 100.0 x 4.6 mm, dimensioni particelle 3  $\mu\text{m}$ . Fase mobile: metanolo/acqua 48:52 v/v con gradiente centrale in metanolo, a pH 3.00, flusso 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , temperatura colonna 25.0  $^{\circ}\text{C}$ . Cromatogramma estratto a 274 nm mediante rivelatore DAD.

Come si può osservare dalla Figura 22 nei tre campioni raccolti non sono presenti i pesticidi in studio e potranno quindi essere utilizzati per valutare l'effetto matrice.

Per verificare o meno la presenza dell'effetto matrice, per ogni pesticida è stata costruita una retta di calibrazione, spiccando i tre campioni a tre concentrazioni 1.5, 1.0 e 0.5  $\text{mg L}^{-1}$ , ed è stato effettuato un t-test di Student per la significatività dell'intercetta ed un t-test di parallelismo. L'effetto matrice è stato valutato comparando, attraverso un t-test, le pendenze delle rette di calibrazione costruite attraverso una calibrazione esterna con le pendenze delle rette di calibrazione ottenute dai campioni spiccati.

In Figura 23 si riporta, a titolo di esempio, il cromatogramma dei campioni reali spiccati con una miscela degli otto pesticidi studiati alla concentrazione di 1,5  $\text{mg/L}$ .

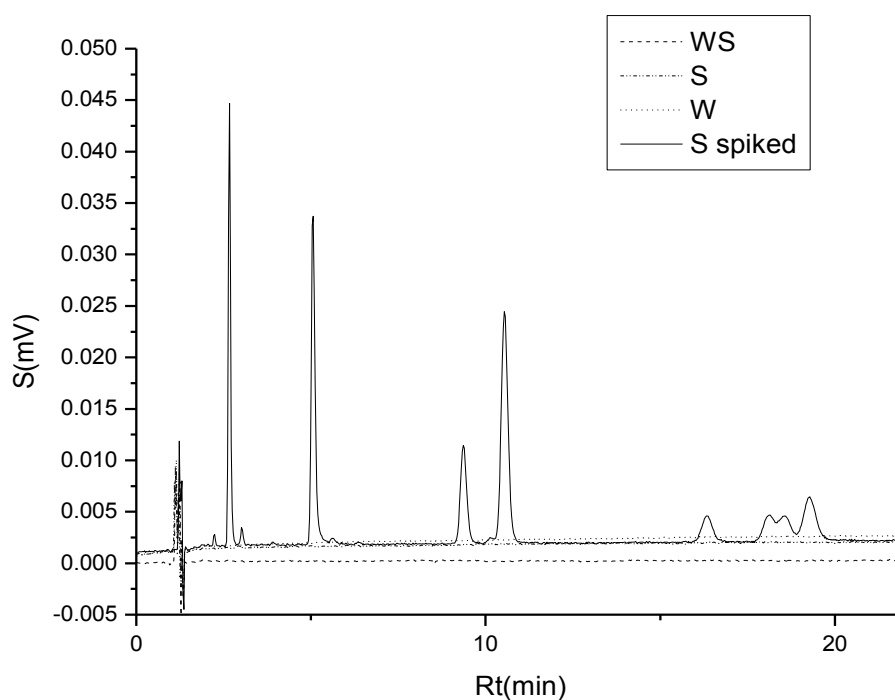


Figura 23 Cromatogramma HPLC-DAD dei campioni di acqua (W), terreno (S), acqua estratta dal terreno (WS) e dal campione di terreno spiccato con la miscela degli otto pesticidi alla concentrazione di  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  ognuno. Fase mobile metanolo/acqua 48:52 v/v con gradiente centrale in metanolo, a pH 3.00, flusso  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura colonna  $33^\circ\text{C}$ . Cromatogramma estratto a  $274\text{nm}$  mediante rilevatore DAD.

Osservando il cromatogramma sopra riportato si può notare che la separazione degli otto pesticidi non è minimamente influenzata dai vari interferenti che potrebbero essere presenti nei campioni reali.

Pesticidi	Equazioni di Calibrazione	$R^2$	Significatività dell'intercetta		Test di parallelismo	
	Campioni spiccati		$t_{\text{calc}}$	$t_{\text{tab}(\alpha=0.05, \nu=2)}$	$t_{\text{calc}}$	$t_{\text{tab}(\alpha=0.05, \nu=6)}$
Terbutilazine	$y=(47.9 \pm 0.5) \cdot 10^4 x + (2.4 \pm 0.6) \cdot 10^4$	0.9999	<u>7.326</u>	2.92	0.158	1.943
Metamitron	$y=(19.1 \pm 0.7) \cdot 10^4 x$	0.9979	1.524	2.92	0.142	1.943
Sulcotrione	$Y=(123.0 \pm 0.7) \cdot 10^3 x - (9.0 \pm 0.8) \cdot 10^3$	0.9999	<u>20.338</u>	2.92	0.020	1.943
Atrazine	$y=(5.5 \pm 0.2) \cdot 10^5 x$	0.9996	0.270	2.92	0.119	1.943
Lenacil	$y=(10.0 \pm 0.3) \cdot 10^4 x$	0.9989	0.224	2.92	0.107	1.943
Desmedifam	$y=(28.3 \pm 0.7) \cdot 10^4 x + (3.8 \pm 0.7) \cdot 10^4$	0.9994	<u>8.998</u>	2.92	0.270	1.943
Etofumesate	$y=(7.5 \pm 0.9) \cdot 10^4 x$	0.9808	2.098	2.92	0.010	1.943
Fenmedifam	$y=(2.7 \pm 0.2) \cdot 10^5 x$	0.9955	1.304	2.92	0.279	1.943

Tabella 13 Equazioni di calibrazione dei campioni spiccati.

Le equazioni delle rette di calibrazione, i coefficienti di correlazione ed i risultati dei t-test sono riportati in Tabella 13.

Per ogni pesticida studiato le due rette di calibrazione risultano parallele quindi non è presente l'effetto matrice.

## *5.7 Conclusioni*

Nel presente lavoro è stato sviluppato e validato un metodo HPLC-DAD rapido in grado di rilevare e determinare simultaneamente, in 19 minuti, otto dei pesticidi più utilizzati nelle colture di grano e barbabietola da zucchero in diverse matrici ambientali. Per tutti gli analiti in esame si è determinato il range di linearità mediante retta di taratura tra 0,10 mg/L e 1,30 mg/L, con coefficienti di correlazione superiori a 0,9920. I limiti di rilevabilità e di quantificazione calcolati sono sempre inferiori rispettivamente a 0,13 e 0,45.

## ***CAPITOLO 6***



## 6 *Determinazione della conversione in polimerizzazioni radicaliche controllate [68]*

Un parametro fondamentale da tenere in considerazione quando si effettua una sintesi polimerica è il grado di conversione, ovvero il rapporto tra la quantità di reagente consumato dalla reazione e la quantità di reagente inizialmente presente nell'ambiente di reazione.

Ci si è posti come obiettivo la messa a punto di un metodo analitico per poter determinare le quantità di monomeri consumata durante la reazione di sintesi di copolimeri random polistirene-polimetilmetacrilato.

E' stata scelta in particolare la tecnica cromatografica HPLC-DAD per poter determinare con esattezza la quantità dei due monomeri consumata e quindi valutare in modo accurato il grado di conversione della reazione di polimerizzazione. Anche in questo caso il metodo ottimizzato è stato validato in termini di Precisione, Accuratezza, Linearità di risposta, LOD (Limite di determinazione), LOQ (Limite di quantificazione) e sensibilità.

### 6.1 *Analiti*

#### 6.1.1 *Stirene*

Lo stirene (noto anche come stirolo, feniletilene o vinilbenzene) è un idrocarburo aromatico. La presenza di un doppio legame carbonio-carbonio sulla catena laterale conferisce allo stirene anche la reattività tipica degli alcheni.

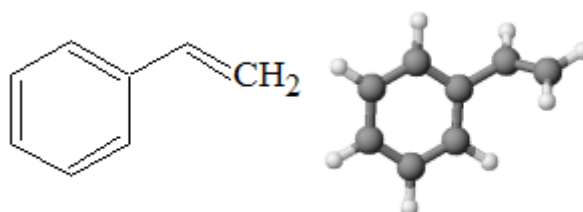


Figura 24: Struttura dello stirene.

A temperatura ambiente è un liquido oleoso trasparente dal caratteristico odore dolciastro; è tossico e infiammabile. Insolubile in acqua, si scioglie nei più comuni solventi organici[43].

Il suo principale impiego data la facilità con cui polimerizza, al punto che è necessario stabilizzarlo con sostanze capaci di bloccare la formazione di radicali liberi, è come monomero per la produzione di numerose materie plastiche, tra cui:

- il polistirene (o *polistirolo*);
- l'ABS, ovvero il polimero *acrilonitrile-butadiene-stirene*;
- la gomma SBR, ovvero *stirene-butadiene-rubber*;
- il copolimero *stirene-divinilbenzene*.

che trovano applicazione in innumerevoli prodotti e applicazioni plastiche, gomme, schiume isolanti, fibre, eccetera.

<i>Formula molecolare</i>	<i>Peso molecolare</i>	<i>densità</i>	<i>n. CAS</i>
<b>C<sub>8</sub>H<sub>8</sub></b>	104,15	0,906 g/cm <sup>3</sup>	100-42-5

Tabella 14

L'esposizione a concentrazioni superiori a 200-400 ppm causa vertigini, sonnolenza, cefalea, turbe della memoria, diminuzione dei riflessi ed irritazione transitoria delle mucose congiuntivali e nasali, mentre a 500 ppm è costante l'irritazione congiuntivale delle prime vie aeree ed è frequente la tosse.

Una sintomatologia irritativa a carico delle congiuntive si manifesta per un'esposizione a 800ppm; la permanenza a queste concentrazioni causa svogliatezza, sonnolenza, astenia muscolare e depressione.

Lo stirene liquido, essendo una sostanza molto irritante, può causare eritema, xerosi e delle fissurazioni; l'insorgenza di dermatiti può essere facilitata dal contemporaneo uso di altri solventi.

Lo stirene è stato riconosciuto ufficialmente come cancerogeno dal XII rapporto sui cancerogeni, pubblicato il 10 giugno 2011 dal Dipartimento Statunitense di salute, Programma Tossicologico Nazionale in quanto, quando metabolizzato, diventa stirene-7,8-oxide che lega covalentemente il DNA. [44]

Molti articoli presenti in letteratura denunciano come la decomposizione del polistirene presente negli oceani porti ad un accumulo di STY nei fondali e nelle acque oceaniche causando un inquinamento ambientale. [45][46]

Molti articoli presenti in letteratura evidenziano l'inquinamento alimentare dovuto alla migrazione dello stirene dal polistirene dei vasetti di yogurt [47], dei bicchieri in plastica

per le bevande calde [48], dalla plastica di imballaggio del formaggio gorgonzola [49] di cui sono costituiti. Sono stati anche condotti studi per verificare il rilascio del monomero dai granuli di polistirene utilizzati per costruire oggetti per bambini [51] e da parte della schiuma espansa di polistirene [50]. L'inquinamento ambientale è invece dovuto dalla decomposizione del polistirene presente negli oceani che porta ad un accumulo di stirene nei fondali e nelle acque oceaniche [45][46].

### 6.1.2 Metil metacrilato

Il metil metacrilato (MMA) è un composto organico di formula  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$ . Questo liquido colorato, metil estere dell'acido metacrilato (MAA), è un monomero prodotto su larga scala per la produzione del poly(metil metacrilato) PMMA.

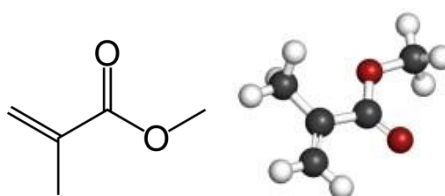


Figura 25

Il principale impiego dell'MMA è la produzione del corrispondente polimero, il polimetilmetacrilato (PMMA), commercialmente noto come "Plexiglass", una resina termoplastica rigida che per l'ottima trasparenza e la buona stabilità alla luce trova impiego soprattutto come vetro organico. Il polimetilmetacrilato si utilizza, sotto forma di resina acrilica auto-polimerizzabile, in ortodonzia per la realizzazione di basi per apparecchi mobili e in ortopedia come cemento acrilico per fissare in maniera definitiva l'osso alla protesi. In letteratura è presente uno studio che dimostra come avviene il rilascio del monomero da parte delle protesi dentarie realizzate con resine acriliche contenenti l'MMA [53].

<i>Formula molecolare</i>	<i>Peso molecolare</i>	<i>densità</i>	<i>n. CAS</i>
<b><math>\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3</math></b>	100,12	0,94 g/cm <sup>3</sup>	80-62-6

Tabella 15

L'MMA è infiammabile ed irritante, è assorbito dal corpo tramite inalazione, ingestione e contatto cutaneo. La concentrazione in aria pericolosa per la salute è raggiunta velocemente ad una temperatura di 20°C. Non è cancerogeno. Allo stato liquido o ad alte concentrazioni di vapore può irritare occhi, sistema respiratorio e causare irritazioni alla pelle. Una prolungata esposizione può procurare mal di testa, nausea, sonnolenza e incoscienza. Una ripetuta e prolungata sovraesposizione può causare permanenti irritazioni allergiche alla pelle [52].

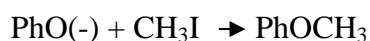
### 6.1.3 Anisolo

L'anisolo, etere metilico del fenolo, è un composto aromatico che presenta un gruppo metossido unito all'anello aromatico del benzene. Possiede il tipico odore e sapore dell'anice, ed è contenuto in esso.

<i>Formula molecolare</i>	<i>Peso molecolare</i>	<i>densità</i>	<i>n. CAS</i>
<b>C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O</b>	108,14	1,02 g/cm <sup>3</sup>	100-66-3

Tabella 16

Si prepara facilmente dal fenolo attraverso la reazione di Williamson riportata di seguito:



Viene utilizzato come solvente e come materia prima per la produzione di sostanze odorose. Dà origine a numerosi derivati (nitro, alogeno, idrossi, ammino) utilizzati in medicina e nell'industria dei coloranti. Dall'anisolo è possibile ricavare il trinitroanisolo, esplosivo dotato della stessa potenza del tritolo. Spesso è usato per insaporire i cibi e come solvente.

Il BHA (butil-idrossi-anisolo), identificato dalla sigla E320, è un additivo antiossidanti di sintesi usato nei cibi confezionati prodotti industrialmente. Il BHA trova impiego come antiossidante anche nella produzione di mangimi per animali e come additivo negli imballaggi per alimenti.

L'anisolo è un liquido infiammabile, pericoloso per gli occhi e per le vie respiratorie. [43]

#### 6.1.4 Copolimero random poli-stirene poli-metilmetacrilato

Un polimero (dal greco "*che ha molte parti*") è una macromolecola, ovvero una molecola dall'elevato peso molecolare, costituita da un gran numero di gruppi molecolari (detti *unità ripetitive*) uguali o diversi (nei copolimeri), uniti "a catena" mediante la ripetizione dello stesso tipo di legame (covalente).

Per definire un polimero bisogna conoscere:

- la natura dell'unità ripetente;
- la natura dei gruppi terminali;
- la presenza di ramificazioni e/o reticolazioni;
- gli eventuali difetti nella sequenza strutturale che possono alterare le caratteristiche meccaniche del polimero.

I polimeri possono essere classificati in vari modi:

- I polimeri prodotti da monomeri tutti uguali sono detti omopolimeri, mentre quelli prodotti da monomeri rappresentati da due o più specie chimiche differenti sono detti copolimeri.
- A seconda della loro struttura, possono essere classificati in polimeri lineari, ramificati o reticolati.
- In relazione alle loro proprietà dal punto di vista della deformazione, si differenziano in termoplastici, termoindurenti e elastomeri.
- Esistono polimeri naturali *organici* (ad esempio cellulosa e caucciù), polimeri artificiali, ossia ottenuti dalla modificazione di polimeri naturali (come l'acetato di cellulosa) e polimeri sintetici, ossia polimerizzati artificialmente (ad esempio PVC e PET).
- A seconda del tipo di processo di polimerizzazione da cui sono prodotti si distinguono in "polimeri di addizione" e "polimeri di condensazione".
- In relazione all'omogeneità del peso molecolare si possono distinguere i polimeri *omogenei* da quelli *eterogenei* o *polidispersi*, con quest'ultimi caratterizzati da alta variabilità del peso molecolare medio.

Quando il polimero è costituito da due unità ripetitive di natura diversa, si dice che esso è un copolimero. Nell'ipotesi di avere due monomeri, vi sono 4 modi di concatenamento delle unità ripetitive A e B che derivano da tali monomeri:

- random: le unità ripetitive A e B si avvicendano in maniera casuale;



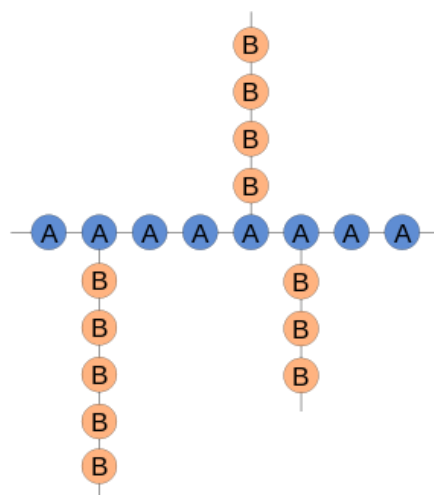
- alternato: se le unità ripetitive si susseguono in coppia, prima A, poi B, poi di nuovo A e così via;



- a blocchi: se le unità ripetitive di uno stesso tipo (A) sono in blocchi che si alternano con i blocchi costituiti dall'altra unità ripetitiva (B);



- a innesto: se le unità ripetitive di uno stesso tipo (A) formano un'unica catena, sulla quale s'innestano le catene laterali costituite dalle unità ripetitive del secondo tipo (B).



I copolimeri random, alternati e a blocchi sono copolimeri lineari, mentre i copolimeri a innesto sono polimeri ramificati.

Il PMMA è apprezzato per le sue eccellenti proprietà ottiche, per la sua durezza superficiale (che lo rende resistente ai graffi) e per la sua resistenza alla degradazione da radiazione ultravioletta. Per contro, è notoriamente suscettibile alla degradazione chimica da parte degli alcoli, il che ne limita l'utilizzo in campo alimentare. Il PS è invece apprezzato per le sue caratteristiche di chiarezza e rigidità. La combinazione dei due crea un polimero adatto per applicazioni che richiedono eccellente chiarezza, con resistenza agli agenti atmosferici e resistenza ai graffi. È facile da produrre, pertanto economico per molte applicazioni. Il P(S-MMA) è una conveniente alternativa alle resine trasparenti più costose come le resine acriliche di MMA.

## 6.2 *Materiali & Metodi*

### 6.2.1 *Strumentazione*

- Sistema HPLC Merck HITACHI composto da: pompa modello LaChrom Pump L-7100, rivelatori modello UV Detector L-7400 e Diode Array Detector L-7450A, interfaccia modello D-7000.
- Colonna C18 LiChroCART 250-4, HPLC- Cartridge, LiChrospher 100 Rp-18e (5 µm), con precolonna C18 della stessa ditta, il tutto contenuto all'interno di un termostato VWR HITACHI modello Column Oven L-2300 per permettere di effettuare tutte le analisi ad una stessa temperatura.
- Spettrofotometro UV-Visibile JAS.CO modello V-630 a doppio raggio.
- Sistema per la produzione di acqua ultrapure Milli-Q Gradient della Millipore Corporation, collegato al modulo deionizzatore RIOs 5 della stessa ditta
- Pompa a vuoto KNFLab LABOPORT modello N 820.3 AN.18 collegata ad una beuta codata che raccoglieva il solvente filtrato da una carta da filtro inserita in un imbuto per la filtrazione sottovuoto.
- Sonicatore SOLTEC modello M S2.

### 6.2.2 *Reattivi*

➤ metanolo	Sigma-Aldrich	67-56-1	>99,9 %
➤ Acetonitrile	Merck	75-05-8	>99,9 %
➤ Tetraidrofurano	Sigma-Aldrich	109-99-9	>99,9 %
➤ Anisolo	Fluka	100-66-3	>99 %
➤ Stirene	Sigma-Aldrich	100-42-5	>99,9 %
➤ Metilmatacrlato	Sigma-Aldrich	80-62-6	99%



### 6.2.3 *Filtraggio fase mobile e campioni reali*

Tutti i solventi utilizzati per la preparazione della fase mobile, degli standard e dei campioni reali, anche se con purezza maggiore del 99,9%, sono stati filtrati mediante filtro in cellulosa rigenerata (utilizzato per l'acqua) e filtro in polipropilene (utilizzato per solventi organici). L'acqua è stata sostituita ogni settimana per evitare la formazione di alghe che avrebbero potuto danneggiare la colonna cromatografica.

Vista la complessità del grezzo di reazione tutti gli standard e i campioni reali verranno filtrati prima dell'analisi per evitare l'iniezione di impurezze nel sistema cromatografico. Tutti i campioni sono stati filtrati mediante filtri in PTFE con diametro di 25 mm e pori di 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.4 *Soluzioni Standard/Madre*

Per la preparazione delle soluzioni madre dei tre analiti sono stati diluiti separatamente in 10ml di acetonitrile 100microL delle soluzioni di partenza al 99.9% di purezza, raggiungendo così una concentrazione pari a  $10000\text{mgL}^{-1}$ . Da quest'ultima si otterrà, mediante diluizione 1:100 in acetonitrile, la soluzione madre che si utilizzerà per la preparazione degli standard per la/di calibrazione. Quest'ultima diluizione verrà effettuata nel solvente utilizzato come fase mobile.

### 6.2.5 *Campioni reali*

I campioni reali analizzati in questo lavoro sono diluizioni del grezzo di reazione, contenenti quindi tutti i componenti utilizzati per la sintesi di copolimeri P(S-r-MMA). Le analisi cromatografiche sono state effettuate prelevando, a tempi diversi, una certa quantità del grezzo di reazione durante il processo di polimerizzazione. I prelievi sono stati effettuati al tempo zero ovvero all'inizio della reazione di polimerizzazione, che corrisponde all'aggiunta dell'iniziatore radicalico (HEBIB), e poi dopo 2, 4, 6 e 22 ore di reazione. Quindi le aliquote prelevate avranno composizioni diverse, infatti la concentrazione di polimero aumenterà con il passare delle ore mentre le concentrazioni dei monomeri diminuirà nel tempo. Le diluizioni dei campioni reali prima dell'analisi cromatografica dipenderanno dalle quantità dei monomeri rimaste nel grezzo di reazione. Visto che con il passare delle ore aumenta la quantità di polimero e visto l'importanza di garantire la completa dissoluzione dello stesso, la prima diluizione sarà uguale per tutti i

campioni e prevede la diluizione in 25 ml di THF di 0,5g del grezzo di reazione. Le soluzioni così ottenute verranno poi diluite in acetonitrile 1:100 seguite poi da una diluizione avente fattore 162, ottenendo così la concentrazione desiderata ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ). Per quanto riguarda le soluzioni prelevate dopo 6 e 22 ore le prime due diluizioni rimangono invariate mentre la terza prevede una diluizione rispettivamente di 1:80 ottenendo una concentrazione di  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  e di 1:36 ottenendo una concentrazione finale di  $3,5 \text{ mgL}^{-1}$ .

### 6.2.6 *Analisi Cromatografica*

Le analisi cromatografiche sono state condotte mediante tecnica a fase inversa, con fase stazionaria C18 LiChroCART e fase mobile composta dal seguente gradiente: primi 12 min nelle condizioni 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O, passaggio al 100% di THF in 5 minuti e mantenimento per ulteriori 5 min ed infine ripristino delle condizioni iniziali. Il rivelatore Uv-Vis è stato impostato ad una lunghezza d'onda di 220 nm da 0 a 4,6 minuti, tempo necessario per l'eluizione del metil metacrilato e dell'anisolo, e da 4,6 minuti fino al termine della corsa cromatografica ad una  $\lambda$  di 247 nm per l'identificazione dello stirene. Il range di esplorazione del rivelatore DAD è stato impostato da 200 a 300 nm, dal momento che sia il MMA che l'ANI possiedono un abbondante assorbimento intorno ai 220 nm e nessuno dei tre analiti presenta assorbimento rilevante oltre i 300 nm.

L'analisi viene effettuata iniettando 20  $\mu\text{l}$  del campione. Il cromatografo lavora ad un flusso di 1,0 ml/min, una temperatura termostata di 23°C ed una pressione di circa 110 bar.

### 6.2.7 *Analisi Spettrofotometrica*

L'analisi allo spettrofotometro UV-Vis è stata condotta sulle soluzioni standard di STY, MMA e ANI diluiti nei tre solventi organici utilizzati in questo progetto: acetonitrile, metanolo e tetraidrofurano; la concentrazione finale ottenuta per tutte le soluzioni è 1,00 mg/L.

Anche per quanto riguarda le analisi allo spettrofotometro i campioni dopo le diluizioni sono stati filtrati. Il range delle lunghezze d'onda analizzate dallo spettrofotometro è stato impostato da 200 a 600 nm. Il limite inferiore è stato imposto dall'utilizzo delle cuvette porta campione in quarzo, poiché il quarzo non permette il passaggio delle radiazioni

aventi lunghezza d'onda inferiore a 200 nm. La velocità di scansione è stata impostata a 200 nm/min.

## 6.3 Prove Preliminari

### 6.3.1 Caratterizzazione UV-Visibile degli analiti

Il primo passo è stato quello di registrare uno spettro Uv-Vis dei tre analiti, nei tre solventi organici maggiormente utilizzati come fase mobile in cromatografia HPLC in fase inversa: acetonitrile, metanolo e tetraidrofurano.

Gli spettri che sono stati acquisiti nel range 200-600nm alla concentrazione di 1mg L<sup>-1</sup> sono riportati in Figura 26, Figura 27, e Figura 28.

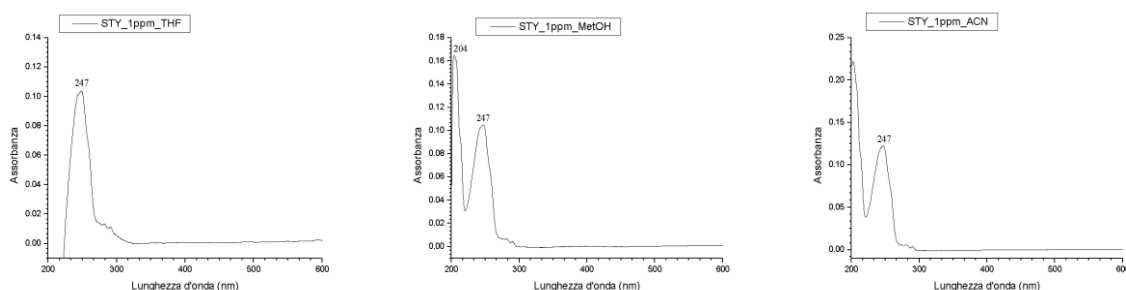


Figura 26: Spettri UV-Visibile del monomero stirene diluito rispettivamente in ACN, MetOH e THF alla concentrazione di 1,00 mg/L. La molecola mostra un elevato picco di assorbimento a 247 nm ed un massimo di assorbimento a circa 200 nm quando diluita in ACN e MetOH; in THF mostra un solo picco a 247 nm.

Come è possibile osservare dagli spettri riportati in Figura 26 lo stirene mostra un elevato picco di assorbimento a 247 nm in tutti e tre i solventi utilizzati, e un ancora maggiore adsorbimento a circa 200 nm quando disciolto in acetonitrile e metanolo. Quindi la lunghezza d'onda più idonea, che verrà utilizzata nello sviluppo del metodo, è quella a 247nm.

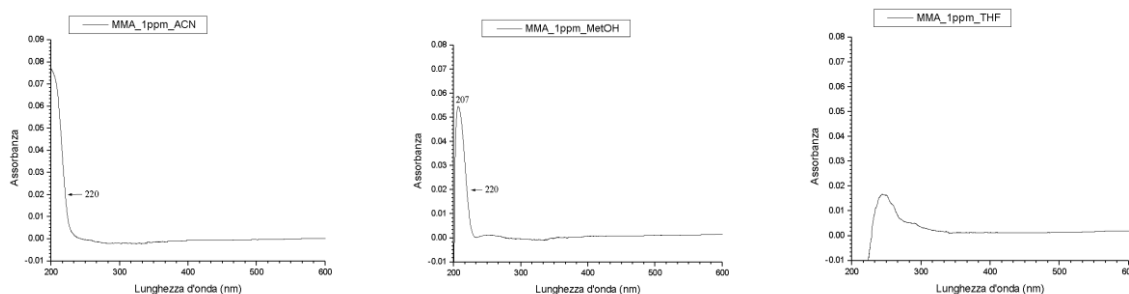


Figura 27: Spettri UV-Visibile del monomero metil metacrilato diluito rispettivamente in ACN, MetOH e THF alla concentrazione di 1,00 mg/L. La molecola mostra un assorbimento crescente da circa 230 nm a 200 nm quando diluita in ACN e MetOH; quando diluita in THF mostra un debole picco a 250 nm.

Osservando gli spettri riportati in Figura 27 è possibile notare come il metil metacrilato quando diluito in metanolo mostri un adsorbimento massimo a 207nm, in tetraidrofurano invece presenta un basso adsorbimento a 250nm. Quando il monomero viene sciolto in metanolo, a causa del limite inferiore di 200nm, non è possibile individuare il picco massimo di adsorbimento.

Osservando i tre spettri è possibile concludere che la lunghezza d'onda più idonea per lo studio del metil metacrilato è compresa tra 200 e 230 nm. Inoltre il tetraidrofurano non risulta essere una buona scelta come eluente a causa della bassa assorbanza registrata in tale solvente.

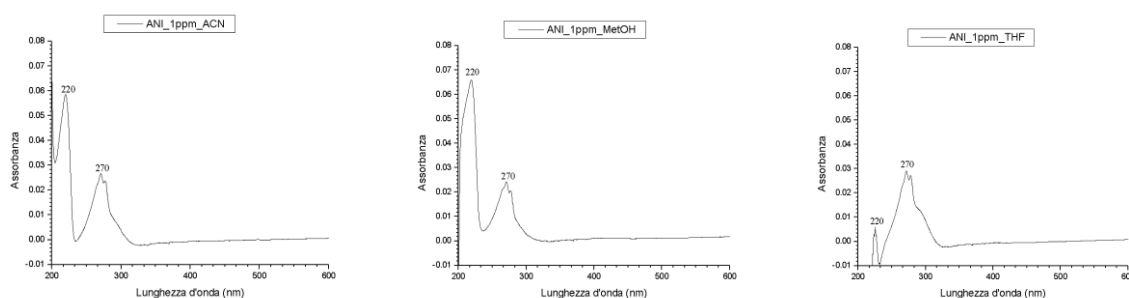


Figura 28: Spettri UV-Visibile dello standard interno anisolo diluito rispettivamente in acetonitrile, metanolo e tetraidrofurano alla concentrazione di 1,00 mg/L. La molecola mostra un assorbimento molto debole a 270 nm ed uno di maggiore intensità (per ACN e MetOH) a 220 nm.

Come si può osservare dagli spettri di assorbimento riportati in Figura 28 l'anisolo presenta un debole adsorbimento a 270nm ed uno maggiore a 220nm. Quando l'analita viene diluito in tetraidrofurano entrambi gli adsorbimenti risultano poco intensi. La lunghezza d'onda più adatta è quella a 220nm sia per il metanolo che per l'acetonitrile. Il tetraidrofurano anche in questo caso non risulta essere una buona scelta come eluente.

Come si può notare dalle figure sopra riportate dei tre analiti lo stirene è quello che presenta l'adsorbimento maggiore.

## 6.4 Ottimizzazione del Metodo

### 6.4.1 Prove preliminari

Per prima cosa sono state condotte delle analisi sui singoli monomeri, in modo da poter identificare i singoli analiti, utilizzando differenti fasi mobili costituite dai solventi principalmente utilizzati in HPLC a fase inversa, ovvero metanolo, acetonitrile, tetraidrofurano e l'acqua puri o in miscela. Il tetraidrofurano è stato scelto perché garantisce la solubilizzazione della maggior parte dei componenti del grezzo, infatti è uno dei solventi utilizzati nella reazione di polimerizzazione.

Lo stirene è stato il primo analita ad essere stato analizzato: fase mobile 100% tetraidrofurano, flusso  $1,00 \text{ ml min}^{-1}$  alla concentrazione di  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  in THF. In Figura 29 si riportano i cromatogrammi del monomero ottenuti da entrambi i rivelatori UV-Vis e DAD, estratti rispettivamente a 250 e 220 nm.

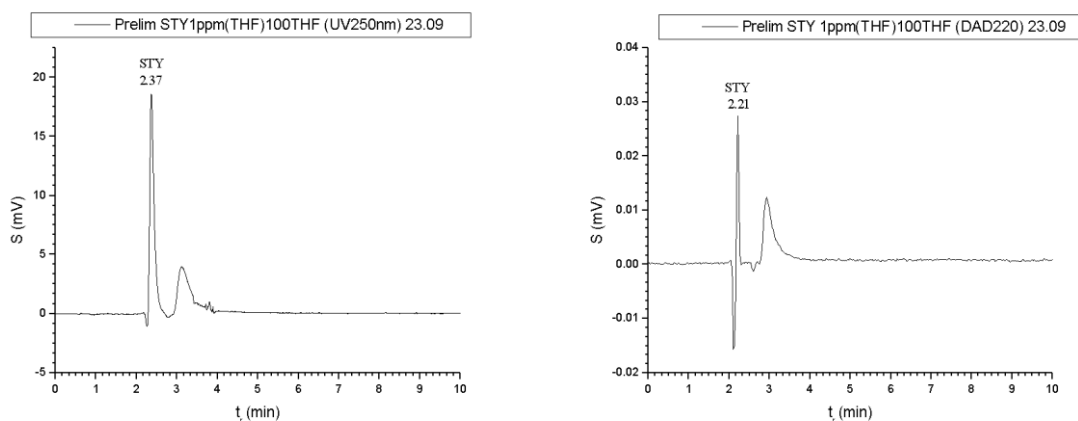


Figura 29: Cromatogrammi dello stirene diluito in THF alla concentrazione di  $1,00 \text{ mg/L}$ . Fase mobile 100% THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore UV-Visibile a 250 nm e da quello DAD a 220 nm. Il picco dello stirene eluisce ad un tempo di ritenzione di 2,37 minuti per il rivelatore UV-Vis e a 2,21 minuti per quello DAD, entrambi troppo vicini al tempo morto di circa 2,11 minuti.

Lo stirene eluisce con un tempo di ritenzione ( $t_r$ ) di 2,37 minuti per il rivelatore UV-Vis e a 2,21 minuti per quello DAD, entrambi troppo vicini al picco di iniezione di 2,11 minuti circa.

Il diverso tempo di ritenzione ottenuto dai due rilevatori, per lo stesso analita è dovuto da un fattore strumentale, infatti i due rilevatori sono posti in serie; il campione passa prima al rivelatore DAD e solo dopo in quello UV-Vis. Essendo i due tempi di ritenzione paragonabili, per questo paragrafo, verranno riportati solamente i cromatogrammi estratti a 220 nm dal rivelatore DAD.

Il tetraidrofurano risulta essere una fase mobile troppo apolare per permettere allo stirene di essere trattenuto in colonna, pertanto sono state testate le seguenti fasi mobili, 50:50 (v/v) THF:MetOH e 50:50 (v/v) THF:ACN. Di seguito (Figura 30) vengono riportati i cromatogrammi:

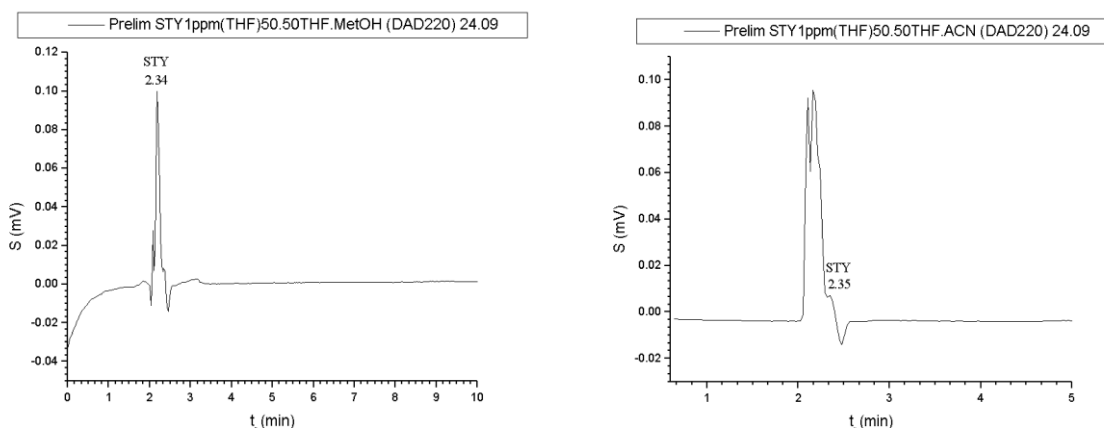


Figura 30: Cromatogrammi dello stirene diluito in THF alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 50:50 (v/v) THF:MetOH e 50:50 (v/v) THF:ACN. Cromatogrammi estratti dal rivelatore DAD a 220 nm. I picchi dello STY eluiscono ad un tempo di ritenzione di 2,34 - 2,35 minuti, troppo vicini al tempo morto di 2.03 minuti.

Come si può notare dai due cromatogrammi riportati in Figura 30 il cambio di fase mobile non ha prodotto il risultato sperato: il picco dello stirene risulta ancora troppo vicino al tempo morto, oppure coeluito con composti incogniti aventi un assorbimento molto intenso.

Nelle prove successive oltre al cambio di fase mobile è stato cambiato il solvente in cui lo stirene era diluito, per verificare se una diversa interazione tra eluente e analita potesse migliorare la ritenzione di quest'ultimo. Per cercare di trattenere maggiormente l'analita in colonna si è deciso di aumentare la polarità dell'eluente.

Quindi utilizzando come solvente di diluizione l'acetonitrile sono state usate le seguenti fasi mobili: 100% ACN, 50:50 (v/v) ACN:MetOH, 75:25 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O, da cui si sono ottenuti i cromatogrammi riportati in Figura 31. Dalla figura sotto riportata si può notare come lo stirene diventi identificabile in presenza di un solvente polare, infatti il tempo di ritenzione aumenta al diminuire della capacità eluotropa della fase mobile.

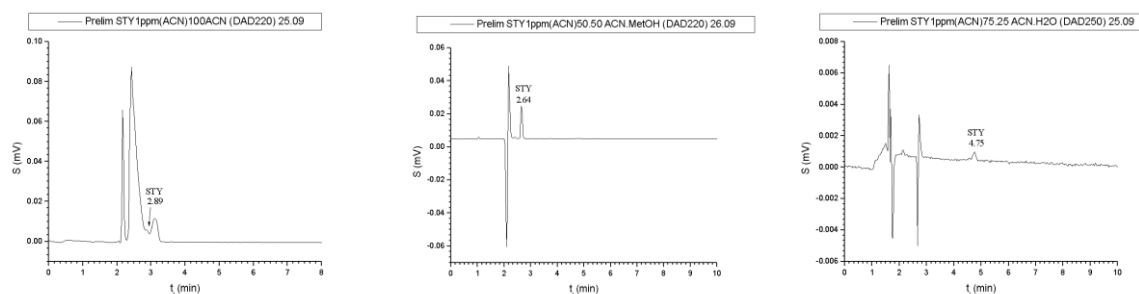


Figura 31: Cromatogrammi dello stirene diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 100% acetonitrile, 50:50 (v/v) ACN:MetOH e 75:25 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O. Cromatogrammi estratti dal rivelatore DAD a 220 nm. L'analita coeluisce, ad un tempo di ritenzione di 2,89 minuti, con altri composti non identificati quando la fase mobile impiegata è quella 100% acetonitrile. Quando la fase mobile è 50:50 (v/v)

ACN:MetOH il tempo di ritenzione dello STY è di 2,64 minuti, mentre quando si utilizza una soluzione eluente 75:25 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O il tempo di ritenzione è di 4,75 minuti.

Considerato che in tutti i cromatogrammi fin qui ottenuti erano presenti picchi ignoti, anche se era stato iniettato un solo analita, si è deciso di sostituire la precolonna.

Identificato il segnale dello stirene, si è passati all'identificazione del secondo monomero della reazione di polimerizzazione il metil metacrilato.

Anche se la fase mobile 75:25 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O è risultata essere la migliore per l'eluizione dello stirene, occorre considerare che la presenza di acqua potrebbe indurre la precipitazione del polimero in colonna nel momento in cui si andrà ad analizzare il grezzo di reazione. Quindi la prima fase mobile ad essere stata testata per il secondo monomero è la seguente: 50:50 (v/v) ACN:MetOH (il metanolo è il solvente più polare dopo l'acqua). In Figura 32 si riporta il cromatogramma del metil metacrilato diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg L<sup>-1</sup> con fase mobile 50:50 (v/v) ACN:MetOH.

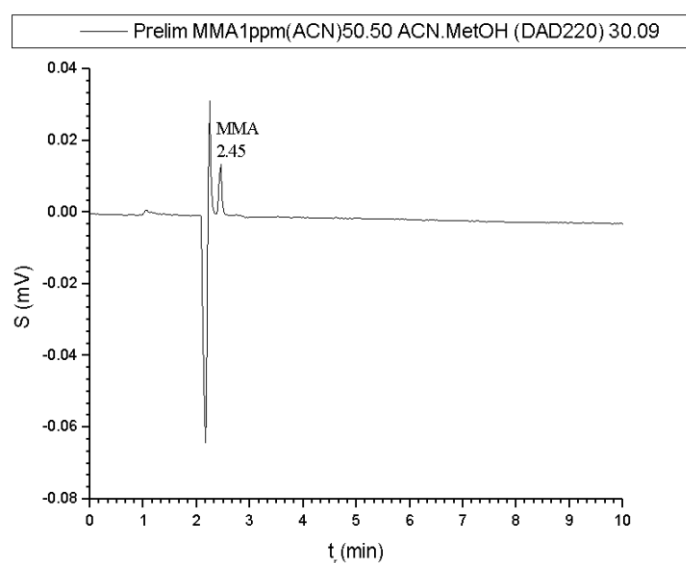


Figura 32: Cromatogramma del metil metacrilato diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 50:50 (v/v) ACN:MetOH. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 2,45 minuti.

Dal cromatogramma sopra riportato è possibile osservare come il picco del metil metacrilato presenti un tempo di ritenzione di 2,45 minuti, troppo vicino al tempo morto di 2,20 minuti. Per aumentare la polarità della fase mobile si è aumentata la percentuale di metanolo prima al 60 e in fine al 100%, per quest'ultima analisi è stato ridotto il flusso a 0.70ml min<sup>-1</sup>. Le due analisi così descritte sono riportate in Figura 33.

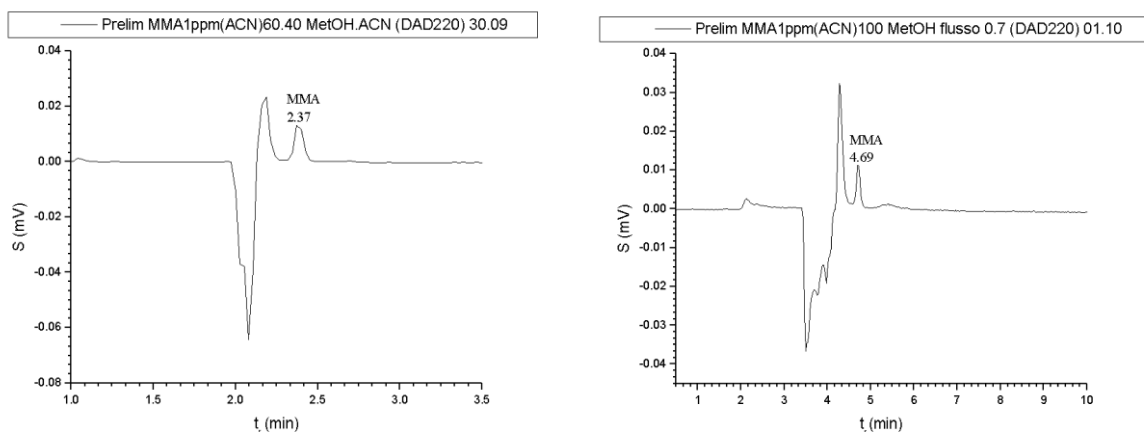


Figura 33: Cromatogrammi della metil metacrilato diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 40:60 (v/v) ACN:MetOH e 100% MetOH. Cromatogrammi estratti dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 2,37 minuti con la fase mobile 40:60 (v/v) ACN:MetOH, mentre di 4,69 minuti con l'eluente 100% MetOH e flusso 0,70 ml/min.

Come è possibile osservare dalla Figura 33 l'aumento della percentuale di metanolo non ha sortito alcun miglioramento. Visto che la presenza di acqua nella fase mobile potrebbe portare alla precipitazione del polimero in colonna, si è valutato come lo stirene si comportasse con una fase mobile al 100% di metanolo, Figura 34.

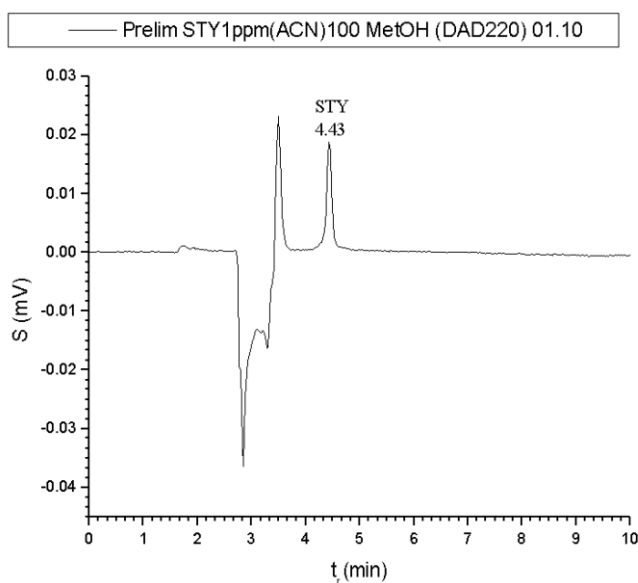


Figura 34: Cromatogramma dello stirene diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 100% MetOH. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco dello STY mostra un tempo di ritenzione di 4,43 minuti.

Come si può osservare dal cromatogramma riportato in Figura 34 lo stirene eluisce ad un tempo di 4,43 minuti, risultato simile a quello raggiunto con la fase mobile 75:25 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O. Stabilito che il metanolo puro poteva essere un buon eluente per i due



monomeri, si è cercato di capire se il cambio del solvente di diluizione potesse influire positivamente sull'eluizione. Quindi sono state effettuate due analisi in cui i due monomeri sono stati diluiti nello stesso solvente della fase mobile, in metanolo (Figura 35).

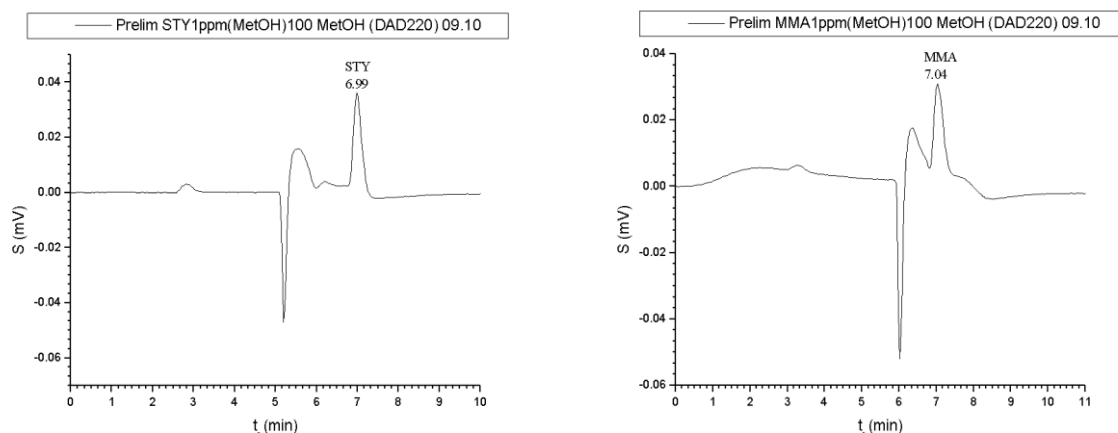


Figura 35: Cromatogrammi dello stirene e del metil metacrilato diluiti in metanolo alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 100% MetOH. Cromatogrammi estratti dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco dello stirene mostra un tempo di ritenzione di 6,99 minuti, quello del metil metacrilato di 7,04 minuti.

Il tempo di ritenzione dei due monomeri, riportati in Figura 35, risulta maggiore rispetto a quelli ottenuti in Figura 31 e Figura 32, quindi il cambio di solvente ha influito positivamente sull'interazione analiti-fase mobile, portando però ad un peggioramento della forma dei picchi.

L'ultimo passo consiste nell'identificazione dell'anisolo, un solvente della reazione di polimerizzazione, da noi usato come standard interno. In Figura 36 si riporta l'analisi cromatografica dell'anisolo diluito in metanolo alla concentrazione di 1,00mg L<sup>-1</sup>, con fase mobile 100% metanolo.

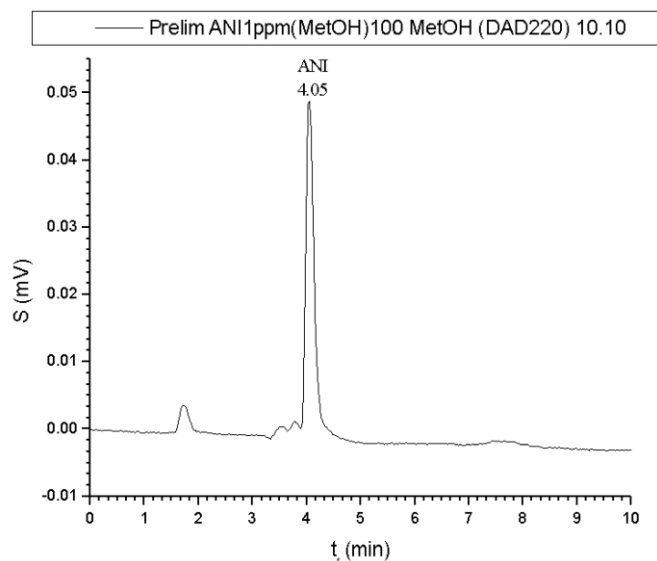


Figura 36: Cromatogramma dell'anisolo diluito in metanolo alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 100% metanolo. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco dell'anisolo mostra un tempo di ritenzione di 4,05 minuti.

Osservando la Figura 36 si può notare come l'anisolo presenti un picco molto intenso a 4,05 minuti. Dopo aver identificato i tre analiti singolarmente è stata condotta un'analisi cromatografica della miscela dei tre in metanolo con fase mobile 100% metanolo, riportata in Figura 37.

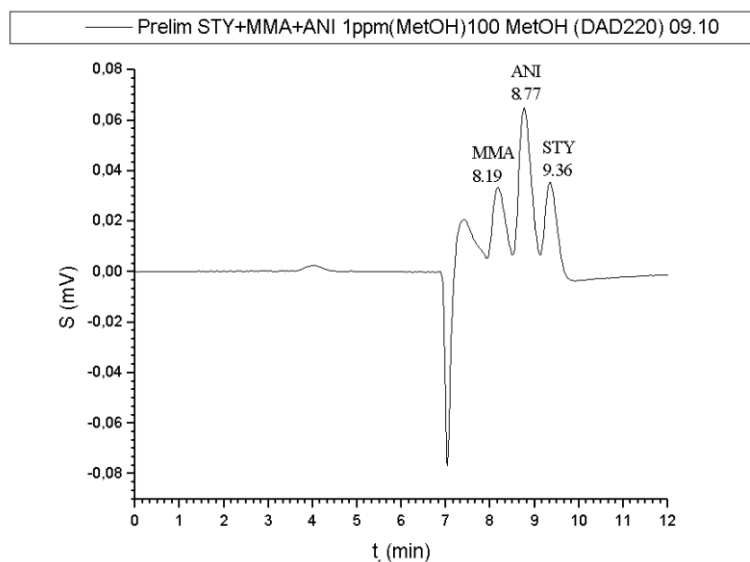


Figura 37: Cromatogramma della miscela stirene, metil metacrilato ed anisolo diluita in metanolo alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 100% MetOH. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 8,19 minuti, quello dell'anisolo di 8,77 minuti, mentre quello dello stirene è di 9,36 minuti.

I tre analiti risultano essere parzialmente sovrapposti, quindi sono stati testati altri solventi di diluizione in modo da migliorare la separazione cromatografica. Comunque, per quanto

la separazione non sia ottimale, mediante l'utilizzo del rivelatore DAD è possibile identificare ed estrarre i singoli analiti a lunghezze d'onda specifiche. In Figura 38 si riporta il cromatogramma della miscela dei tre analiti diluita in acetonitrile e in tetraidrofurano con fase mobile 100% metanolo.

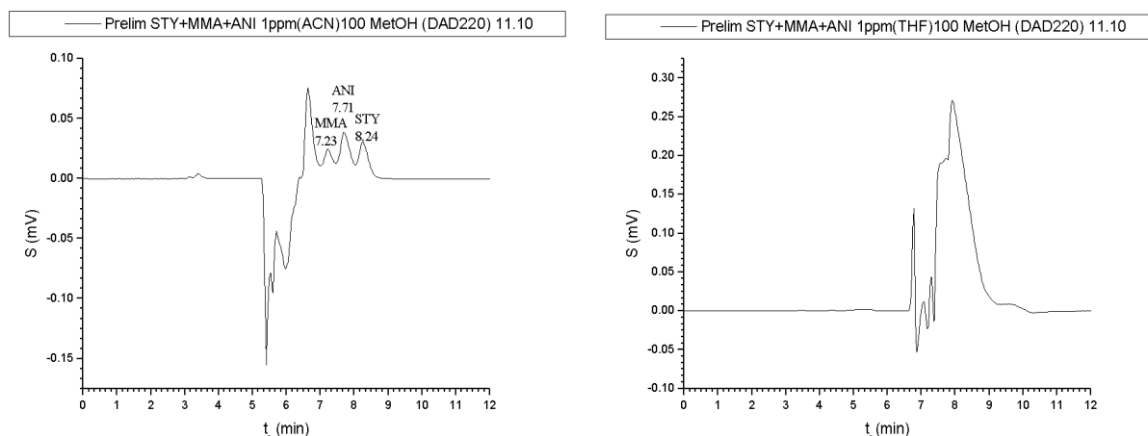


Figura 38: Cromatogrammi della miscela stirene, anisolo e metil metacrilato diluita in ACN e in THF alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 100% MetOH. Cromatogrammi estratti dal rivelatore DAD a 220nm. Quando gli analiti sono diluiti in acetonitrile il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 7,23 minuti, quello dell'anisolo di 7,71 minuti, mentre quello dello stirene di 8,24 minuti; quando invece il solvente di diluizione è il THF tutti gli analiti coeluscono a circa 8 minuti.

Come si può osservare dalla Figura 38 il cambio del solvente di diluizione non ha portato al risultato sperato, l'utilizzo dell'acetonitrile non porta alcuna variazione mentre il tetraidrofurano fa coeluire i tre analiti. Si è quindi deciso di utilizzare come solvente di diluizione l'acetonitrile, dal momento che è il solvente che fornisce i migliori risultati dal punto di vista spettroscopico.

A questo punto è stata testata la sensibilità del metodo, sono state condotte diverse analisi della miscela a concentrazioni sempre minori: 0,80, 0,60 e 0,40 mg L<sup>-1</sup>.

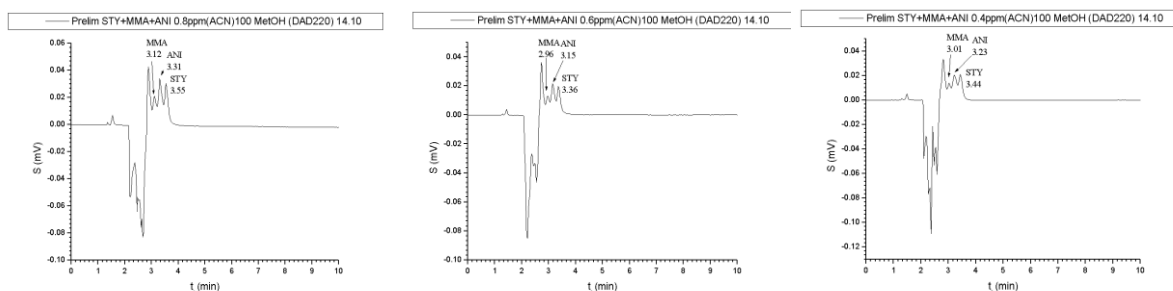


Figura 39: Cromatogrammi della miscela diluita in acetonitrile alle concentrazioni di 0,80 mg/L, 0,60 mg/L e 0,40 mg/L. Fase mobile 100% MetOH. Cromatogrammi estratti dal rivelatore DAD a 220nm.

Com'è possibile osservare dai cromatogrammi riportati in Figura 39 i tempi di ritenzione risultano inferiori rispetto a quelli ottenuti dalle analisi precedenti, nelle stesse condizioni cromatografiche, alla concentrazione di 1,00 mg L<sup>-1</sup>.

La differenza riscontrata è stata causata da un errore strumentale, nonostante le analisi fin qui effettuate siano state condotte con un flusso di 1,00ml min<sup>-1</sup> la pressione all'interno della colonna è passata da 57 a 110 bar, valore su cui si è stabilizzata. Quindi dai cromatogrammi riportati in Figura 39 in poi si riscontreranno tempi di ritenzione minori. Anche a diluizioni alte (0,40mg L<sup>-1</sup>) i tre analiti risultano ben visibili ed identificabili, dimostrando l'elevata sensibilità del metodo.

#### 6.4.2 Analisi cromatografica dei campioni reali

A questo punto, dopo aver ottimizzato la separazione dei singoli analiti, si è analizzato il grezzo di reazione contenente i due monomeri, l'anisolo, l'iniziatore della polimerizzazione (HEBIB) ed altri cofattori come il DMSO, CuBr ed il Me<sub>6</sub>TREN. Il grezzo di reazione è stato diluito in acetonitrile fino a raggiungere la concentrazione di circa 1,00 mg L<sup>-1</sup>. In Figura 40 è riportato il cromatogramma del grezzo ottenuto con le condizione precedentemente ottimizzate. Com'è possibile osservare dalla figura sotto riportata la fase mobile utilizzata non separa in modo adeguato gli analiti quando applicata al campione reale.

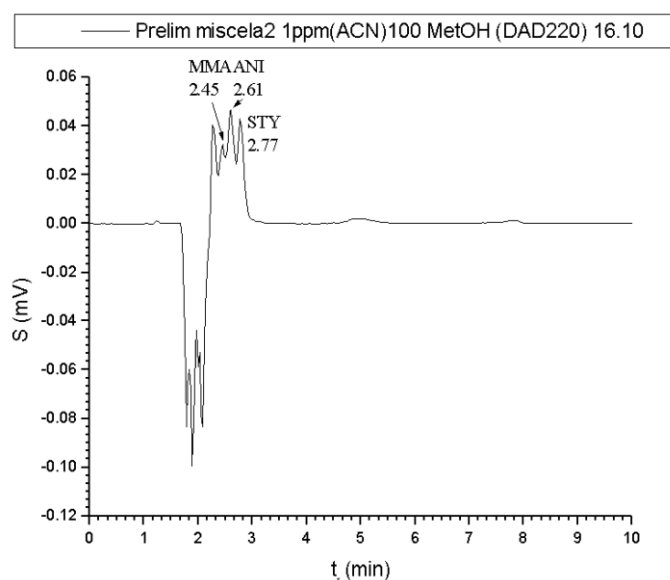


Figura 40: Cromatogramma del grezzo diluito in acetonitrile alla concentrazione di circa 1 mg/L. Fase mobile 100% MetOH. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra

un tempo di ritenzione di 2,45 minuti, quello dell'anisolo di 2,62 minuti, mentre quello dello stirene di 2,77 minuti.

E' quindi necessario utilizzare una fase mobile più polare. In Figura 41 si riporta l'analisi del grezzo ottenuto con la fase mobile così composta 80:20 (v/v) MetOH:H<sub>2</sub>O.

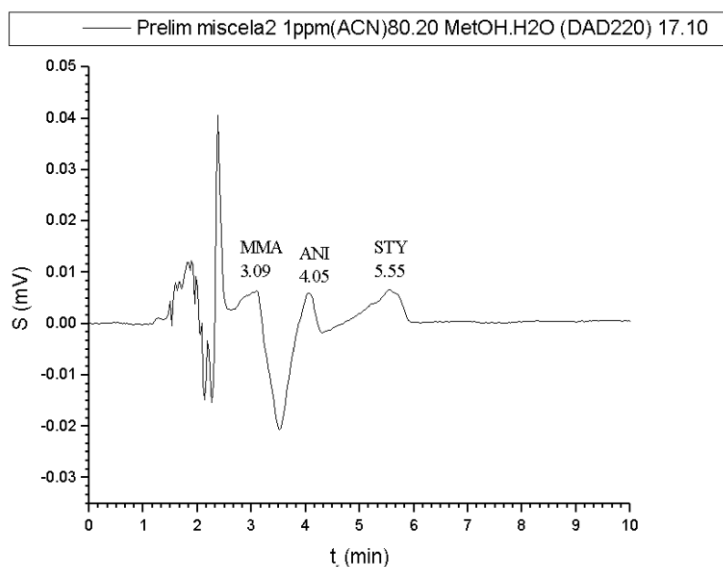


Figura 41: Cromatogramma del grezzo diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 80:20 (v/v) MetOH:H<sub>2</sub>O. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 3,09 minuti, quello dell'anisolo di 4,05 minuti, mentre quello dello stirene è di 5,55 minuti.

Come si può notare dal cromatogramma sopra riportato l'aggiunta del 20 % d'acqua ha permesso la completa separazione dei tre analiti, dimostrando come sia indispensabile il suo utilizzo. Essendo la forma dei picchi non soddisfacente, si è provato a sostituire il metanolo con l'acetonitrile con però l'accortezza di aumentare la percentuale di acqua fino al 30 % per compensare la diversa polarità dei due solventi. Il cromatogramma riportato in Figura 42 mostra come l'ultima variazione della fase mobile abbia portato alla completa separazione dei tre analiti permettendone anche l'integrazione. La miscela 70:30 (v/v) acetonitrile:acqua è stata quindi scelta come fase mobile del metodo cromatografico per l'identificazione degli analiti dal grezzo di reazione.

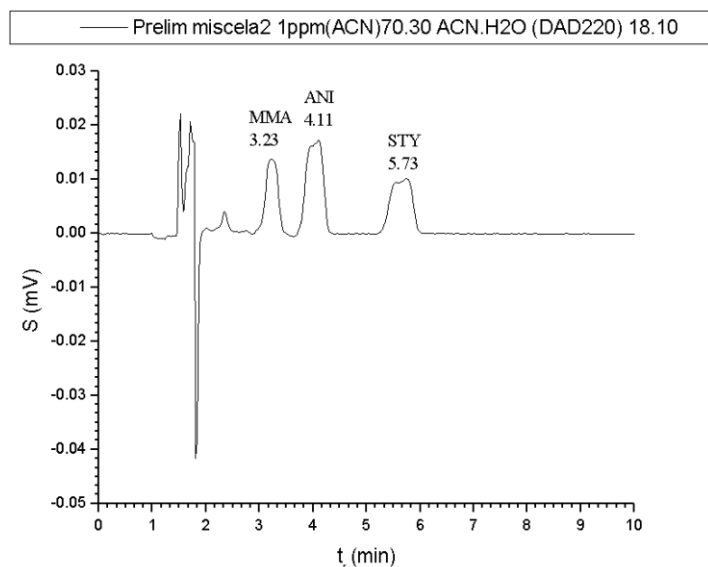


Figura 42: Cromatogramma del di grezzo diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 3,23 minuti, quello dell'anisolo di 4,11 minuti, mentre quello dello stirene è di 5,73 minuti.

A questo punto sono state modificate le impostazioni del rivelatori in modo da ottenere la massima sensibilità possibile. Il range di lunghezze d'onda del rivelatore DAD è stato modificato da 220-400nm a 200-300nm, visto che al di sopra dei 300 nm non ci sono adsorbimenti significativi da parte degli analiti. Il rivelatore UV invece è stato impostato in modo da registrare da 0 a 4.6min la lunghezza d'onda a 220nm, tempo necessario per l'eluizione dello stirene e del metil metacrilato, mentre da 4.6min fino a fine corsa la lunghezza d'onda a 247nm per la determinazione dell'anisolo. E' stata poi testata la sensibilità del metodo eseguendo un'analisi del grezzo ad una concentrazione di circa 0,20 mg L<sup>-1</sup>. Il cromatogramma di quest'ultima analisi, da cui si nota il netto miglioramento della sensibilità rispetto al cromatogramma in Figura 42, è riportata in Figura 43.

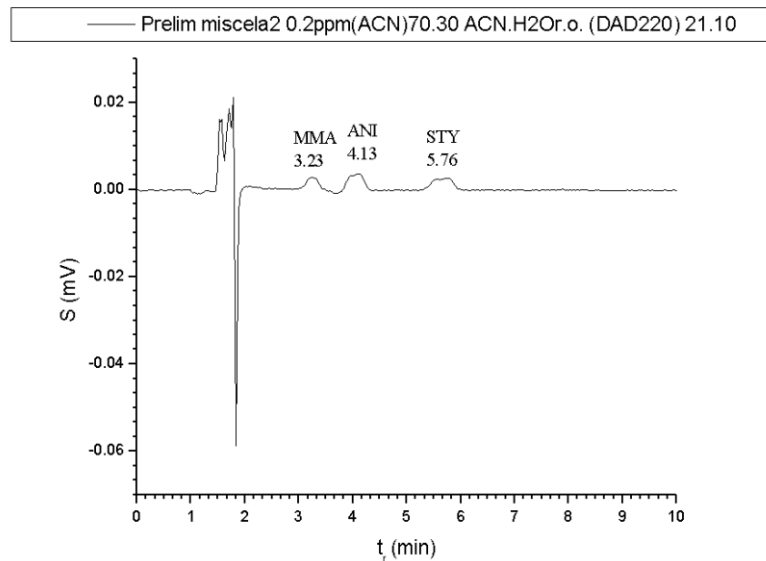


Figura 43: Cromatogramma del grezzo diluito in acetonitrile alla concentrazione di 0,20 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 3,23 minuti, quello dell'anisolo di 4,13 minuti, mentre quello dello stirene è di 5,76 minuti.

Dopo aver ottenuto le condizioni che permettessero un'adeguata separazione dei tre analiti, sono state effettuate delle analisi di alcuni campioni reali prelevati a tempi diversi durante la reazione di polimerizzazione. In Figura 44 si riporta il cromatogramma di un campione al tempo zero  $t_0$ , cioè nel momento in cui al grezzo è stato aggiunto l'iniziatore radicalico, alla concentrazione di  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ . I campioni successivi, prelevati a tempi diversi durante la reazione, contengono sempre più polimero che a causa dell'acqua presente nella fase mobile potrebbe precipitare in colonna. Si è quindi dovuto aggiungere al metodo uno step di lavaggio, che mediante un gradiente passa dalla fase in acetonitrile: acqua in 5 minuti al 100% in tetraidrofurano mantenuto per 5 min per poi tornare alle condizioni iniziali. Il tetraidrofurano risulta il miglior solvente per il polimero eventualmente presente in colonna.

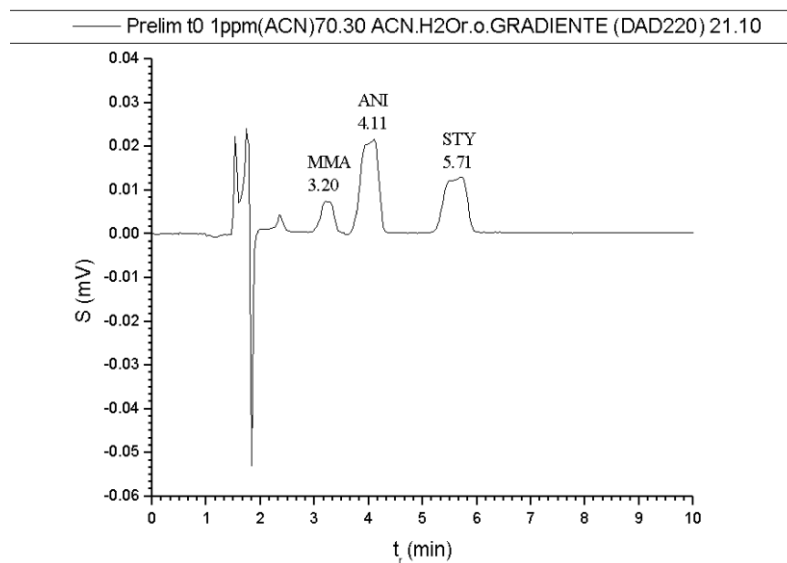


Figura 44 Cromatogramma del campione al tempo  $t_0$  di reazione diluito in ACN alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in tetraidrofurano e rivelatori ottimizzati. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 3,20 minuti, quello dell'anisolo di 4,11 minuti, mentre quello dello stirene è di 5,71 minuti.

Si nota però che le prestazioni della colonna non sono più soddisfacenti, infatti le forme dei picchi non è più a gaussiana, per tale motivo è stata sostituita la colonna con una avente le stesse caratteristiche della precedente. Come si può notare dalla Figura 45, in cui si riporta il cromatogramma ottenuto con le condizioni ottimizzate e con la nuova colonna cromatografica, si ottengono picchi ben separati non allargati e i tempi di ritenzione concordano con quelli ottenuti dalla precedente colonna.



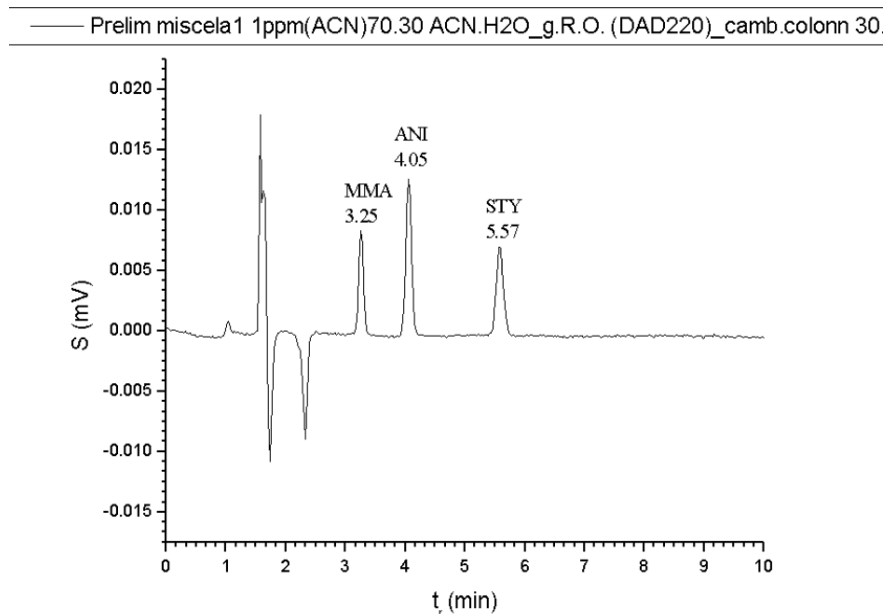


Figura 45: Cromatogramma del grezzo diluito in acetonitrile alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in tetraidrofurano e rivelatori ottimizzati. Nuova colonna. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD a 220nm. Il picco del metil metacrilato mostra un tempo di ritenzione di 3,25 minuti, quello dell'anisolo di 4,05 minuti, mentre quello dello stirene è di 5,57 minuti.

### 6.4.3 Pretrattamento dei campioni

E' stato necessario effettuare delle prove di solubilità per determinare il miglior pretrattamento dei campioni prelevati dal grezzo di reazione a tempi diversi. Dalle prove di solubilità è emerso che i campioni prelevati al tempo 0 e fino a tre ore potevano essere diluiti in acetonitrile, mentre per i prelievi a tempi successivi, a causa della sempre maggiore quantità di polimero, si è dovuto utilizzare il tetraidrofurano come solvente di diluizione, infatti l'utilizzo dell'acetonitrile portava alla immediata precipitazione del polimero presente in soluzione. Nonostante questa diluizione preliminare in tetraidrofurano fosse necessaria solo per i campioni a t0 e fino a t3h è stata applicata a tutti i campioni per rendere omogeneo il pretrattamento, e quindi rendere confrontabili i dati ottenuti.

Ogni aliquota prelevata dal grezzo, nel procedere della reazione, è stata pesata e diluita. Conoscendo le quantità dei tre analiti inizialmente presenti nel grezzo e il peso dell'aliquota prelevata è stato possibile diluire il campione in modo da raggiungere la concentrazione di circa 1,00 mg L<sup>-1</sup> (per il prelievo a tempo zero).

Questa diluizione è stata mantenuta nei campioni prelevati nelle ore successive finché è stata possibile la rilevazione degli analiti. Quindi al diminuire della concentrazione dei monomeri, dovuta alla formazione del polimero, si è anche diminuita la diluizione.

In fine quindi ogni campione verrà diluito 3 volte: la prima diluizione 1:100 in THF, la seconda in acetonitrile 1:100 e la terza sempre in acetonitrile e opportunatamente modificata a seconda del consumo dei monomeri durante la reazione di polimerizzazione.

## 6.5 Validazione del Metodo

E' stato sviluppato ed ottimizzato un metodo per la determinazione di stirene, metil metacrilato ed anisolo mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni con rilevatori UV e DAD. Per verificare l' idoneità del metodo appena ottimizzato si passerà alla validazione del metodo.

### 6.5.1 Calibrazione del metodo: costruzione delle rette di calibrazione

Il primo passo consiste nella costruzione delle rette di taratura per i tre analiti. Sono stati analizzati 5 livelli di concentrazione (0,20, 0,40, 0,60, 0,80 e 1,00 mg/L) ed ogni livello è stato replicato 8 volte, utilizzando ogni volta soluzioni appositamente preparate dalla soluzione madre. Sono state quindi effettuate otto repliche genuine per ogni livello di concentrazione. Le soluzioni standard sono state preparate a partire dalle soluzioni madre al 99% (v/v) di stirene, metilmetacrilato ed anisolo. Le analisi cromatografiche sono state condotte nelle condizioni precedentemente ottimizzate e descritte dettagliatamente nel capitolo Materiali e Metodi.

Le risposte analitiche misurate, in questo caso l' area del picco, ad ogni analisi sono riportate in Tabella 17, questi dati sono stati utilizzati per la costruzione delle rette di calibrazione mediante la regressione dei minimi quadrati.

		<b>Canale DAD: 247 nm</b>	<b>Canale UV-Vis: 247 nm</b>
Stirene	Concentrazioni (mg/L)	Area del picco (media delle otto misure)	Area del picco (media delle sette misure)
	1,00	$8,45 \times 10^4 \pm 0,31 \times 10^4$	$15,97 \times 10^4 \pm 0,41 \times 10^4$
	0,80	$6,65 \times 10^4 \pm 0,31 \times 10^4$	$12,47 \times 10^4 \pm 0,45 \times 10^4$
	0,60	$5,07 \times 10^4 \pm 0,13 \times 10^4$	$9,60 \times 10^4 \pm 0,17 \times 10^4$
	0,40	$3,39 \times 10^4 \pm 0,13 \times 10^4$	$6,38 \times 10^4 \pm 0,20 \times 10^4$
	0,20	$16,66 \times 10^3 \pm 0,61 \times 10^3$	$3,10 \times 10^4 \pm 0,10 \times 10^4$
		<b>Canale DAD: 220 nm</b>	<b>Canale UV-Vis: 220 nm</b>
Metilmetacr	Concentrazioni (mg/L)	Area del picco (media delle otto misure)	Area del picco (media delle otto misure)
	1,00	$2,52 \times 10^4 \pm 0,12 \times 10^4$	$5,07 \times 10^4 \pm 0,40 \times 10^4$
	0,80	$2,03 \times 10^4 \pm 0,10 \times 10^4$	$4,05 \times 10^4 \pm 0,17 \times 10^4$

	0,60	$15,26 \times 10^3 \pm 0,89 \times 10^3$	$3,09 \times 10^4 \pm 0,11 \times 10^4$
	0,40	$10,24 \times 10^3 \pm 0,43 \times 10^3$	$1,99 \times 10^4 \pm 0,19 \times 10^4$
	0,20	$5,08 \times 10^3 \pm 0,30 \times 10^3$	$10,34 \times 10^3 \pm 0,37 \times 10^3$
		<b>Canale DAD: 205 nm</b>	<b>Canale UV-Vis: 220 nm</b>
Anisolo	Concentrazioni (mg/L)	Area del picco (media delle otto misure)	Area del picco (media delle otto misure)
	1,00	$3,54 \times 10^4 \pm 0,19 \times 10^4$	$7,69 \times 10^4 \pm 0,33 \times 10^4$
	0,80	$2,83 \times 10^4 \pm 0,22 \times 10^4$	$6,01 \times 10^4 \pm 0,29 \times 10^4$
	0,60	$2,19 \times 10^4 \pm 0,12 \times 10^4$	$4,71 \times 10^4 \pm 0,13 \times 10^4$
	0,40	$14,55 \times 10^3 \pm 0,91 \times 10^3$	$3,22 \times 10^4 \pm 0,32 \times 10^4$
	0,20	$7,30 \times 10^3 \pm 0,64 \times 10^3$	$15,80 \times 10^3 \pm 0,37 \times 10^3$

Tabella 17: Area dei picchi media relativa alle analisi degli standard utilizzati per costruire le rette di taratura

### 6.5.2 Calibrazione del metodo: calcolo della deviazione standard sulla pendenza e sull'intercetta delle rette di calibrazione. Test di significatività sull'intercetta

La retta di taratura ci permette di ricavare la concentrazione degli analiti in campioni di concentrazione non nota e quindi di stimare i limiti di determinazione del metodo analitico. Risulta quindi importante il calcolo della deviazione standard della pendenza e dell'intercetta e il test di significatività di quest'ultima. I risultati dei calcoli e dei test sopra menzionati sono riportati in Tabella 18.

	Pendenza (b)	$S_b$	Intercetta (a)	$S_a$		$t_{\text{calcolato}}$	$t_{\text{tabulato}}$	$H_0$
STY	DAD	84111	851	30,5	564,3	0,12086	2,77645	Accettata
	UV-Vis	159099	2460	419,49	1632,06	0,57474		Accettata
MMA	DAD	25191	105	112,25	69,63	3,60451		Rifiutata
	UV-Vis	50684	581	51,41	385,38	0,2983		Accettata
ANI	DAD	35009	492	496,75	326,40	3,40305		Rifiutata
	UV-Vis	75060	1709	1375,5	1133,4	2,71368		Accettata

Tabella 18: pendenza, deviazione standard sulla pendenza ( $S_b$ ), intercetta, deviazione standard sull'intercetta ( $S_a$ ), valore di  $t$  calcolato, valore di  $t$  tabulato e accettazione o rifiuto dell'ipotesi nulla  $H_0$  per tutte le rette di taratura calcolate.

Osservando la Tabella 18 si può notare come l'ipotesi nulla  $H_0$  sia stata rifiutata solo per le rette di calibrazione del metil metacrilato e dell'anisolo. Quindi solo queste due rette, ottenute mediante detector DAD, manterranno la forma  $y = (b \pm S_b) x + (a \pm S_a)$ , mentre le altre rette passando per l'origine avranno la forma  $y = (b \pm S_b) x$ .

### 6.5.3 Analisi della varianza (ANOVA)

Di seguito si riportano le tabelle ANOVA per ciascun analita.

Le ipotesi formulate sono le seguenti:

- $F$ ,  $MS_{REG} / MS_R$ , che il modello non sia significativo;
- $F$ ,  $MS_{LOF} / MS_{PE}$ , che la linearità di risposta sia confermata in presenza di misure replicate.

Nelle tabelle sono riportate: la sorgente “source”, i gradi di libertà “df”, la somma dei quadrati “SS”, il valore medio dei quadrati “MS”, ed infine il valore per eseguire il test  $F$ .

Nelle tabelle Tabella 19, Tabella 20, Tabella 21, Tabella 22, Tabella 23 e Tabella 24 sono riportate le tabelle ANOVA dei tre analiti, stirene, metil metacrilato e anisolo, ottenute dai dati ricavati da entrambi i rivelatori.

Source	df	MS		F	F(0.05,v1,v2)	Ipotesi
Regression	1	MSreg	22616849003	5105,229	4,09817166	Rifiutata
Residual	38	MSr	4430134,211			
Lack of fit	3	MSlof	2318187,5	0,502734	2,87418749	Accettata
Withing-group	35	MSpe	4611158,214			
Total	39					

Tabella 19: tabella ANOVA calcolata per lo STY, dati ricavati dal rivelatore DAD.

Source	df	MS		F	F(0.05,v1,v2)	Ipotesi
Regression	1	MSreg	70366471382	7248,247	4,13925245	Rifiutata
Residual	33	MSr	9708067,57			
Lack of fit	3	MSlof	17323614,31	1,936354	2,92227719	Accettata
Withing-group	30	MSpe	8946512,895			
Total	34					

Tabella 20 tabella ANOVA calcolata per lo STY, dati ricavati dal rivelatore UV-Visibile.

Source	df	MS		F	F(0.05,v1,v2)	Ipotesi
Regression	1	MSreg	2030676740	3115,617	4,09817166	Rifiutata
Residual	38	MSr	651773,5816			
Lack of fit	3	MSlof	35265,36667	0,050049	2,87418749	Accettata
Withing-group	35	MSpe	704617,1429			
Total	39					

Tabella 21: tabella ANOVA calcolata per il MMA, dati ricavati dal rivelatore DAD.

Source	df	MS		F	F(0.05,v1,v2)	Ipotesi
Regression	1	MSreg	8243427374	1839,672	4,09817166	Rifiutata

Residual	38	MSr	4480922,553			
Lack of fit	3	MSlof	1086567,625	0,227703	2,87418749	Accettata
Withing-group	35	MSpe	4771867,261			
Total	39					

Tabella 22: tabella ANOVA calcolata per il MMA, dati ricavati dal rivelatore UV-Visibile.

Source	df	MS		F	F(0.05,v1,v2)	Ipotesi
Regression	1	MSreg	3922016260	1827,029	4,09817166	Rifiutata
Residual	38	MSr	2146663,055			
Lack of fit	3	MSlof	774832,0333	0,342203	2,87418749	Accettata
Withing-group	35	MSpe	2264248,571			
Total	39					

Tabella 23: tabella ANOVA calcolata per l'ANI, dati ricavati dal rivelatore DAD.

Source	df	MS		F	F(0.05,v1,v2)	Ipotesi
Regression	1	MSreg	18943287524	2765,96	4,09817166	Rifiutata
Residual	38	MSr	6848720,263			
Lack of fit	3	MSlof	13929491,5	2,231648	2,87418749	Accettata
Withing-group	35	MSpe	6241797,014			
Total	39					

Tabella 24: tabella ANOVA calcolata per l'ANI, dati ricavati dal rivelatore UV-Visibile.

Osservando le tabelle sopra riportate è possibile notare come il valore  $MS_{REG} / MS_R$ , ovvero il rapporto tra la varianza spiegata dal modello rispetto a quella non spiegata dal modello, sia un numero intero e positivo per tutti gli analiti, ciò indica che nel rapporto il fattore preponderante è sempre il numeratore, ovvero la varianza spiegata dal modello. Confrontando il valore calcolato di  $F (MS_{REG} / MS_R)$  con il valore tabulato per un livello di significatività del 95% e per  $(df_{numeratore}, df_{denominatore})$  gradi di libertà, si può notare come per ogni analisi effettuata si abbia  $F_{cal} > F_{tab}$ , quindi tutti i modelli risultano significativi, avendo rifiutato l'ipotesi  $H_0$  di non adeguatezza del modello.

Il secondo test  $F (MS_{LOF} / MS_{PE})$  rappresenta il rapporto tra la varianza fra i gruppi e la varianza all'interno dei gruppi, paragonando il valore tabulato di  $F$  con quello tabulato ad un livello di significatività del 95% e per  $(df_{numaeratore}, df_{denominatore})$  gradi di libertà è possibile notare come tutti gli  $F$  calcolati siano sempre minori di quelli tabulati. In questo caso l'ipotesi  $H_0$ , che era la conferma della linearità, è stata accettata ed è quindi confermata la linearità di risposta in presenza di misure replicate.

Tutti i modelli risultano quindi adeguati per descrivere la relazione tra le variabili  $x$  e  $y$ .

Di seguito si riportano le rette di taratura calcolate dai dati ottenuti in seguito all'intero processo di calibrazione appena descritto.

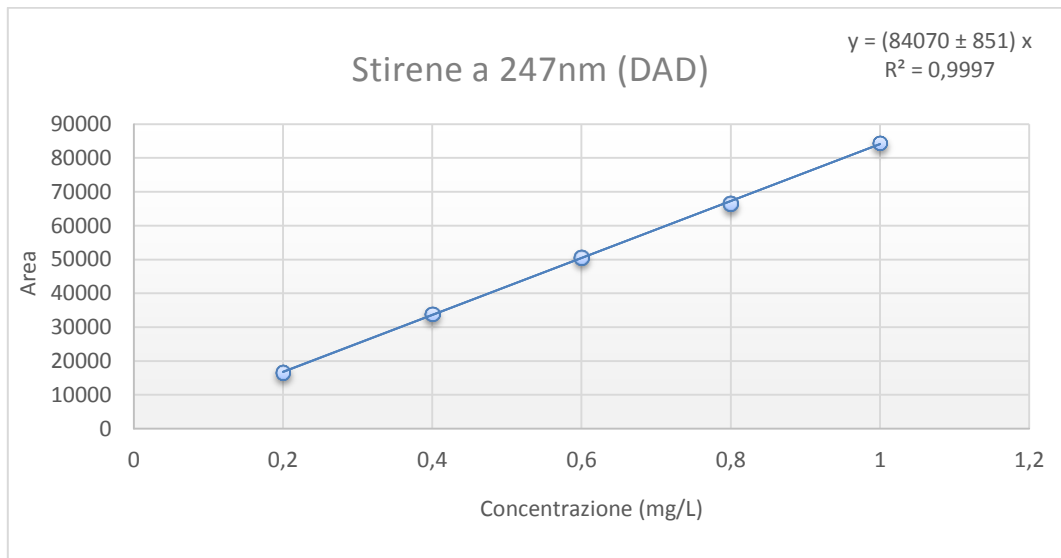


Figura 46: Retta di taratura dello STY analizzato mediante rivelatore DAD (lettura a 247 nm).

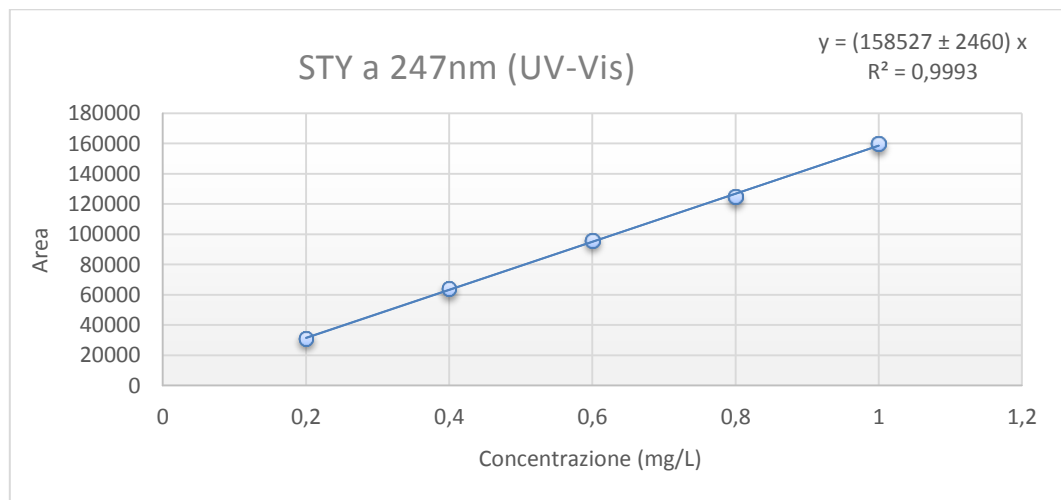


Figura 47: Retta di taratura dello STY analizzato mediante rivelatore UV-Visibile impostato a 247 nm.

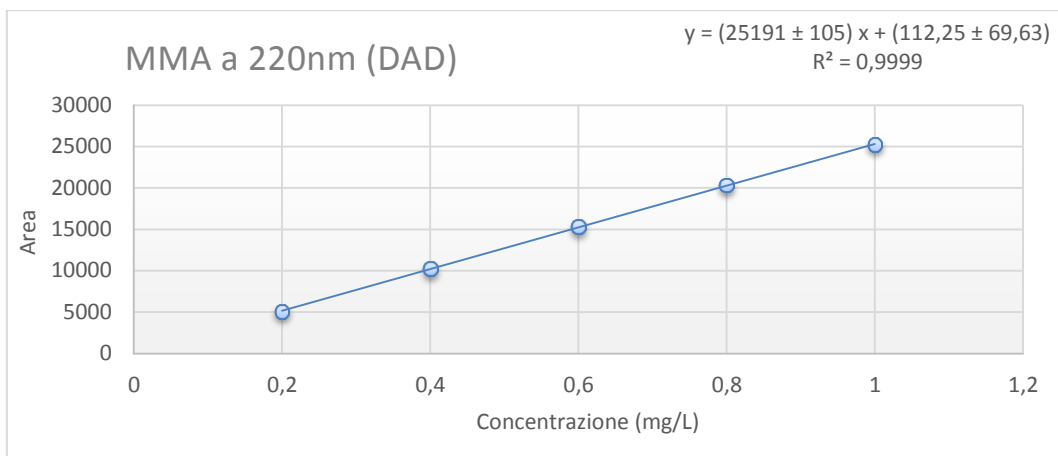


Figura 48: Retta di taratura del MMA analizzato mediante rivelatore DAD (lettura a 220 nm).

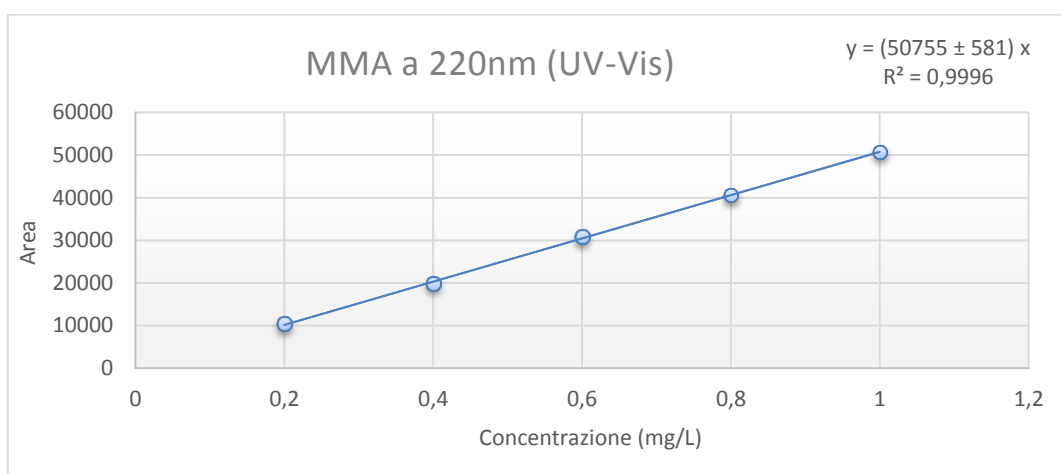


Figura 49: Retta di taratura del MMA analizzato mediante rivelatore UV-Visibile impostato a 220 nm.

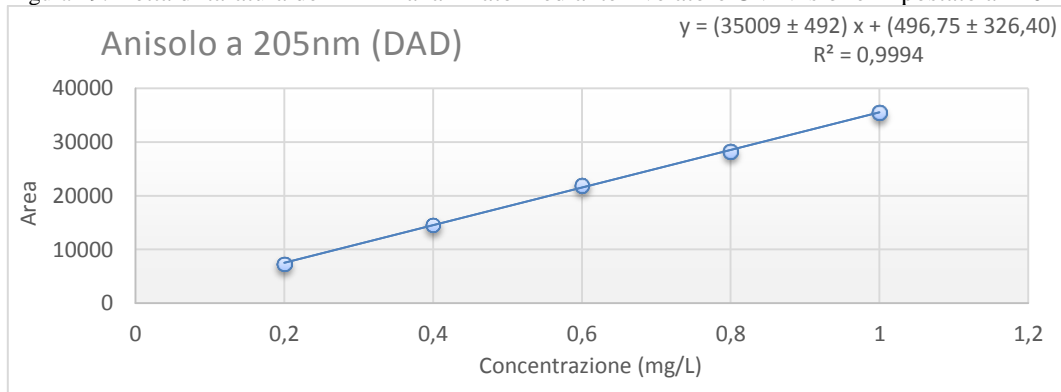


Figura 50: Retta di taratura dell'ANI analizzato mediante rivelatore DAD (lettura a 205 nm).



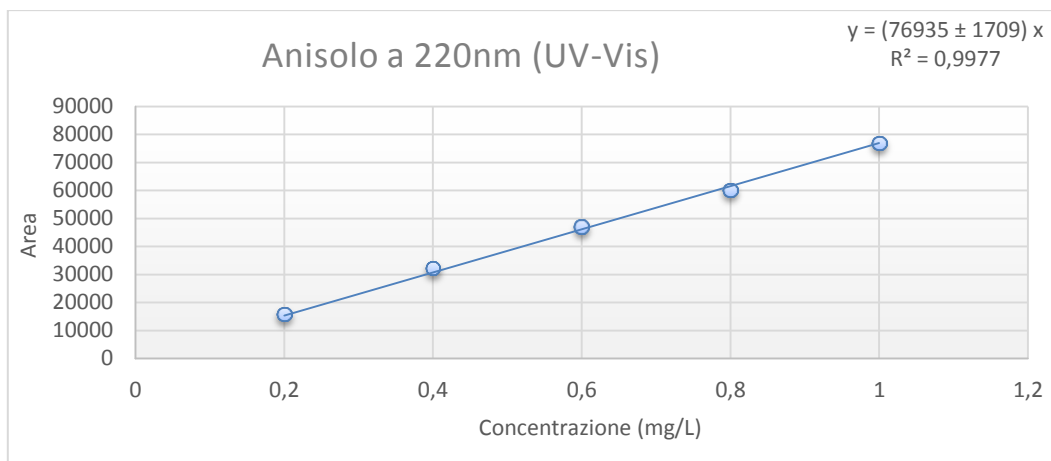


Figura 51: Retta di taratura dell'ANI analizzato mediante rivelatore UV-Visibile impostato a 220 nm.

#### 6.5.4 Calcolo dei limiti di rivelabilità (LOD) e dei limiti di quantificazione (LOQ)

In Tabella 25 si riportano i limiti di rilevabilità e di quantificazione per i tre analiti:

		<b>LOD (mg/L)</b>	<b>LOQ (mg/L)</b>
<b>STY</b>	DAD 247 nm	0,02	0,07
	UV-Vis 247 nm	0,03	0,10
<b>MMA</b>	DAD 220 nm	0,01	0,03
	UV-Vis 220 nm	0,02	0,08
<b>ANI</b>	DAD 205 nm	0,03	0,09
	UV-Vis 220 nm	0,05	0,18

Tabella 25: Coefficienti LOD ed LOQ per ciascun analita.

Osservando i limiti di quantificazione per i tre analiti risulta giustificata la scelta di 0,20 mg L<sup>-1</sup> come limite inferiore di concentrazione per la costruzione delle rette di calibrazione.

#### 6.5.5 Precisione e specificità

Per verificare la precisione del metodo analitico appena sviluppato sono state valutate la ripetibilità conducendo quattro analisi cromatografiche replicate nello stesso giorno alle concentrazioni: 1,00, 0,80, 0,60, 0,40 e 0,20 mgL<sup>-1</sup>, e la riproducibilità replicando le analisi in giorni diversi sempre nello stesso range di concentrazione. In Tabella 26 e

Tabella 27 si riportano le deviazioni standard percentuali sia per i tempi di ritenzione che per le aree dei picchi cromatografici delle analisi inter e intra-day per i tre analiti.

	<b>STY dev.st.%</b>			
	<b>Tempo ritenzione</b>		<b>Aree</b>	
	UV-Vis	DAD	UV-Vis	DAD
<b>1,00 mg/L</b>	0,98	0,27	2,30	2,41
<b>0,80 mg/L</b>	0,22	0,27	1,99	1,79
<b>0,60 mg/L</b>	0,39	0,52	1,04	2,70
<b>0,40 mg/L</b>	0	0	4,48	2,39
<b>0,20 mg/L</b>	0,29	0,18	2,69	3,54
	<b>MMA dev.st.%</b>			
	<b>Tempo ritenzione</b>		<b>Aree</b>	
	UV-Vis	DAD	UV-Vis	DAD
<b>1,00 mg/L</b>	0,15	0,46	5,30	0,75
<b>0,80 mg/L</b>	0,15	0,47	1,55	4,11
<b>0,60 mg/L</b>	0,52	0,64	3,63	4,07
<b>0,40 mg/L</b>	0,15	0,54	8,39	4,40
<b>0,20 mg/L</b>	0,15	0	3,62	8,27
	<b>ANI dev.st.%</b>			
	<b>Tempo ritenzione</b>		<b>Aree</b>	
	UV-Vis	DAD	UV-Vis	DAD
<b>1,00 mg/L</b>	0,24	0	2,30	2,62
<b>0,80 mg/L</b>	0,24	0,43	3,60	4,14
<b>0,60 mg/L</b>	0,39	0,61	2,11	3,11
<b>0,40 mg/L</b>	0,12	0	3,76	2,69
<b>0,20 mg/L</b>	0,14	0,38	0,84	4,64

Tabella 26: Determinazione della ripetibilità intra-day: deviazione standard % dei tempi di ritenzione e delle aree dei picchi cromatografici delle quattro analisi, condotte lo stesso giorno, delle soluzioni standard STY, MMA e ANI diluite alle concentrazioni 1,00, 0,80, 0,60, 0,40 e 0,20 mg/L.

<b>STY dev.st.%</b>				
<b>Tempo ritenzione</b>			<b>Aree</b>	
	UV-Vis	DAD	UV-Vis	DAD
<b>1,00 mg/L</b>	1,22	0,60	0,89	2,13
<b>0,80 mg/L</b>	0,18	0,18	1,87	3,08
<b>0,60 mg/L</b>	0,27	0,43	1,71	1,72
<b>0,40 mg/L</b>	0,54	0,63	0,91	3,02
<b>0,20 mg/L</b>	0,10	0	4,55	3,89
<b>MMA dev.st.%</b>				
<b>Tempo ritenzione</b>			<b>Aree</b>	
	UV-Vis	DAD	UV-Vis	DAD
<b>1,00 mg/L</b>	0,39	0,47	6,79	1,17
<b>0,80 mg/L</b>	0,25	0	3,06	1,84
<b>0,60 mg/L</b>	0,17	0,47	1,54	2,85
<b>0,40 mg/L</b>	0,25	0,54	5,74	1,11
<b>0,20 mg/L</b>	0,15	0	4,20	1,85
<b>ANI dev.st.%</b>				
<b>Tempo ritenzione</b>			<b>Aree</b>	
	UV-Vis	DAD	UV-Vis	DAD
<b>1,00 mg/L</b>	0,31	0,43	2,94	4,25
<b>0,80 mg/L</b>	0,34	0,38	3,92	3,92
<b>0,60 mg/L</b>	0,23	0,38	2,78	4,32
<b>0,40 mg/L</b>	0,42	0,29	3,00	7,13
<b>0,20 mg/L</b>	0,14	0	3,50	8,37

Tabella 27: Determinazione della riproducibilità inter-day: deviazione standard % dei tempi di ritenzione e delle aree dei picchi cromatografici delle quattro analisi, condotte in giorni diversi, delle soluzioni standard STY, MMA e ANI diluite alle concentrazioni 1,00, 0,80, 0,60, 0,40 e 0,20 mg/L.

Come si può osservare dalle tabelle Tabella 26 e Tabella 27 il valore soglia di accettabilità per le analisi HPLC delle deviazioni standard del 10 % non è stato superato. Si può quindi affermare che il metodo ottimizzato risulta ripetibile e riproducibile e quindi preciso.

Osservando le figure sotto riportate in cui vengono riportati i cromatogrammi del grezzo di reazione al tempo t0 e al t22h è possibile notare come in entrambi i casi i picchi dei tre analiti siano bene separati alla linea di base tra di loro e dagli interferenti presenti in soluzione (DMSO, HEBIB, CuBr<sub>2</sub>, Me<sub>6</sub>TREN e, quando presente, il copolimero P(S-r-MMA)). Quindi il metodo possiede un'adeguata specificità sia in presenza che in assenza del polimero.

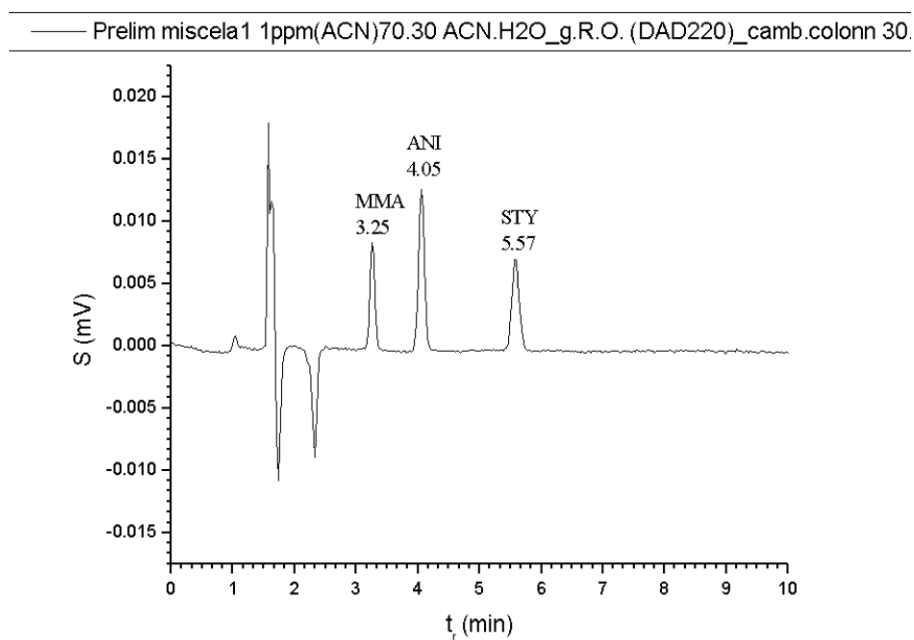


Figura 52: Cromatogramma del campione di grezzo diluito in ACN alla concentrazione di 1,00 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD (220nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,25 minuti, quello dell'ANI di 4,05 minuti, mentre quello dello STY è di 5,57 minuti.

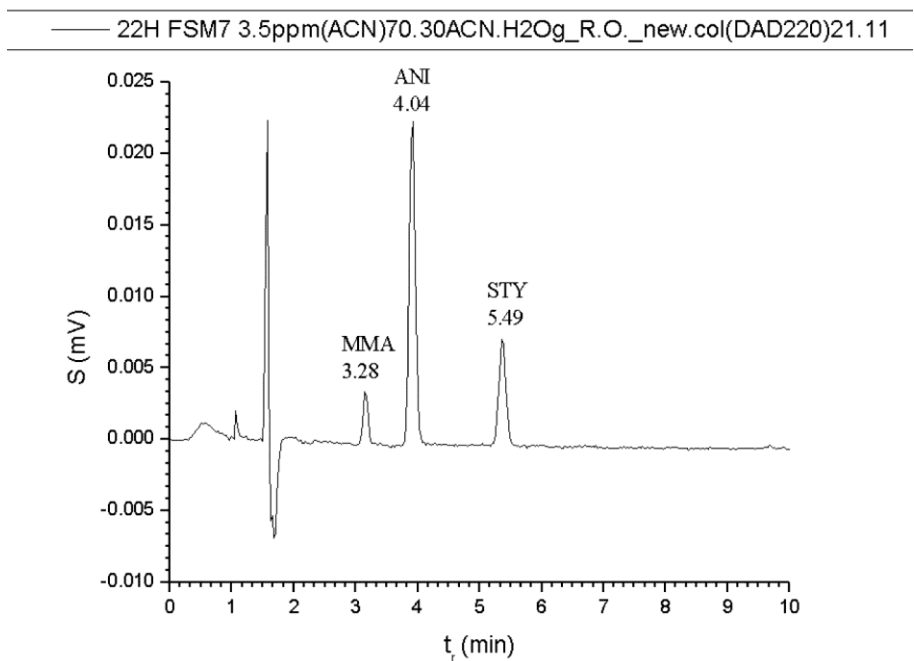


Figura 53: Cromatogramma del campione 22hFSM7 diluito in ACN alla concentrazione di 3,50 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD (220nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,28 minuti, quello dell'ANI di 4,04 minuti, mentre quello dello STY è di 5,49 minuti.

### 6.5.6 Valutazione dell'effetto matrice

Per valutare la presenza assenza dell'effetto matrice sono stati scelti due campioni un tempo  $t_0$ , in cui era stato appena aggiunto l'iniziatore radicalico, e un tempo  $t_4h$ . I due campioni sono stati diluiti ed analizzati secondo le procedure già descritte in precedenza, ed in seguito ad entrambi sono state aggiunte quantità note dei tre analiti (STY, MMA e ANI): 0,50, 0,80, 1,00 mg/L e rianalizzati. Dai risultati ottenuti sono state ricavate le rette riportate in figura 30 e 31.

	<b>t0FSM16</b>			
	<b>DAD</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>UV-Vis</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>STY</b>	$y = 82729x + 28999$	0,9991	$y = 157805x + 54864$	0,9992
<b>MMA</b>	$y = 24851x + 3128,8$	0,9962	$y = 49533x + 6634,7$	0,9971
<b>ANI</b>	$y = 34715x + 11269$	0,9996	$y = 76623x + 24110$	0,9977

Tabella 28: equazioni e coefficienti  $R^2$  delle rette per l'effetto matrice calcolate dopo le aggiunte dei tre analiti. Analisi svolte sul campione t0FSM16.

	<b>4hFSM17</b>			
	<b>DAD</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>UV-Vis</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>STY</b>	$y = 84598x + 27571$	0,9983	$y = 164379x + 52359$	0,9985
<b>MMA</b>	$y = 26931x + 2759,9$	0,9877	$y = 53840x + 5848,2$	0,9909
<b>ANI</b>	$y = 35119x + 15758$	0,9978	$y = 76544x + 33989$	0,9998

Tabella 29: equazioni e coefficienti  $R^2$  delle rette per l'effetto matrice calcolate dopo le aggiunte dei tre analiti. Analisi svolte sul campione 4hFSM17.

Anche in questo caso sono state calcolate le deviazioni standard della pendenza e dell'intercetta e la significatività di quest'ultima. Le analisi sono state replicate tre volte. I risultati dei test sono riportati in tabella Tabella 30 e Tabella 31.

#### Campione: t0FSM16

		<b>Pendenza</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>Intercetta</b>	<b>S<sub>a</sub></b>	<b>t<sub>calcolato</sub></b>	<b>t<sub>tabulato</sub></b>	<b>H<sub>0</sub></b>
		<b>(b)</b>		<b>(a)</b>				
<b>STY</b>	<b>DAD</b>	82729	1773,78	28999	1219,27	47,5676		Rifiutata
	<b>UV-</b>	157805	3085,72	54864	2121,08	51,7321		Rifiutata

	Vis						3,18245	
<b>MMA</b>	DAD	24851	1085,46	3128,8	746,132	8,38672	3,18245	Rifiutata
	UV- Vis	49533	1881,42	6634,7	1293,26	10,2604		Rifiutata
<b>ANI</b>	DAD	34715	506,005	11269	347,821	64,7977		Rifiutata
	UV- Vis	76623	2605,09	24110	1790,7	26,928		Rifiutata

Tabella 30: pendenza, deviazione standard sulla pendenza ( $S_b$ ), intercetta, deviazione standard sull'intercetta ( $S_a$ ), valore di t calcolato, valore di t tabulato e accettazione o rifiuto dell'ipotesi nulla  $H_0$  per tutte le rette dell'effetto matrice ricavate dall'analisi del campione t0FSM16 in seguito alle aggiunte degli analiti.

### Campione: 4hFSM17

		<b>Pendenza (b)</b>	<b><math>S_b</math></b>	<b>Intercetta (a)</b>	<b><math>S_a</math></b>	<b><math>t_{\text{calcolato}}</math></b>	<b><math>t_{\text{tabulato}}</math></b>	<b><math>H_0</math></b>
<b>STY</b>	DAD	84598	2463,84	27571	1693,61	32,5589	3,18245	Rifiutata
	UV- Vis	164379	4555,06	52359	3131,09	33,4446		Rifiutata
<b>MMA</b>	DAD	26931	2129,22	2759,9	1463,6	3,77139		Rifiutata
	UV- Vis	53840	3646,28	5848,2	2506,41	4,6666		Rifiutata
<b>ANI</b>	DAD	35119	1171,6	15758	805,345	39,1335		Rifiutata
	UV- Vis	76544	840,15	33989	577,507	117,709		Rifiutata

Tabella 31 pendenza, deviazione standard sulla pendenza ( $S_b$ ), intercetta, deviazione standard sull'intercetta ( $S_a$ ), valore di t calcolato, valore di t tabulato e accettazione o rifiuto dell'ipotesi nulla  $H_0$  per tutte le rette dell'effetto matrice ricavate dall'analisi del campione 4hFSM17 in seguito alle aggiunte degli analiti.

Come è possibile notare dalle tabelle Tabella 30 e Tabella 31 per tutte le rette dell'effetto matrice l'ipotesi che l'intercetta passi per l'origine degli assi (lo zero) è stata rifiutata, pertanto le equazioni andranno riscritte nella forma  $y = (b \pm S_b) x + (a \pm S_a)$ , riportate in tabella Tabella 32 e Tabella 33:

<b>t0FSM16</b>		
		<b>Equazioni rette effetto matrice</b>
<b>STY</b>	<b>DAD</b>	$y = (84598 \pm 1773,78)x + (27571 \pm 1219,27)$

	<b>UV-Vis</b>	$y = (157805 \pm 3085,72)x + (54864 \pm 2121,08)$
<b>MMA</b>	<b>DAD</b>	$y = (24851 \pm 1085,46)x + (3128,8 \pm 746,132)$
	<b>UV-Vis</b>	$y = (49533 \pm 1881,42)x + (6634,7 \pm 1293,26)$
<b>ANI</b>	<b>DAD</b>	$y = (34715 \pm 506,005)x + (11269 \pm 347,821)$
	<b>UV-Vis</b>	$y = (76623 \pm 2605,09)x + (24110 \pm 1790,7)$

Tabella 32 equazioni delle rette per l'effetto matrice ricavate dall'analisi del campione t0FSM16 dopo le aggiunte degli analiti. Dati ricavati sia dal rivelatore DAD, sia da quello UV-Visibile.

<b>4hFSM17</b>		
<b>Equazioni rette effetto matrice</b>		
<b>STY</b>	<b>DAD</b>	$y = (84598 \pm 2463,84)x + (27571 \pm 1693,61)$
	<b>UV-Vis</b>	$y = (164379 \pm 4555,06)x + (52359 \pm 3131,09)$
<b>MMA</b>	<b>DAD</b>	$y = (26931 \pm 2129,22)x + (2759,9 \pm 1463,6)$
	<b>UV-Vis</b>	$y = (53840 \pm 3646,28)x + (5848,2 \pm 2506,41)$
<b>ANI</b>	<b>DAD</b>	$y = (35119 \pm 1171,6)x + (15758 \pm 805,345)$
	<b>UV-Vis</b>	$y = (76544 \pm 840,15)x + (33989 \pm 577,507)$

Tabella 33 equazioni delle rette per l'effetto matrice ricavate dall'analisi del campione 4hFSM17 dopo le aggiunte degli analiti. Dati ricavati sia dal rivelatore DAD, sia da quello UV-Visibile.

A questo punto per valutare l'effetto matrice si confronteranno le rette appena calcolate con le rette di taratura, effettuando un test di parallelismo. I risultati del test di parallelismo sono riportati in tabella Tabella 34 e Tabella 35.

#### **Campione: t0FSM16 confrontato con le rette di taratura dei tre analiti**

		$S^2_{(b_1-b_1)}$	$es_{(b_1-b_2)}$	$t_{calcolato}$	$t_{tabulato}$	$H_0$
<b>STY</b>	DAD	3785079,5	1305,0999	1,0275075	2,5705818	Accettata
	UV-Vis	15540946	2644,5086	0,2730186		Accettata
<b>MMA</b>	DAD	1151209,6	719,75296	0,4723843		Accettata
	UV-Vis	3772037,6	1302,8495	0,9379441		Accettata
<b>ANI</b>	DAD	495401,71	472,15545	0,6226763		Accettata
	UV-Vis	11018615	2226,7413	0,1401151		Accettata

Tabella 34 nella tabella sono riportati il valore  $S^2_{(b_1-b_1)}$ , l'errore standard della differenza tra i due coefficienti angolari  $b_1$  e  $b_2$  ( $es_{(b_1-b_2)}$ ), il valore di t calcolato, il valore di t tabulato e l'accettazione o il rifiuto

dell'ipotesi nulla  $H_0$  per tutte le rette dell'effetto matrice ricavate dall'analisi del campione t0FSM16 in seguito alle aggiunte degli analiti e paragonate con le rette di taratura di STY, MMA e ANI.

### Campione: 4hFSM17 confrontato con le rette di taratura dei tre analiti

		$S^2_{(b_1-b_1)}$	$es_{(b_1-b_2)}$	$t_{calcolato}$	$t_{tabulato}$	$H_0$
<b>STY</b>	DAD	6614221	1725,2245	-0,306047	2,5705818	Accettata
	UV-Vis	26403007	3446,9339	-1,697741		Accettata
<b>MMA</b>	DAD	4397525,4	1406,729	-1,236912		Accettata
	UV-Vis	13210624	2438,1921	-1,265282		Accettata
<b>ANI</b>	DAD	1575728,3	842,06754	-0,130631		Accettata
	UV-Vis	5135593	1520,2029	0,2572025		Accettata

Tabella 35 nella tabella sono riportati il valore  $S^2_{(b_1-b_1)}$ , l'errore standard della differenza tra i due coefficienti angolari  $b_1$  e  $b_2$  ( $es_{(b_1-b_2)}$ ), il valore di  $t$  calcolato, il valore di  $t$  tabulato e l'accettazione o il rifiuto dell'ipotesi nulla  $H_0$  per tutte le rette dell'effetto matrice ricavate dall'analisi del campione 4hFSM17 in seguito alle aggiunte degli analiti e paragonate con le rette di taratura di STY, MMA e ANI.

In tutti i casi  $|t_{calcolato}| < t_{tabulato}$  accettando quindi l'ipotesi nulla, secondo la quale tutte le rette dell'effetto matrice sono parallele alle loro corrispettive rette di taratura. Quindi per entrambi i campioni presi in esame (t0FSM16 e 4hFSM17) non c'è effetto matrice. Si è scelto di fare questo test sia sul campione al tempo zero di polimerizzazione sia su quello dopo quattro ore di reazione perché si è voluto verificare se la presenza del polimero nel campione 4hFSM17 inducesse l'effetto matrice. I calcoli appena effettuati hanno smentito questo dubbio.

Dal momento che i campioni analizzati sono rappresentativi di tutti i tipi di campioni utilizzati è possibile generalizzare dicendo che per tutti i campioni reali studiati non c'è effetto matrice.

#### 6.5.7 Determinazione della stabilità dei campioni

Al fine di permettere che questo lavoro possa essere riprodotto anche da altri analisti in laboratori diversi è necessario, oltre al processo di validazione del metodo, verificare la stabilità dei campioni reali. In particolare, risulta importante cercare di capire quanto i campioni siano stabili nel tempo, se subiscano degradazione e conseguentemente stabilire il miglior metodo di conservazione.



La verifica di stabilità, così come lo studio dell'effetto matrice, è stata condotta su campioni al tempo zero di polimerizzazione (t0FSM8 e t0FSM16) e su campioni prelevati dopo quattro ore di reazione (4hFSM8 e 4hFSM17), al fine di osservare se la presenza del polimero influenzasse il risultato.

La verifica a lungo termine di conservazione è avvenuta rianalizzando i campioni dopo sei mesi dalla prima analisi effettuata, mentre quella a breve termine dopo un mese di conservazione. Un'aliquota, di tutti i campioni, è stata conservata a temperatura ambiente, mentre un'altra a 4°C (in frigorifero).

Le tabelle seguenti riportano: la variazione percentuale di area subita e la deviazione standard percentuale che gli analiti possiedono.

t0FSM8						
	Variazione % di area dopo 6 mesi, T ambiente		Variazione % di area dopo 6 mesi, 4°C		Dev. st. % degli analiti	
	DAD	UV-Vis	DAD	UV	DAD	UV-Vis
STY	-5,1282	-2,0124	-10,667	-10,115	0,61073	0,94263
MMA	1,20482	6,87583	-2,8112	-7,1498	3,46997	9,13412
ANI	-1,5262	-2,9645	0,5814	-1,6881	1,18948	3,26486

Tabella 36: variazione percentuale delle aree dei picchi cromatografici del campione t0FSM8 registrata tra la prima e la seconda analisi ripetuta dopo sei mesi (campione conservato a temperatura ambiente o in frigorifero); deviazione standard percentuale degli analiti.

4hFSM8						
	Variazione % di area dopo 6 mesi, T ambiente		Variazione % di area dopo 6 mesi, 4°C		Dev. st. % degli analiti	
	DAD	UV-Vis	DAD	UV	DAD	UV-Vis
STY	-5,6733	-7,3283	-4,3641	-4,5346	0,61073	0,94263
MMA	1,60428	2,35158	1,60428	8,09561	3,46997	9,13412
ANI	-0,2736	-1,1789	0	-0,5627	1,18948	3,26486

Tabella 37: variazione percentuale delle aree dei picchi cromatografici del campione 4hFSM8 registrata tra la prima e la seconda analisi ripetuta dopo sei mesi (campione conservato a temperatura ambiente o in frigorifero); deviazione standard percentuale degli analiti.

Dalle tabelle Tabella 36 Tabella 37 è possibile osservare come dopo sei mesi l'unico analita che subisce una diminuzione percentuale di area superiore a quella consentita dalla deviazione standard è lo STY, questo sia quando il campione viene conservato a temperatura ambiente sia quando viene conservato a 4°C. Un'altra conclusione che si può trarre è quella che la presenza del polimero nel campione 4hFSM8 non influenza il livello

di degrado, dal momento che le analisi mostrano gli stessi risultati di quelle effettuate sul campione privo di polimero (t0FSM8).

Le tabelle seguenti riportano invece i risultati ottenuti dopo un solo mese di conservazione a temperatura ambiente. La prova con il campione refrigerato è stata scartata dal momento che si è capito che il tipo di conservazione non influenza il livello di degrado.

<b>t0FSM16</b>				
	<b>Variazione % di area dopo 1 mese, T ambiente</b>		<b>Dev. st. % degli analiti</b>	
	<b>DAD</b>	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>	<b>UV-Vis</b>
<b>STY</b>	0,65703	0,80017	0,61073	0,94263
<b>MMA</b>	2,70758	6,8574	3,46997	9,13412
<b>ANI</b>	0,77519	1,75346	1,18948	3,26486

Tabella 38 *variazione percentuale delle aree dei picchi cromatografici del campione t0FSM16 registrata tra la prima e la seconda analisi ripetuta dopo un mese (campione conservato a temperatura ambiente); deviazione standard percentuale degli analiti.*

<b>4hFSM17</b>				
	<b>Variazione % di area dopo 1 mese, T ambiente</b>		<b>Dev. st. % degli analiti</b>	
	<b>DAD</b>	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>	<b>UV-Vis</b>
<b>STY</b>	0,41754	0,10162	0,61073	0,94263
<b>MMA</b>	1,00897	0,03546	3,46997	9,13412
<b>ANI</b>	0,20492	-0,9153	1,18948	3,26486

Tabella 39: *variazione percentuale delle aree dei picchi cromatografici del campione 4hFSM17 registrata tra la prima e la seconda analisi ripetuta dopo un mese (campione conservato a temperatura ambiente); deviazione standard percentuale degli analiti.*

Dalle tabelle Tabella 38 e Tabella 39 è possibile osservare come dopo un mese di conservazione a temperatura ambiente nessun analita subisce una variazione percentuale di area superiore ai limiti consentiti dalla deviazione standard.

È quindi possibile concludere che il tipo di conservazione, se a temperatura ambiente o a 4°C, non influenza lo stato di degrado degli analiti, quello che invece influenza è il tempo di conservazione: se il campione viene conservato per un lungo periodo, come ad esempio sei mesi, lo STY subisce un degrado che però non coinvolge il MMA e l'ANI; se invece la conservazione è inferiore, come ad esempio un mese, tale degrado non si manifesta e tutti e tre gli analiti se rianalizzati forniscono gli stessi risultati di un mese prima.

### 6.5.8 Applicazione ai campioni reali

Dopo aver ottimizzato e validato il metodo analitico si è proceduto con l'applicazione dell'intera metodologia all'analisi di campioni reali. Essendo lo scopo del lavoro la determinazione del grado di conversione dei due monomeri nel formare il copolimero P(S-r-MMA), sono state prelevate ed analizzate aliquote del grezzo di reazione a tempi diversi durante la reazione di polimerizzazione. Sono state seguite diverse polimerizzazioni che differivano per la composizione percentuale dei due monomeri, l'anisolo, DMSO, il CuBr<sub>2</sub>, il Me<sub>6</sub>TREN e l'iniziatore radicalico HEBIB. Sono state prelevate ed analizzate le aliquote prelevate a t<sub>0</sub>, t<sub>2h</sub>, t<sub>4h</sub>, t<sub>6h</sub>, e t<sub>22h</sub>. Le analisi sono state condotte mediante il metodo cromatografico HPLC-UV-DAD appena ottimizzato.

A titolo di esempio, dalla Figura 54 alla Figura 61 si riportano i cromatogrammi ottenuti a diversi tempi di polimerizzazione per entrambi i rilevatori. Come si può notare dalle prime due figure, in cui sono riportati i cromatogrammi estratti dal rivelatore DAD e UV, da quest'ultimo è possibile ottenere la massima intensità dei tre analiti.

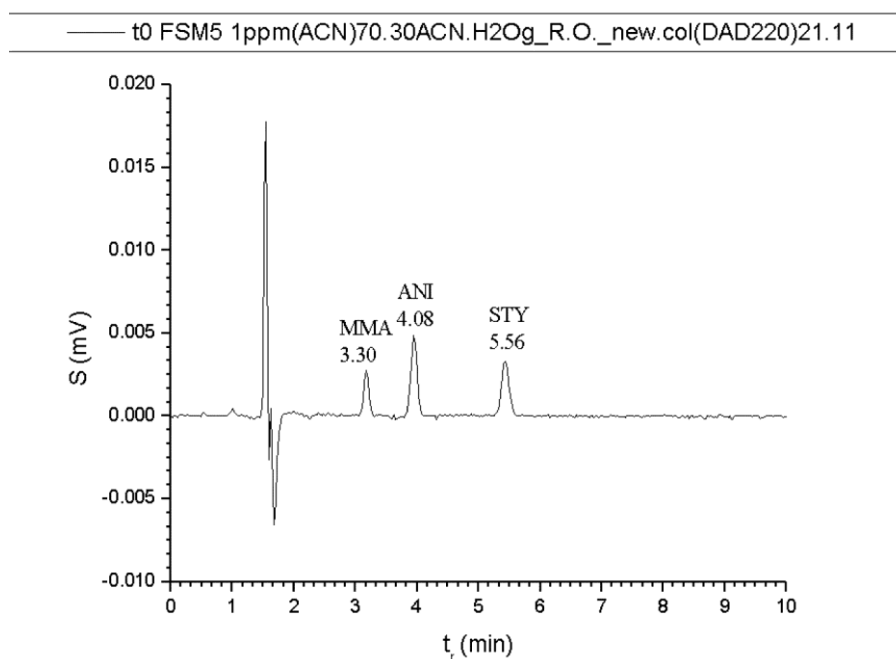


Figura 54: Cromatogramma del campione t<sub>0</sub>FSM5 diluito in ACN alla concentrazione di 1 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD (220nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,30 minuti, quello dell'ANI di 4,08 minuti, mentre quello dello STY è di 5,56 minuti.

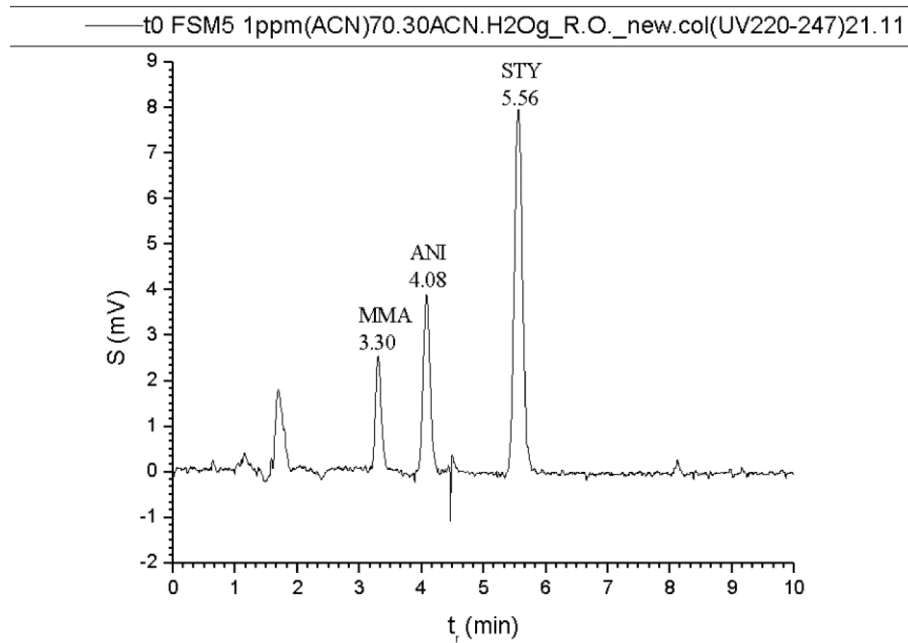


Figura 55: Cromatogramma del campione t0FSM5 diluito in ACN alla concentrazione di 1 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore UV-Visibile (220-247nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,30 minuti, quello dell'ANI di 4,08 minuti, mentre quello dello STY è di 5,56 minuti.

Osservando i cromatogrammi ottenuti dalle analisi dei campioni a tempi maggiore di T0 si può notare come nessun componente del grezzo e nemmeno il polimero formatosi durante la reazione di polimerizzazione interferisca nella determinazione degli analiti. Anche se i campioni prelevati a partire dalle 6h e fino alla fine della reazione hanno subito una minore diluizione, per mantenere la concentrazione degli analiti superiore al limite di quantificazione, la maggior concentrazione degli interferenti non ha creato problematiche.

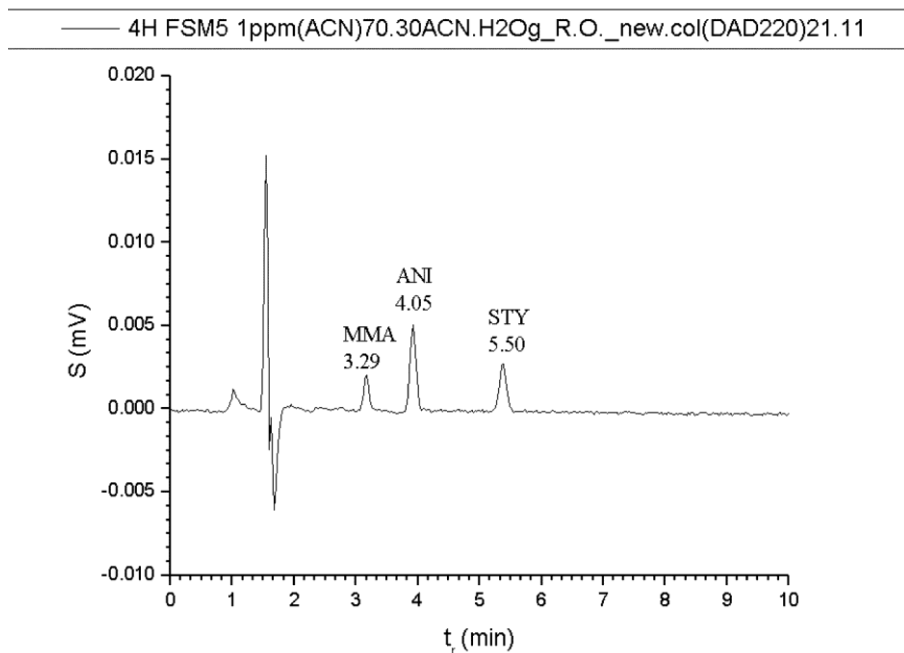


Figura 56: Cromatogramma del campione 4hFSM5 diluito in ACN alla concentrazione di 1 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD (220nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,29 minuti, quello dell'ANI di 4,05 minuti, mentre quello dello STY è di 5,50 minuti.

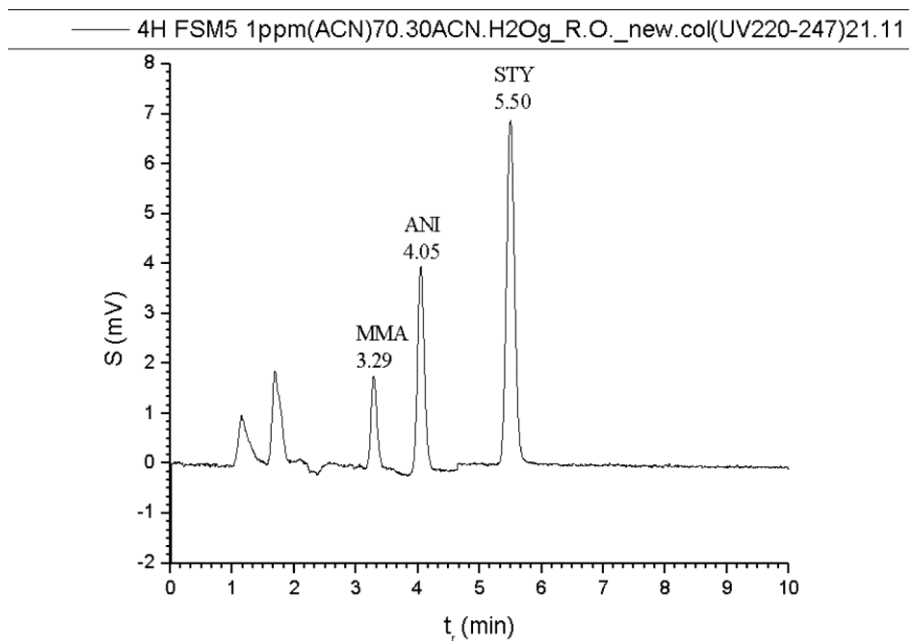


Figura 57: Cromatogramma del campione 4hFSM5 diluito in ACN alla concentrazione di 1 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore UV-Visibile (220-247nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,29 minuti, quello dell'ANI di 4,05 minuti, mentre quello dello STY è di 5,50 minuti.

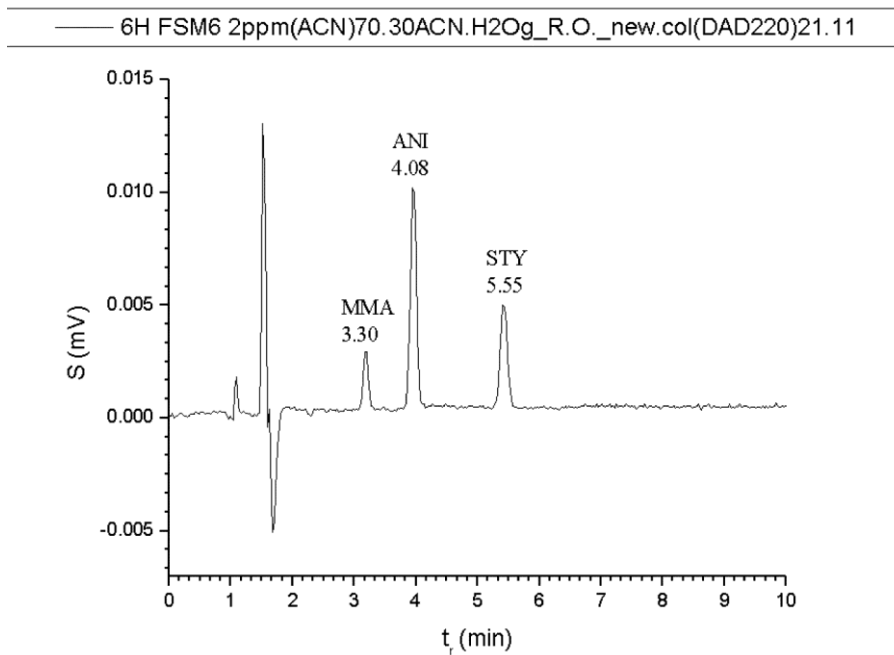


Figura 58: Cromatogramma del campione 6hFSM6 diluito in ACN alla concentrazione di 2 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD (220nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,30 minuti, quello dell'ANI di 4,08 minuti, mentre quello dello STY è di 5,55 minuti.

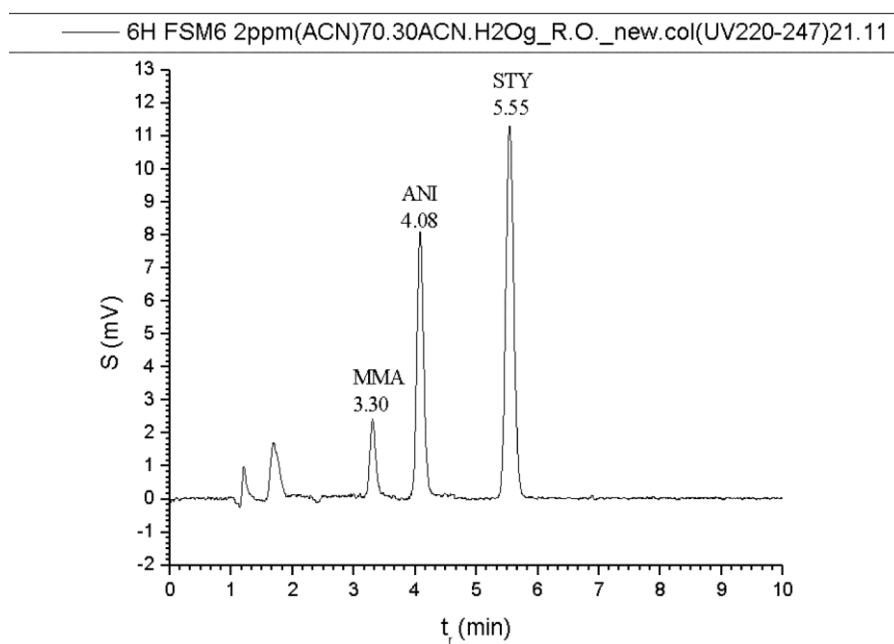


Figura 59: Cromatogramma del campione 6hFSM6 diluito in ACN alla concentrazione di 2 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore UV-Visibile (220-247nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,30 minuti, quello dell'ANI di 4,08 minuti, mentre quello dello STY è di 5,55 minuti.

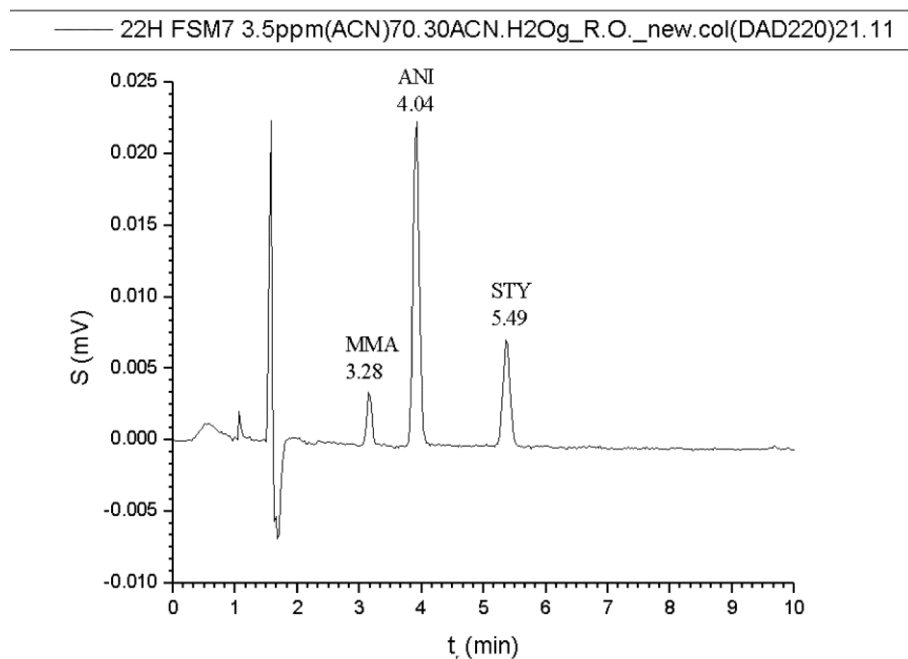


Figura 60: Cromatogramma del campione 22hFSM7 diluito in ACN alla concentrazione di 3,5 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore DAD (220nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,28 minuti, quello dell'ANI di 4,04 minuti, mentre quello dello STY è di 5,49 minuti.

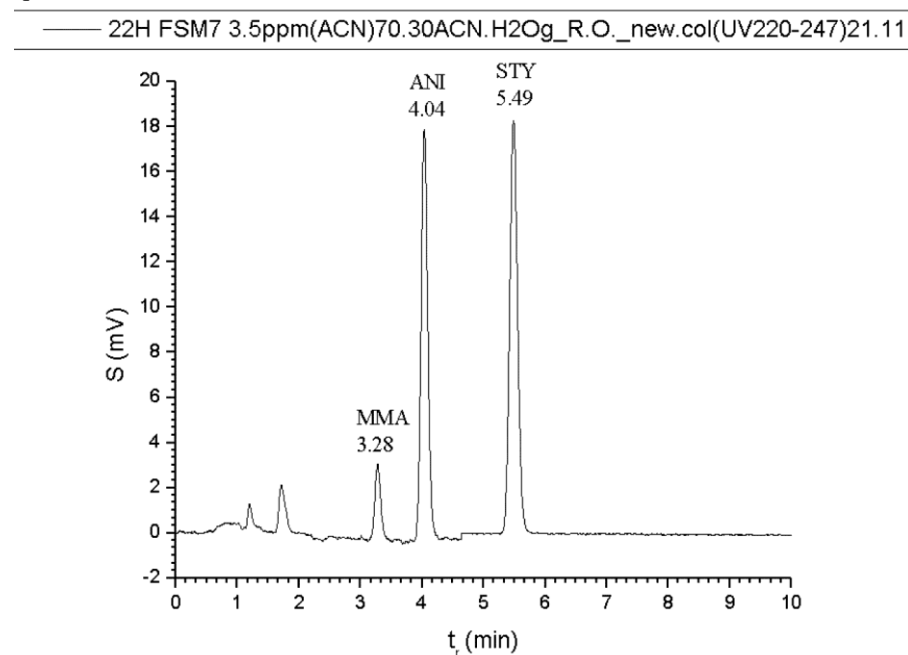


Figura 61: Cromatogramma del campione 22hFSM7 diluito in ACN alla concentrazione di 3,5 mg/L. Fase mobile 70:30 (v/v) ACN:H<sub>2</sub>O con gradiente centrale in THF. Cromatogramma estratto dal rivelatore UV-Visibile (220-247nm). Il picco del MMA mostra un tempo di ritenzione di 3,28 minuti, quello dell'ANI di 4,04 minuti, mentre quello dello STY è di 5,49 minuti.

Si riportano dalla Tabella 40 alla 47 le concentrazioni dei tre analiti di tutti i campioni analizzati. In Tabella 40 sono riportate le concentrazioni degli analiti a  $t_0$ ,  $t_{2h}$ ,  $t_{4h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{22h}$  della prima polimerizzazione FSM. Avendo estratto i dati da entrambi i rivelatori, le

concentrazioni degli analiti verranno calcolate tenendo conto dei dati ottenuti sia dal rivelatore UV che dal rivelatore DAD.

<b>Nome campione: t0FSM1</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	45,12 x 10 ± 0,42 x 10	44,01 x 10 ± 0,27 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,71 x 10 <sup>2</sup> ± 0,12 x 10 <sup>2</sup>	36,93 x 10 ± 0,44 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	1,79 x 10 <sup>2</sup> ± 0,16 x 10 <sup>2</sup>	16,38 x 10 ± 0,57 x 10
<b>Nome campione: 2hFSM1</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	37,23 x 10 ± 0,35 x 10	38,56 x 10 ± 0,23 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,39 x 10 <sup>2</sup> ± 0,11 x 10 <sup>2</sup>	33,55 x 10 ± 0,40 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	1,44 x 10 <sup>2</sup> ± 0,13 x 10 <sup>2</sup>	10,34 x 10 ± 0,36 x 10
<b>Nome campione: 4hFSM2</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	31,88 x 10 ± 0,30 x 10	33,52 x 10 ± 0,21 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,69 x 10 <sup>2</sup> ± 0,12 x 10 <sup>2</sup>	35,09 x 10 ± 0,42 x 10



<b>METILMETACRILATO</b>	$1,19 \times 10^2 \pm 0,11 \times 10^2$	$11,99 \times 10 \pm 0,42 \times 10$
<b>Nome campione: 6hFSM3</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	$27,65 \times 10 \pm 0,26 \times 10$	$26,97 \times 10 \pm 0,16 \times 10$
<b>ANISOLO</b>	$3,41 \times 10^2 \pm 0,11 \times 10^2$	$33,45 \times 10 \pm 0,40 \times 10$
<b>METILMETACRILATO</b>	$9,64 \times 10 \pm 0,88 \times 10$	$9,12 \times 10 \pm 0,32 \times 10$
<b>Nome campione: 22hFSM4</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	$21,44 \times 10 \pm 0,20 \times 10$	$21,25 \times 10 \pm 0,13 \times 10$
<b>ANISOLO</b>	$3,68 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$35,59 \times 10 \pm 0,42 \times 10$
<b>METILMETACRILATO</b>	$7,88 \times 10 \pm 0,72 \times 10$	$6,70 \times 10 \pm 0,23 \times 10$

Tabella 40: Concentrazione di STY, MMA e ANI nei campioni t0FSM1, 2hFSM1, 4hFSM2, 6hFSM3 e 22hFSM4 della prima reazione di polimerizzazione. Le concentrazioni sono riferite all'aliquota prelevata dalla soluzione di reazione prima delle diluizioni "Concentrazione mg in 1g di campione".

Osservando la Tabella 40 e le Figura 62 e Figura 63 che riportano l'andamento della concentrazione degli analiti al procedere della reazione di polimerizzazione, è possibile notare come la quantità di stirene e metil metacrilato decresce dal campione t0 a quello 22h mentre invece quella dell'anisolo resta pressoché costante. L'anisolo essendo un solvente della reazione non partecipa al processo e quindi deve rimanere costante nel tempo, motivo per il quale è stato scelto come standard interno per il metodo cromatografico.

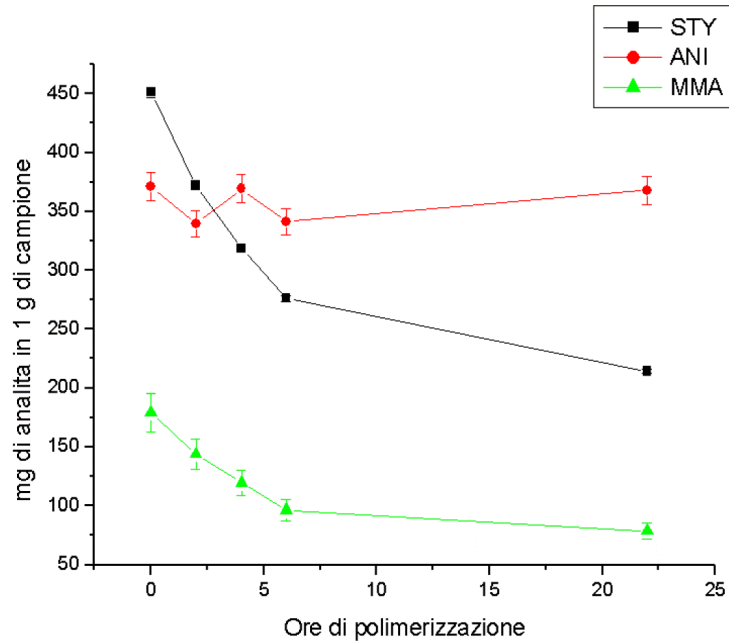


Figura 62: Grafico della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI in funzione del tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM1, 2hFSM1, 4hFSM2, 6hFSM3 e 22hFSM4. Concentrazioni calcolate dal rivelatore UV-Visibile.

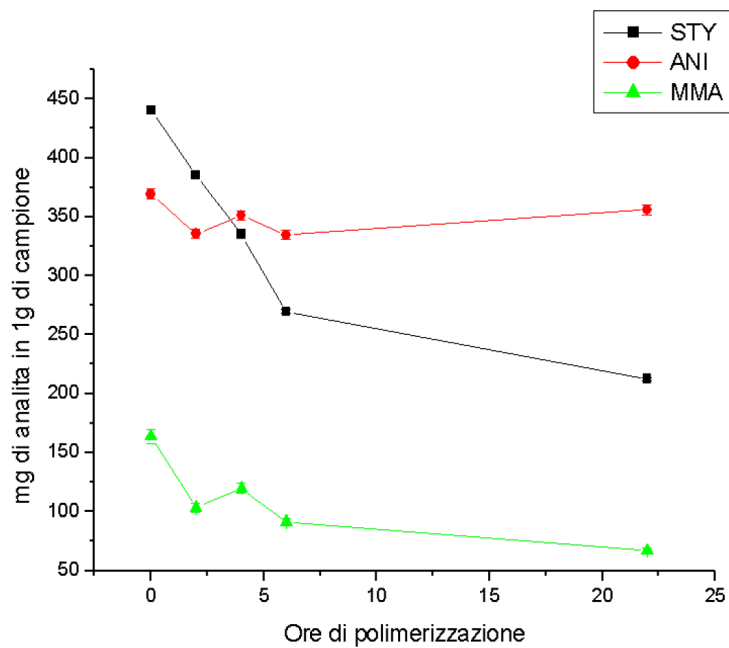


Figura 63: Grafico della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI in funzione del tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM1, 2hFSM1, 4hFSM2, 6hFSM3 e 22hFSM4. Concentrazioni calcolate dal rivelatore DAD.

Visto che i grafici ottenuti dai dati ricavati dai due rivelatori sono sostanzialmente sovrapponibili, da questo punto in poi verranno riportati solo i grafici relativi al rivelatore

UV-Visibile. In Tabella 41 si riportano le concentrazioni degli analiti della seconda polimerizzazione seguita.

<b>Nome campione: t0FSM5</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	41,72 x 10 ± 0,39 x 10	42,04 x 10 ± 0,26 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,73 x 10 <sup>2</sup> ± 0,12 x 10 <sup>2</sup>	34,70 x 10 ± 0,41 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	2,88 x 10 <sup>2</sup> ± 0,26 x 10 <sup>2</sup>	2,97 x 10 <sup>2</sup> ± 0,10 x 10 <sup>2</sup>
<b>Nome campione: 4hFSM5</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	33,34 x 10 ± 0,31 x 10	33,82 x 10 ± 0,21 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,63 x 10 <sup>2</sup> ± 0,12 x 10 <sup>2</sup>	33,66 x 10 ± 0,40 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	2,01 x 10 <sup>2</sup> ± 0,18 x 10 <sup>2</sup>	19,57 x 10 ± 0,68 x 10
<b>Nome campione: 6hFSM6</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	26,90 x 10 ± 0,25 x 10	26,90 x 10 ± 0,16 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,37 x 10 <sup>2</sup> ± 0,11 x 10 <sup>2</sup>	32,51 x 10 ± 0,39 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	1,54 x 10 <sup>2</sup> ± 0,14 x 10 <sup>2</sup>	11,40 x 10 ± 0,39 x 10
<b>Nome campione: 22hFSM7</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	20,67 x 10 ± 0,19 x 10	20,49 x 10 ± 0,12 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,61 x 10 <sup>2</sup> ± 0,12 x 10 <sup>2</sup>	35,87 x 10 ± 0,43 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	8,94 x 10 ± 0,82 x 10	7,96 x 10 ± 0,28 x 10

Tabella 41: Concentrazione di STY, MMA e ANI nei campioni t0FSM5, 4hFSM5, 6hFSM6, 22hFSM7 della seconda reazione di polimerizzazione. Le concentrazioni sono riferite all’aliquota prelevata dalla soluzione di reazione prima delle diluizioni “Concentrazione mg in 1g di campione”.

Osservando i dati riportati in Tabella 41 e il grafico riportato in Figura 64 è possibile notare come le concentrazioni di stirene e metil metacrilato diminuiscano nel tempo mentre l’anisolo rimane pressoché costante.

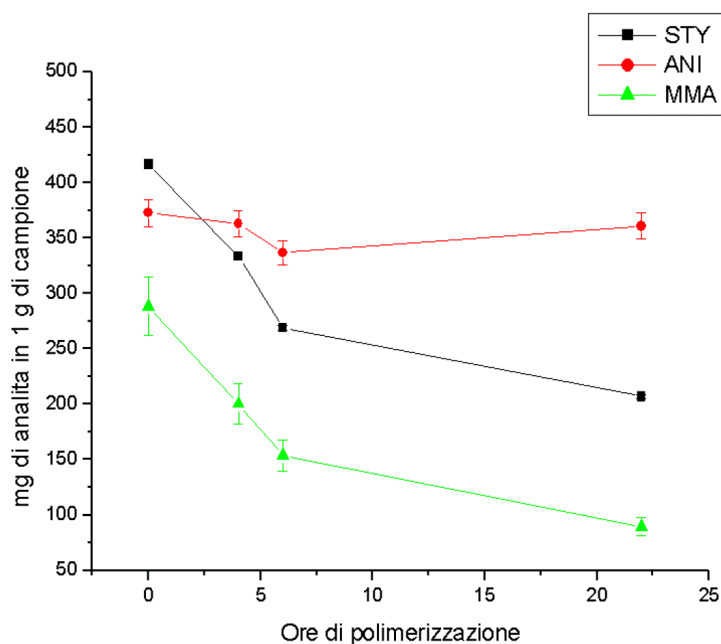


Figura 64: Grafico della variazione della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI nel tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM5, 4hFSM5, 6hFSM6, 22hFSM7. Concentrazioni calcolate dal rivelatore UV-Visibile.

Le concentrazioni degli analiti della terza polimerizzazione sono riportate in Tabella 42.

Nome campione: t0FSM8		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
STIRENE	$45,58 \times 10 \pm 0,43 \times 10$	$45,51 \times 10 \pm 0,28 \times 10$
ANISOLO	$3,72 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$37,17 \times 10 \pm 0,44 \times 10$
METILMETACRILATO	$1,79 \times 10^2 \pm 0,16 \times 10^2$	$18,96 \times 10 \pm 0,66 \times 10$
Nome campione: 4hFSM8		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	

	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	30,90 x 10 ± 0,29	31,53 x 10 ± 0,19 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,42 x 10 <sup>2</sup> ± 0,11 x 10 <sup>2</sup>	33,33 x 10 ± 0,40 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	1,27 x 10 <sup>2</sup> ± 0,11 x 10 <sup>2</sup>	10,26 x 10 ± 0,36 x 10
<b>Nome campione: 6hFSM9</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	26,68 x 10 ± 0,25 x 10	26,91 x 10 ± 0,16 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,46 x 10 <sup>2</sup> ± 0,11 x 10 <sup>2</sup>	33,54 x 10 ± 0,40 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	10,46 x 10 ± 0,96 x 10	10,78 x 10 ± 0,37 x 10
<b>Nome campione: 22hFSM10</b>		
<b>Analita</b>	<b>Concentrazione mg in 1g di campione</b>	
	<b>UV-Vis</b>	<b>DAD</b>
<b>STIRENE</b>	17,54 x 10 ± 0,16 x 10	17,67 x 10 ± 0,11 x 10
<b>ANISOLO</b>	3,28 x 10 <sup>2</sup> ± 0,11 x 10 <sup>2</sup>	32,75 x 10 ± 0,39 x 10
<b>METILMETACRILATO</b>	5,67 x 10 ± 0,52 x 10	5,79 x 10 ± 0,20 x 10

Tabella 42: Concentrazione di STY, MMA e ANI nei campioni t0FSM8, 4hFSM8, 6hFSM9, 22hFSM10 della terza reazione di polimerizzazione. Le concentrazioni sono riferite all'aliquota prelevata dalla soluzione di reazione prima delle diluizioni "Concentrazione mg in 1g di campione".

Anche in questo caso le concentrazioni dei due monomeri diminuiscono con il passare delle ore, indicando l'avvenuta formazione del copolimero, mentre lo standard interno rimane costante (Figura 65).

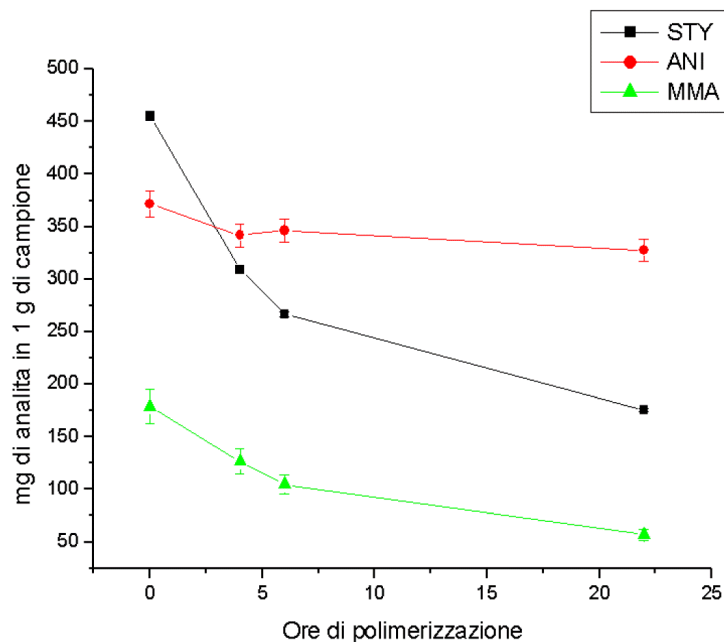


Figura 65: Grafico della variazione della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI nel tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM8, 4hFSM8, 6hFSM9, 22hFSM10. Concentrazioni calcolate dal rivelatore UV-Visibile.

Nelle due seguenti polimerizzazioni sono stati effettuati solo due prelievi uno all'inizio della reazione a t0 e uno alla fine a t22h. In Tabella 43 sono riportate le concentrazioni, espresse in mg L-1, di stirene, metil metacrilato ed anisolo della quarta polimerizzazione.

Nome campione: t0FSM11		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
STIRENE	$44,30 \times 10 \pm 0,42 \times 10$	$44,78 \times 10 \pm 0,27 \times 10$
ANISOLO	$3,68 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$35,65 \times 10 \pm 0,42 \times 10$
METILMETACRILATO	$2,22 \times 10^2 \pm 0,20 \times 10^2$	$19,52 \times 10 \pm 0,68 \times 10$
Nome campione: 22hFSM11		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
STIRENE	$18,85 \times 10 \pm 0,18 \times 10$	$18,71 \times 10 \pm 0,11 \times 10$
ANISOLO	$3,55 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$34,37 \times 10 \pm 0,41 \times 10$
METILMETACRILATO	$9,40 \times 10 \pm 0,86 \times 10$	$7,00 \times 10 \pm 0,24 \times 10$

Tabella 43: Concentrazione di STY, MMA e ANI nei campioni t0FSM11, 22hFSM11 della quarta reazione di polimerizzazione. Le concentrazioni sono riferite all'aliquota prelevata dalla soluzione di reazione prima delle diluizioni "Concentrazione mg in 1g di campione".

Osservando l'andamento delle concentrazioni riportato in Figura 66 tutti e tre gli analiti diminuiscono nel tempo.

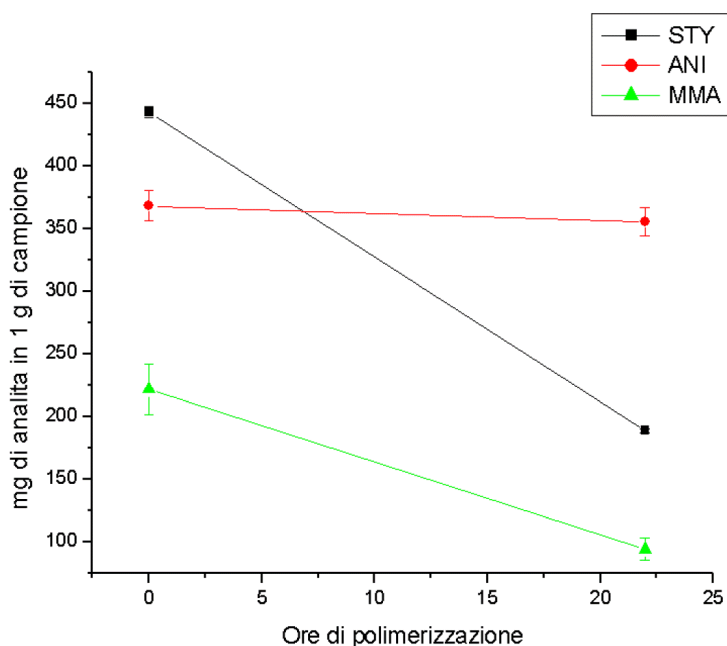


Figura 66: Grafico della variazione della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI nel tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM11, 22hFSM11. Concentrazioni calcolate dal rivelatore UV-Visibile.

Le concentrazioni dei tre analiti della quinta polimerizzazione sono riportati in Tabella 44.

Nome campione: t0FSM12		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
STIRENE	$45,11 \times 10 \pm 0,42 \times 10$	$44,49 \times 10 \pm 0,27 \times 10$
ANISOLO	$3,33 \times 10^2 \pm 0,11 \times 10^2$	$33,56 \times 10 \pm 0,40 \times 10$
METILMETACRILATO	$1,85 \times 10^2 \pm 0,17 \times 10^2$	$16,33 \times 10 \pm 0,57 \times 10$
Nome campione: 22hFSM12		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD

<b>STIRENE</b>	$20,91 \times 10 \pm 0,20 \times 10$	$20,70 \times 10 \pm 0,13 \times 10$
<b>ANISOLO</b>	$3,83 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$34,20 \times 10 \pm 0,41 \times 10$
<b>METILMETACRILATO</b>	$6,85 \times 10 \pm 0,63 \times 10$	$5,50 \times 10 \pm 0,19 \times 10$

Tabella 44: Concentrazione di STY, MMA e ANI nei campioni t0FSM12, 22hFSM12 della quinta reazione di polimerizzazione. Le concentrazioni sono riferite all'aliquota prelevata dalla soluzione di reazione prima delle diluizioni "Concentrazione mg in 1g di campione".

Osservando i dati riportati Tabella 44 è possibile notare come ancora una volta i due monomeri decrescono col passare delle ore di reazione. Il grafico in Figura 67 riporta questa diminuzione di concentrazione nel tempo di reazione:

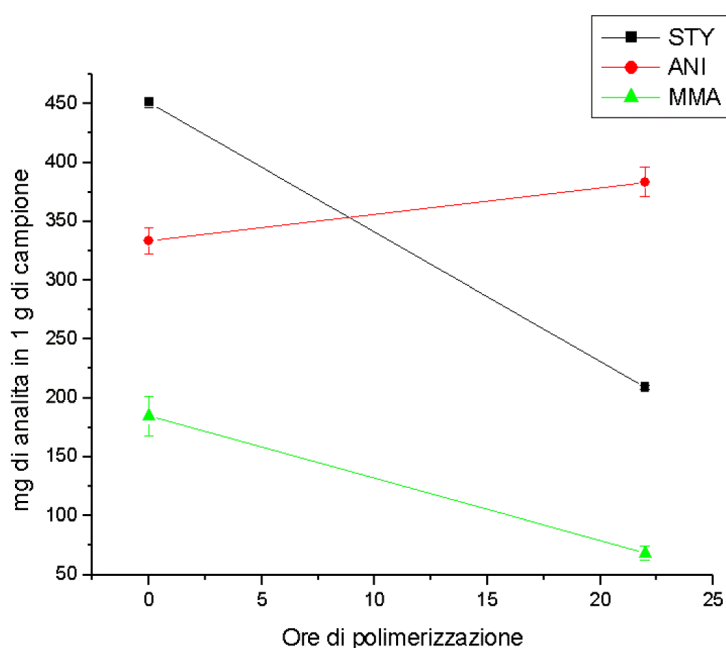


Figura 67: Grafico della variazione della concentrazione (mg/g) di STY, MMA, ANI nel tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM12, 22hFSM12. Concentrazioni calcolate dal rivelatore UV-Visibile.

Osservando il grafico sovrastante si può però notare come la concentrazione dell'anisolo sembri aumentare nel tempo, cosa impossibile dal momento che non vengono fatte aggiunte di questo analita durante il processo di sintesi, una spiegazione plausibile potrebbe essere un momentaneo difetto nel detector UV-Vis, dal momento che tale aumento non è stato rivelato dal detector DAD, Figura 68:



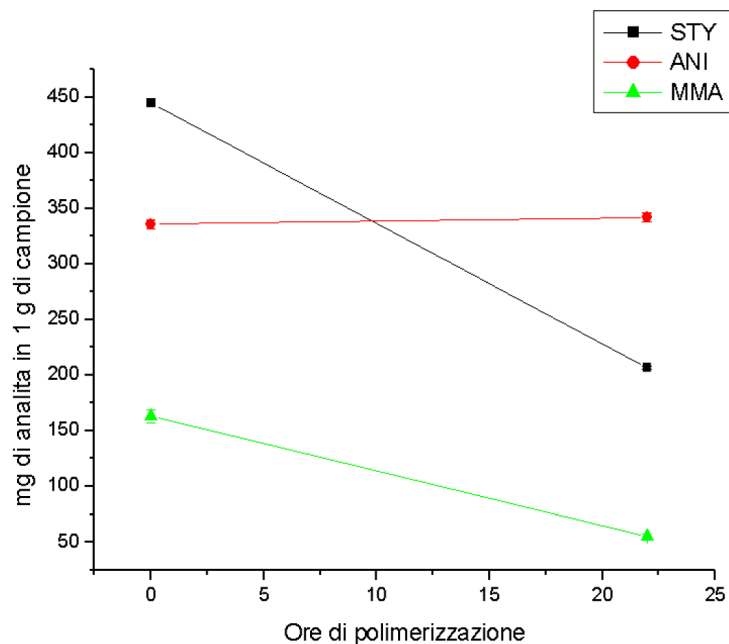


Figura 68: Grafico della variazione della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI nel tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM12, 22hFSM12. Concentrazioni calcolate dal rivelatore DAD.

Le concentrazioni ottenute dalla sesta polimerizzazione seguita, sono riportate in Tabella 45.

Nome campione: t0FSM13		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
STIRENE	$42,95 \times 10 \pm 0,40 \times 10$	$42,05 \times 10 \pm 0,26 \times 10$
ANISOLO	$3,84 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$35,53 \times 10 \pm 0,42 \times 10$
METILMETACRILATO	$2,13 \times 10^2 \pm 0,19 \times 10^2$	$19,92 \times 10 \pm 0,69 \times 10$
Nome campione: 4hFSM13		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
STIRENE	$29,43 \times 10 \pm 0,28 \times 10$	$29,51 \times 10 \pm 0,18 \times 10$
ANISOLO	$4,12 \times 10^2 \pm 0,13 \times 10^2$	$34,00 \times 10 \pm 0,40 \times 10$
METILMETACRILATO	$1,42 \times 10^2 \pm 0,13 \times 10^2$	$10,65 \times 10 \pm 0,37 \times 10$
Nome campione: 6hFSM14		

Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
<b>STIRENE</b>	$25,34 \times 10 \pm 0,24 \times 10$	$25,25 \times 10 \pm 0,15 \times 10$
<b>ANISOLO</b>	$3,60 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$33,15 \times 10 \pm 0,39 \times 10$
<b>METILMETACRILATO</b>	$1,27 \times 10^2 \pm 0,12 \times 10^2$	$12,02 \times 10 \pm 0,42 \times 10$
<b>Nome campione: 22hFSM15</b>		
Analita	Concentrazione mg in 1g di campione	
	UV-Vis	DAD
<b>STIRENE</b>	$16,62 \times 10 \pm 0,16 \times 10$	$16,49 \times 10 \pm 0,10 \times 10$
<b>ANISOLO</b>	$3,51 \times 10^2 \pm 0,11 \times 10^2$	$34,01 \times 10 \pm 0,40 \times 10$
<b>METILMETACRILATO</b>	$10,85 \times 10 \pm 0,99 \times 10$	$5,66 \times 10 \pm 0,20 \times 10$

Tabella 45: Concentrazione di STY, MMA e ANI nei campioni t0FSM13, 4hFSM13, 6hFSM14 e 22hFSM15 della sesta reazione di polimerizzazione. Le concentrazioni sono riferite all'aliquota prelevata dalla soluzione di reazione prima delle diluizioni "Concentrazione mg in 1g di campione".

In Figura 69 sono riportati gli andamenti delle concentrazioni dei due monomeri e dello standard interno.

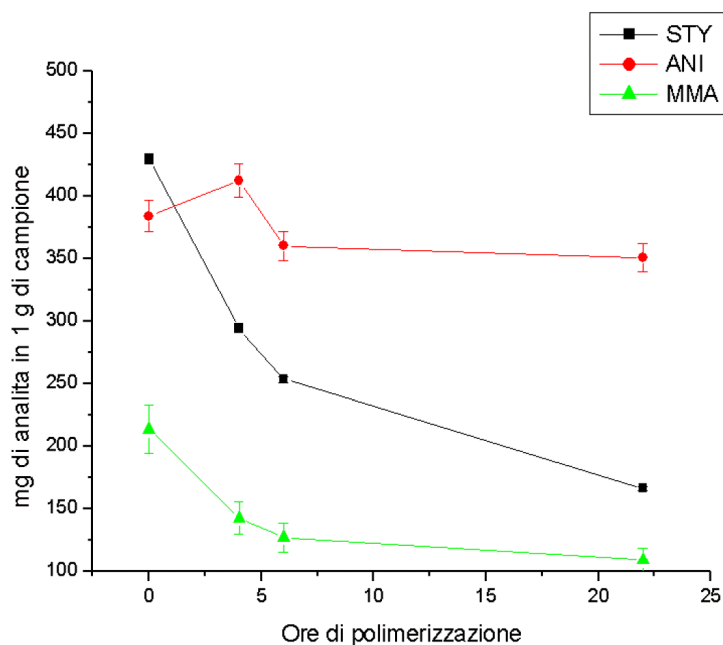


Figura 69: Grafico della variazione della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI nel tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM13, 4hFSM13, 6hFSM14 e 22hFSM15. Concentrazioni calcolate dal rivelatore UV-Visibile.

Anche in questo caso si è registrato un momentaneo difetto del detector Uv-Visibile, infatti l'anisolo sembrerebbe aumentare dopo 4 ore di reazione per poi diminuire con il passare delle ore, andamento che non è stato registrato invece dal rivelatore DAD, Figura 70.

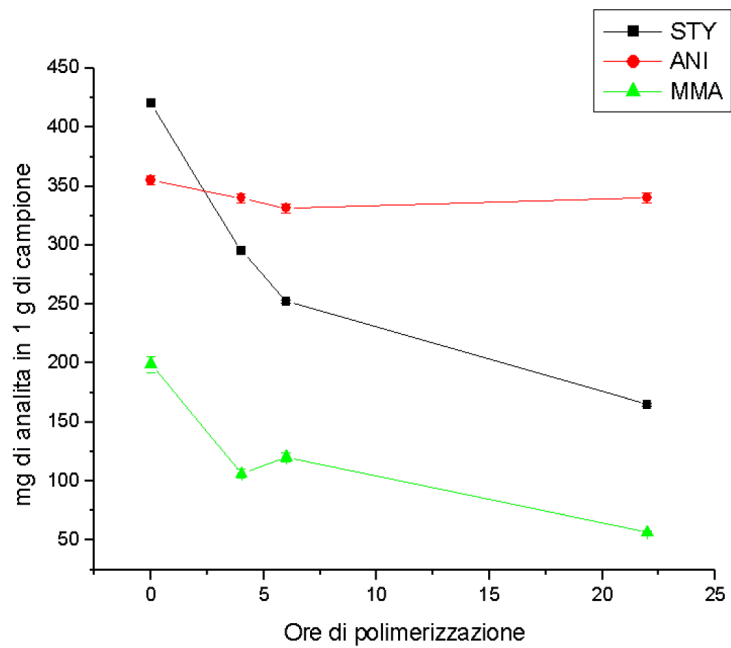


Figura 70: Grafico della variazione della concentrazione (mg/g) di STY, MMA e ANI nel tempo di polimerizzazione per i campioni t0FSM13, 4hFSM13, 6hFSM14 e 22hFSM15. Concentrazioni calcolate dal rivelatore DAD.

## 6.6 Grado di conversione della reazione di polimerizzazione

Il grado di conversione viene calcolato confrontando la quantità di monomero presente inizialmente nel grezzo di reazione con la quantità consumata, è quindi necessario conoscere in maniera accurata la quantità iniziale di monomero. La reazione di polimerizzazione non è stata condotta in un'unica fiala ma in più fiale in cui la reazione è stata fatta partire contemporaneamente. Dopo di che la reazione è stata interrotta in tempi diversi per ogni fiala, ciò ha permesso a tempi diversi il prelievo delle aliquote destinate all'analisi cromatografica. Pesando il contenuto di ogni fiala e rapportando questo dato ai mg iniziali dei tre analiti è stato possibile calcolare i  $\text{mg L}^{-1}$  di stirene, metilmetacrilato e di anisolo presenti nel grezzo all'inizio della reazione per ciascuna fiala. Questo ci ha permesso di ottenere la concentrazione teorica iniziale del grezzo ( $t_0$  teorico), che dovrebbe quindi combaciare con la concentrazione da noi misurata. In Tabella 46 sono riportate sia le concentrazioni dei  $t_0$  teorici che le concentrazioni dei  $t_0$  ottenute mediante analisi cromatografica per tutte le polimerizzazioni.

	mg/g teorici FSM1	mg/g teorici FSM2	mg/g teorici FSM3	mg/g teorici FSM4	mg/g $t_0$ FSM1 analizzato (UV-Vis)
<b>STY</b>	428,765	425,316	426,566	429,223	451,250
<b>MMA</b>	179,953	178,506	179,031	180,146	179,128
<b>ANI</b>	397,860	394,660	395,820	398,286	371,479
	mg/g teorici FSM5	mg/g teorici FSM6	mg/g teorici FSM7	mg/g $t_0$ FSM5 analizzato (UV- Vis)	
<b>STY</b>	398,773	399,681	397,222	417,271	
<b>MMA</b>	205,989	206,458	205,188	288,393	
<b>ANI</b>	405,551	406,474	403,974	372,645	
	mg/g teorici FSM8	mg/g teorici FSM9	mg/g teorici FSM10	mg/g $t_0$ FSM8 analizzato (UV- Vis)	
<b>STY</b>	430,116	428,953	426,087	455,765	
<b>MMA</b>	185,149	184,649	183,415	178,588	

<b>ANI</b>	394,194	393,128	390,501	371,661	
	<b>mg/g teorici FSM11</b>	<b>mg/g t0FSM11 analizzato (UV-Vis)</b>			
<b>STY</b>	418,572	443,030			
<b>MMA</b>	216,216	221,720			
<b>ANI</b>	372,062	368,319			
	<b>mg/g teorici FSM12</b>	<b>mg/g t0FSM12 analizzato (UV-Vis)</b>			
<b>STY</b>	446,318	451,153			
<b>MMA</b>	181,727	184,766			
<b>ANI</b>	373,388	333,424			
	<b>mg/g teorici FSM13</b>	<b>mg/g teorici FSM14</b>	<b>mg/g teorici FSM15</b>	<b>mg/g t0FSM13 analizzato (UV- Vis)</b>	
<b>STY</b>	412,742	407,897	413,216	429,491	
<b>MMA</b>	213,205	210,702	213,449	213,111	
<b>ANI</b>	394,560	389,929	395,013	384,031	

Tabella 46: concentrazione, espressa in mg/g, dei t0 teorici e degli effettivi t0 analizzati con HPLC.

Dalla Tabella 46 è possibile notare come i valori ottenuti siano molto simili ai t0 teorici, quindi il metodo sviluppato risulta ottimale in quanto i dati forniti sono in accordo con i dati teorici.

Essendo i dati ottenuti dalle analisi dei t0 attendibili, sottraendo alle concentrazioni t0 quelle ottenute nei tempi successivi è possibile ottenere un'attendibile determinazione delle quantità consumate degli analiti dalla reazione di polimerizzazione. Dal rapporto tra la quantità dei monomeri consumati durante il processo di polimerizzazione e la quantità di monomeri inizialmente presente nel grezzo è possibile ottenere il grado di conversione della reazione di sintesi.

I grafici seguenti, dalla Figura 71 alla Figura 74, riportano le quantità di STY e MMA consumati, in rapporto alla concentrazione costante dell'ANI, durante le differenti polimerizzazioni seguite in questo lavoro.

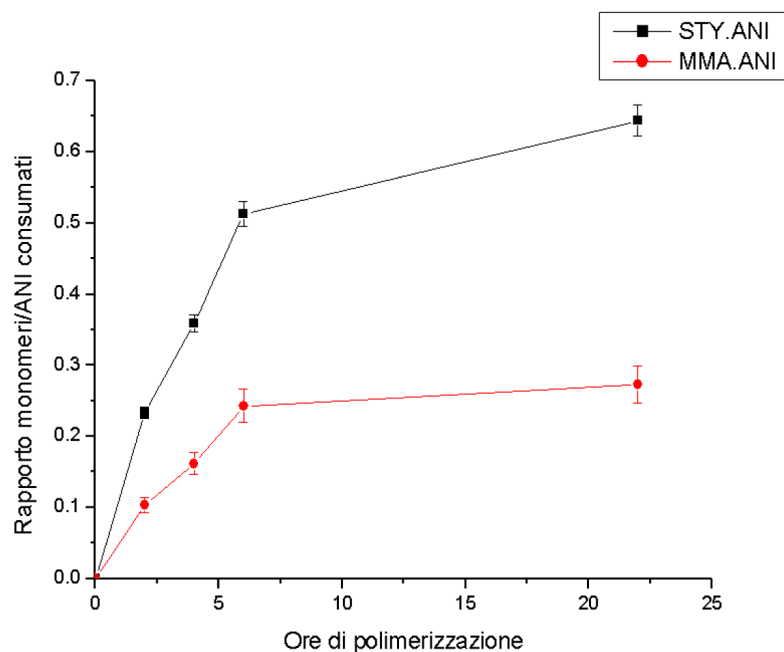


Figura 71: Grafico che mostra il consumo nel tempo (t0, 2h, 4h, 6h, 22h) delle concentrazioni di STY e MMA, rapportati all'ANI, per i campioni t0FSM1, 2hFSM1, 4hFSM2, 6hFSM3 e 22hFSM4. Dati ottenuti dal rivelatore UV-Visibile.

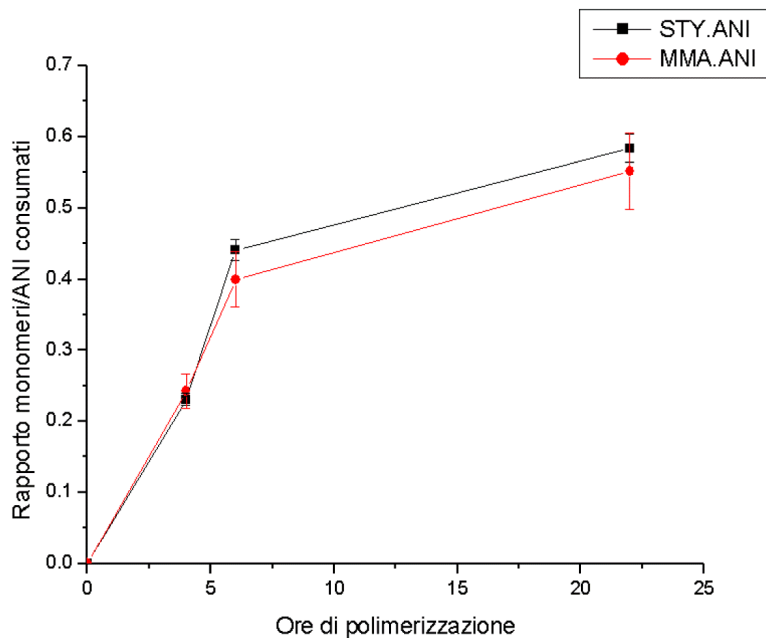


Figura 72: Grafico che mostra il consumo nel tempo (t0, 4h, 6h, 22h) delle concentrazioni di STY e MMA, rapportati all'ANI, per i campioni t0FSM5, 4hFSM5, 6hFSM6 e 22hFSM7. Dati ottenuti dal rivelatore UV-Visibile.

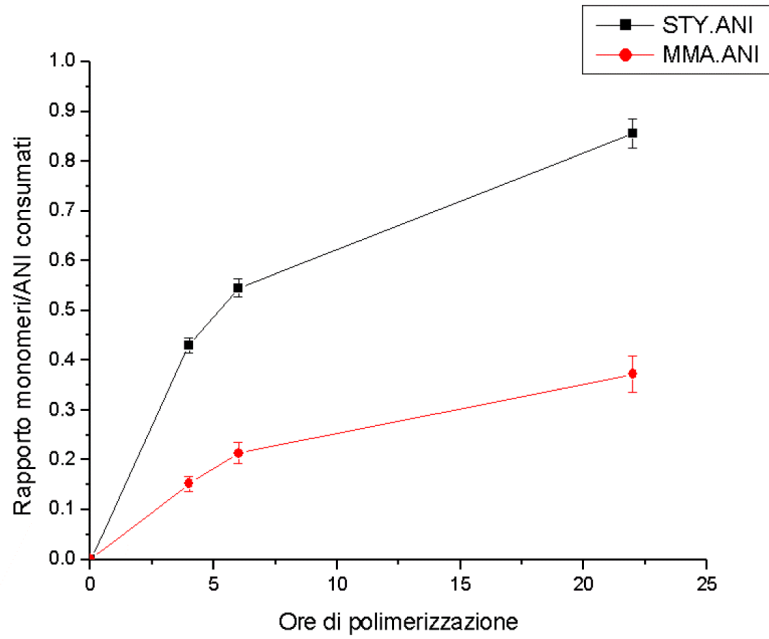


Figura 73: Grafico che mostra il consumo nel tempo (t0, 4h, 6h, 22h) delle concentrazioni di STY e MMA, rapportati all'ANI, per i campioni t0FSM8, 4hFSM8, 6hFSM9, 22hFSM10. Dati ottenuti dal rivelatore UV-Visibile.

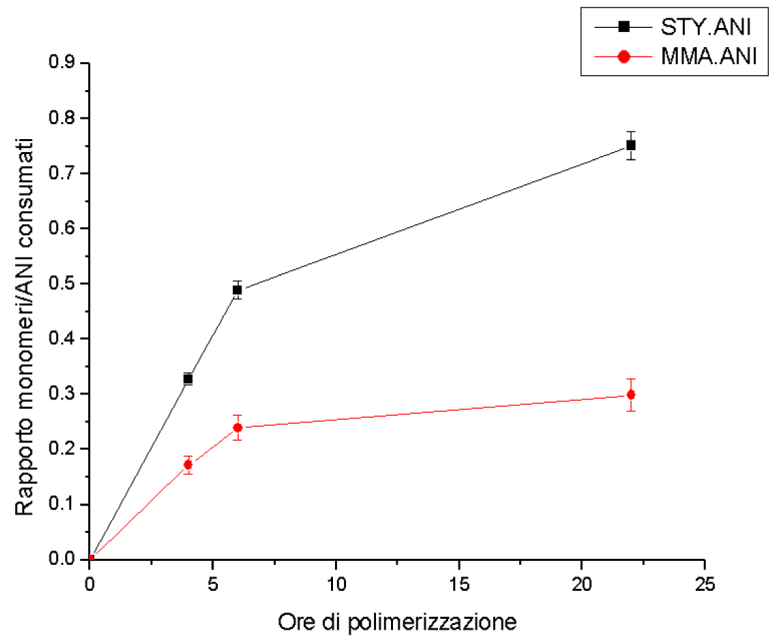


Figura 74: Grafico che mostra il consumo nel tempo (t0, 4h, 6h, 22h) delle concentrazioni di STY e MMA, rapportati all'ANI, per i campioni t0FSM13, 4hFSM13, 6hFSM14 e 22hFSM15. Dati ottenuti dal rivelatore UV-Visibile.

## 6.7 Conclusioni

In questo lavoro è stato messo a punto un metodo analitico HPLC-DAD per la determinazione delle quantità dei monomeri consumate durante le reazioni di sintesi di copolimeri random polistirene-polimetilmetacrilato. Il metodo ottimizzato ci ha permesso di determinare in maniera esatta, per tutta la durata delle reazioni, la quantità dei due monomeri consumati e quindi di valutare in modo accurato il grado di conversione della reazione di polimerizzazione. Il metodo validato è risultato preciso, specifico ed efficace in quanto ha consentito la completa separazione cromatografica degli analiti in 12 minuti.

Inoltre il metodo analitico sviluppato si è rivelato vantaggioso rispetto alle tecniche normalmente utilizzate per il calcolo del grado di polimerizzazione, quali la gascromatografia che prevede un pretrattamento laborioso, la risonanza magnetica nucleare (NMR) molto più costosa e la gravimetria che non permette la simultanea determinazione delle singole concentrazioni dei due monomeri durante tutto il processo di sintesi.

Con il metodo così sviluppato sono state studiate nel tempo sei reazioni di polimerizzazione caratterizzate da diversi quantità di monomeri nel grezzo iniziale. Durante ogni reazione di polimerizzazione sono state prelevate e analizzate delle aliquote del grezzo, da cui è stata ricavata la quantità reagita di stirene e metilmetacrilato, il grado di conversione e infine la relativa composizione del copolimero.



## ***CAPITOLO 7***

## *7 Dye uptake in DSSC: razionalizzazione degli effetti sulla resa di uptake e sulla efficienza della cella[55]*

Le celle fotovoltaiche a base di semiconduttori organici e/o coloranti organici sono dispositivi estremamente economici però la loro efficienza e stabilità sono ancora limitati a confronto delle celle solari cristalline inorganiche. Le proprietà chimiche dei componenti di queste celle devono essere studiate e progettate con attenzione per poter ottimizzare il rendimento di questi dispositivi fotovoltaici. Attualmente, i principali problemi che ancora limitano le loro applicazioni tecnologiche sono: il raggiungimento di una ragionevole efficienza di conversione dei moduli DSSC ( 10% per moduli opachi, 5-6% per moduli trasparenti)[56], il mantenimento nel tempo del rendimento della cella in condizioni reali ( $\approx 20$  anni) e il raggiungimento di risultati riproducibili.

Per raggiungere questi obiettivi, è di fondamentale importanza una dettagliata conoscenza delle componenti delle celle DSSC.

Sebbene sia stata fatta molta ricerca per la progettazione di fotosensibilizzatori più efficienti,[57] solo recentemente si sono capite quali interazioni giocano un ruolo importante sul dye uptake [58-63]. Inoltre la quantità di colorante adsorbita può essere regolata modificando le condizioni del dye uptake, che risulta influenzare molto l'efficienza della cella. I dati in letteratura evidenziano l'importanza dell'acido chenodeossicolico (CDCA) come co-adsorbente per controllare l'aggregazione del colorante e l'iniezione degli elettroni [64] e per migliorare le prestazioni [65]. Tuttavia, in letteratura una razionalizzazione degli effetti dei parametri chimici che influenzano il dye uptake, in relazione con le forze chimiche che governano le interazioni molecolari non è presente. Quindi in questo lavoro un colorante poliene-difenilammina, proposto da Hagberg, [66] è stato utilizzato per la razionalizzazione delle condizioni di uptake.

### *7.1 Analiti*

#### *7.1.1 D5*

Il colorante usato in questo lavoro di tesi è il D5 una triarilammina.

In questo colorante il gruppo difenilammina si comporta da elettrone donatore mentre il gruppo cianoacetico agisce da elettrone attrattore e da punto di ancoraggio per il legame con il semiconduttore. La catena (tiofene) estende la  $\pi$ -coniugazione ed è responsabile dello

spostamento verso il rosso nello spettro di assorbimento, senza compromettere la stabilità del colorante. In figura si riporta la struttura del D5.

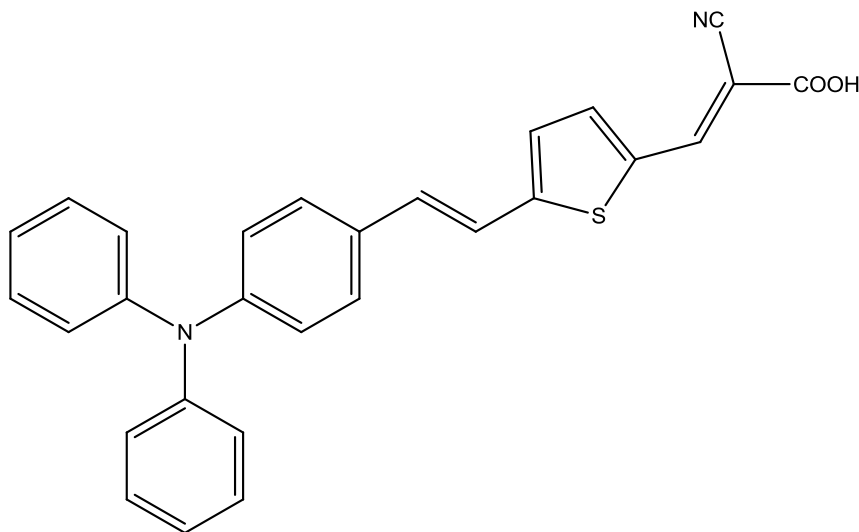


Figura 75

#### 7.1.1.1 Sintesi

La sintesi del colorante, effettuata in collaborazione con l'Università di Torino, avviene in tre steps. Il tiofene viene fatto reagire con il 4(difenilamino)benzaldehyde secondo la reazione di Wittig, seguita poi dalla formilazione della funzionalità tiofenica. Seguirà poi la condensazione dell'aldeide con acido cianoacetico attraverso la reazione di Knoevenagel in presenza di piperidina. Una soluzione di 5-(2-(4-difenilamino-fenil)vinil)tiofenecarbaldeide e acido acetico viene riflussata in presenza di piperidina per 4 h. Il solvente viene rimosso mediante l'utilizzo del Rotavapor e successivamente purificato mediante colonna cromatografica.

#### 7.1.2 $TiO_2$

Il biossido di titanio si può trovare in tre forme cristalline: anatase, rutilo e brookite. Per l'uso nelle celle di *Grätzel* il migliore risulta essere l'anatase perché dà rendimenti più alti rispetto al rutilo; la brookite è poco usata anche per i costi elevati di produzione. Sono state realizzate anche celle con svariati altri materiali (ZnO, CdSe, CdS solo per citarne alcuni),

ma il biossido di titanio è storicamente il primo ed il più diffuso. Esso è scelto per la sua stabilità e perché non assorbe luce nello spettro di lavoro del colorante (infatti risulta bianco alla vista).

Lo spessore dello strato di biossido di titanio non deve superare i 40 – 50  $\mu\text{m}$ : se ciò avviene, solo le molecole superficiali di colorante sono attive, ossia assorbono la luce.

Anche per il catalizzatore vale il discorso sul fattore di rugosità fatto per il semiconduttore: maggiore è la sua superficie equivalente, maggiore è il rendimento della cella. Nella letteratura sono stati trovati principalmente due materiali utilizzati come catalizzatori: il platino (scelta spesso scartata per il suo costo elevato) e il carbonio.

## *7.2 Materiali e metodi*

### *7.2.1 Solventi e reagenti*

- Etanolo 95%
- Etanolo assoluto
- Acetone 95%
- $\text{TiCl}_4$
- PMIm-I (1-Propyl-3-methylimidazolium Iodide)
- $\text{I}_2$
- GuSCN (Guanidine thiocyanate)
- BZIm (benzimidazole)
- $\text{MgI}_2$
- MPN (methoxy propionitrile)
- Acqua ultrapura MilliQ;
- hot-melt gasket ionomer Surlyn (Dupont)
- $\text{TiO}_2$  paste
- Acido chenodeossicolico CDCA

### *7.2.2 Strumenti*

- Perkin-ELMER lambda 900
- solar simulator Abet technologies, class A spectral mach
- Buchi Syncore

### *7.2.3 Preparazione delle soluzioni del piano sperimentale e della pasta di P25*

E' stata preparata una soluzione madre di D5 alla concentrazione di  $5 \cdot 10^{-4}$  M, sciogliendo 0,0445 mg di Dye in 200 ml di etanolo assoluto, la quale, opportunamente diluita, è stata utilizzata per sciogliere i mg necessari di CDCA per ottenere le soluzioni richieste dal piano sperimentale (0,314 g in 50 ml per una soluzione di concentrazione 16 mM e 0,157 g in 50 ml per una soluzione di concentrazione 8mM).

Poiché l'unico modo per pesare il P25 con accuratezza consiste nella sospensione della polvere in acido acetico, 0,10067g di P25 sono stati sospesi in 3,0ml di acido acetico a cui corrisponde una concentrazione di  $1,26 \cdot 10^{-3}$ M.

### *7.2.4 Preparazione soluzione $TiCl_4$*

Sono stati prelevati e diluiti in 100 ml in acqua ultra pura (Milli Q) a 0°C 0,44 ml di  $TiCl_4$  ottenendo così una soluzione di concentrazione 0,04 M. La soluzione è stata preparata fresca per ogni esperimento, conservandola in frigo per massimo 1 giorno.

### *7.2.5 Preparazione foto-elettrodi/Deposizione della pasta di $TiO_2$*

Per prima cosa i contro elettrodi sono stati lavati con acetone 95% e poi con etanolo 96% e lasciati asciugare. Sugli elettrodi è stato poi depositato un layer di  $TiO_2$  di 6/7  $\mu$ m attraverso la tecnica Screen-printing, dopo di che sono stati lasciati riposare in un luogo pulito per 15 minuti, così da permettere alla pasta di rilassare e diminuire le irregolarità superficiali e poi sinterizzati. La sinterizzazione avviene ponendo gli elettrodi in una muffola alla temperatura iniziale di 80°C e seguendo il programma di temperatura riportato

in Figura 76. L'area dei film di  $\text{TiO}_2$  è di  $25\text{cm}^2$ . Terminata la sinterizzazione è stato misurato lo spessore dei film mediante un'analisi profilometrica.

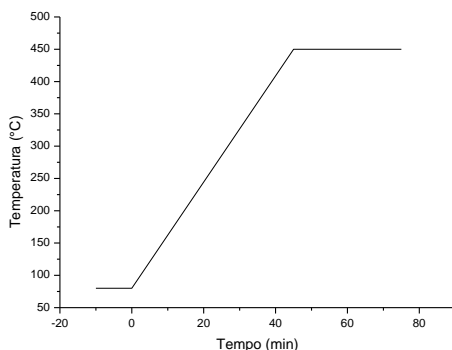


Figura 76

### 7.2.6 Preparazione contro-elettrodi

I contro-elettrodi per le DSSC sono stati preparati mediante decomposizione termica. Questo semplice metodo consiste nella deposizione di una quantità nota di una soluzione alcolica di  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , di concentrazione  $1,25\text{mM}$ , sull'ossido conduttivo (FTO) del substrato, seguito dalla sinterizzazione su piastra a  $500^\circ\text{C}$  per 30 minuti. Il substrato utilizzato, costituito da un supporto in vetro su cui è presente un film nanometrico di FTO, è stato utilizzato anche per la preparazione dei foto-elettrodi.

Gli elettrodi/o/supporti vengono accuratamente lavati con acetone ed etanolo e posizionati su una piastra riscaldante. Iniziata la deposizione gli elettrodi non vanno più spostati fino al termine dell'evaporazione del solvente per evitare la formazione di uno strato di platino non omogeneo.

I contro-elettrodi ottimizzati in questo lavoro (Figura 77) ed utilizzati nel piano sperimentale sono formati/costituiti da tre strati di platino ottenuti mediante la deposizione successiva di  $30$  ( $1^\circ$  deposizione),  $60$  ( $2^\circ$  deposizione) e  $60 \mu\text{L}$  ( $3^\circ$  deposizione) della soluzione alcolica di platino.

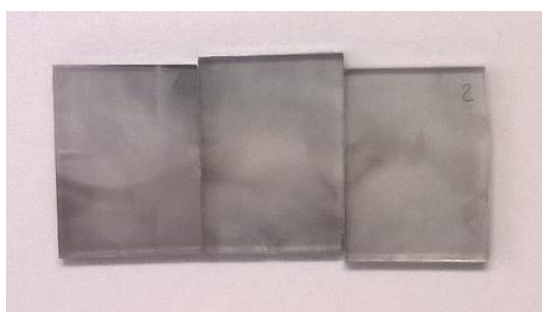


Figura 77

### 7.2.7 Assemblaggio celle

Dopo aver misurato lo spessore dei film di  $\text{TiO}_2$ , gli elettrodi sono stati trattati con una soluzione 0,04M di  $\text{TiCl}_4$ , lavati con etanolo ed acqua e sinterizzati a  $450\text{ }^\circ\text{C}$  per 30 min. Gli elettrodi vengono poi immersi in soluzioni di D5 e CDCA alle condizioni (concentrazione di D5, concentrazione di CDCA, tempo e temperatura) richieste dall'esperimento. Concluso il dye uptake gli elettrodi sono stati lavati con etanolo per assicurare la copertura del film di  $\text{TiO}_2$  con un unico strato di colorante. Il foto elettrodo sensibilizzato e il contro-elettrodo vengono assemblati, secondo la disposizione a sandwich riportata in Figura 78, e sigillati mediante a hot-melt gasket surlyn, che agirà anche da distanziatore fra i due elettrodi definendo così lo spessore elettro-chimicamente attivo del dispositivo.

Le celle così assemblate vengono poste in una camera a vuoto in cui, dopo aver depositato una goccia di elettrolita nel foro del contro-elettrodo, si rimuoverà l'aria per far entrare l'elettrolita nella cella. Infine la camera della cella viene sigillata mediante un'altra maschera di surlyn.

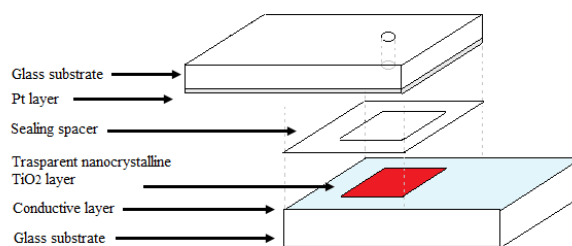


Figura 78: Configurazione delle dye sensitized solar cells

..

### 7.3 Studio dell'adsorbimento di colorante sulla pasta di ossido di titanio P25

Uno degli step più importanti nella fabbricazione di una cella DSSC è il dye uptake, infatti sono molti i fattori che possono influire sull'adsorbimento del colorante, da parte del film di TiO<sub>2</sub> presente sul foto-elettrodo, e quindi sull'efficienza della cella. Si è deciso di semplificare il più possibile il sistema: è stata studiata, mediante l'utilizzo di un piano fattoriale, l'interazione tra il colorante e una pasta di TiO<sub>2</sub> in presenza e in assenza di un antiaggregante (Acido chenodeossicolico, CDCA)

L'esplorazione del dominio sperimentale verrà effettuato mediante un disegno fattoriale completo 2<sup>3</sup> a due livelli (FFD) che ci permetterà di studiare l'effetto dei fattori principali e delle loro interazioni sul sistema considerato. Al numero di esperimenti richiesti dalla relazione 2<sup>k</sup> sono state aggiunte 3 repliche eseguite nel centro del dominio sperimentale, necessarie per la valutazione dell'errore puramente sperimentale e per il controllo della ripetibilità della risposta sperimentale.

Le diverse quantità della pasta di TiO<sub>2</sub> (P25) verranno messe a contatto con le rispettive soluzioni di colorante secondo il disegno fattoriale completo riportato in Tabella 47. Gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di 25°C e al riparo dalla luce.

I piani fattoriali possono essere rappresentati in diversi modi, quello da noi usato prevede la sostituzione del valore minimo di ogni fattore con il segno (-) e del valore massimo con il segno (+).

exp	D5	t	CDCA	D5 [nmol L <sup>-1</sup> ]	T [h]	CDCA [mmol L <sup>-1</sup> ]
1	-	-	-	0.04	4.0	0.0
2	+	-	-	0.40	4.0	0.0
3	-	+	-	0.04	28.0	0.0
4	+	+	-	0.40	28.0	0.0
5	-	-	+	0.04	4.0	16.0
6	+	-	+	0.40	4.0	16.0
7	-	+	+	0.04	28.0	16.0
8	+	+	+	0.40	28.0	16.0
Repliche punto centrale						
9	0	0	0	0.22	16.0	8.0
10	0	0	0	0.22	16.0	8.0
11	0	0	0	0.22	16.0	8.0

Tabella 47: Piano fattoriale 23 sulla pasta di TiO<sub>2</sub>. + e - rappresentano i valori maggiori e minori delle variabili.

La risposta sperimentale studiata è il numero di molecole adsorbite dall'ossido di titanio.



Infatti, trascorsi i tempi stabiliti dal piano sperimentale, le soluzioni verranno centrifugate 2 volte a 3000giri/s per 15min a 26C° per far depositare la pasta di TiO<sub>2</sub>. Si separerà l'ossido dal surnatante, quest'ultimo verrà ulteriormente centrifugato sempre a 3000giri/s per 15min a 26C°. Le varie soluzioni verranno separate in 3 aliquote e filtrate poiché il residuo di P25 potrebbe influire nelle analisi successive.

I valori di concentrazione di queste soluzioni si otterranno mediante analisi spettrofotometrica, da cui si calcolerà il numero di molecole rimaste in soluzione. Il numero di molecole adsorbite dalla pasta di TiO<sub>2</sub> si sono ricavate mediante differenza tra le moli iniziali presenti in soluzione prima del dye uptake e quelle rimaste in soluzione.

In Tabella 48 si riportano le molecole adsorbite dalla pasta di TiO<sub>2</sub> nei diversi esperimenti previsti dal piano sperimentale.

exp	D5	t	CDCA	D5 uptake [mmol L-1]
1	-	-	-	8,1
2	+	-	-	8,4
3	-	+	-	7,3
4	+	+	-	13,5
5	-	-	+	5,7
6	+	-	+	5,2
7	-	+	+	4,4
8	+	+	+	12,0
Repliche punto centrale				
9	0	0	0	8,0
10	0	0	0	8,2
11	0	0	0	8,2

Tabella 48

I risultati riportati in Tabella 48 sono stati usati per il calcolo del modello di regressione con il metodo dei minimi quadrati ordinari (OLS ordinary least-squares), che permette di ottenere l'equazione che correla i risultati sperimentali, cioè la quantità di D5 adsorbito, ai fattori sperimentali e alle loro interazioni. I fattori rilevanti sono stati determinati mediante un t-test di Student, in cui ogni coefficiente di regressione è stato comparato con l'errore standard moltiplicato per l'opportuno valore della t di Student; nel presente caso risulta 2,92 poiché è stato considerato un livello di confidenza del 95% e i gradi di libertà sono tre. Di seguito si riporta il modello di regressione ottenuto:

$$Y = 8,11 + 1,69 \cdot D5 + 1,24 \cdot t - 1,25 \cdot CDCA + 1,73 \cdot D5 \cdot t \quad \text{Equazione 1}$$

I valori riportati nell'equazione 1 rappresentano il numero di molecole di D5 [10<sup>16</sup>] adsorbite per mg di TiO<sub>2</sub>. Il modello di regressione riportato nell'equazione 1 indica i fattori rilevanti e il loro effetto sull'adsorbimento del colorante. Più alto è il valore del

coefficiente maggiore sarà l'effetto del fattore sul responso. + o – indicano un aumento o una diminuzione dell'uptake del D5. Tutti i fattori principali risultano rilevanti: la concentrazione di D5 e il tempo di contatto hanno un effetto positivo sul sistema, contrariamente alla concentrazione del CDCA che ha un effetto negativo. L'interazione tra i fattori ci permette di descrivere gli effetti simultanei, sinergici o antagonistici, esercitati dai fattori sul sistema. In questo caso, solo l'interazione tra la concentrazione di D5 e il tempo t risulta rilevante.

La tabella due vie riportata in Tabella 49 è stata costruita utilizzando le medie di ogni coppia di combinazioni dei valori presi in esame e si riferisce all'interazione D5t.

D5 uptake [ $10^{16}$ molec mg <sup>-1</sup> ]		
D5 +(0,40mmolL <sup>-1</sup> )	6.8	12.7
D5-(0,04mmolL <sup>-1</sup> )	6.9	5.9
	4,0h	28,0h
	t (h)	

Tabella 49

Il D5 e t mostrano un effetto sinergico, infatti il maggiore dye uptake è stato ottenuto, come ci si aspettava, per alte concentrazioni di colorante e alti tempi di contatto. Sotto queste condizioni, l'effetto sinergico è dominante rispetto alla concentrazione di CDCA, infatti non sono state registrate variazioni rilevanti nel dye uptake in presenza o in assenza di CDCA, come si può notare dagli esperimenti 4 e 8 riportati in Tabella 48. Entrambe le condizioni intermedie (bassi tempi di contatto e alta concentrazione di D5 o lunghi tempi di contatto e bassa concentrazione di D5) portano ad una diminuzione del dye uptake rispetto alla condizione bassi tempi e bassa concentrazione di D5.

Per determinare l'adeguatezza del modello di regressione e quindi la sua significatività si è eseguito anche il *test F*. Il valore di F calcolato risulta *minore* del valore tabulato ( $F_{1,v,\alpha}$ ) per v gradi di libertà (corrispondenti agli n-1 gradi di libertà dell'errore sperimentale cioè delle repliche al centro che nel nostro caso sono 3-1=2 gradi di libertà). Il modello utilizzato descrive pienamente il sistema studiato e non sono necessari effetti dei fattori di ordine superiore per descrivere il sistema.

#### *7.4 Studio dell'assorbimento del colorante su foto-elettrodi commerciali per DSSC*

Dopo aver studiato l'effetto della concentrazione del D5, dell'anti aggregante e del tempo di contatto sull'adsorbimento del colorante sulla pasta di TiO<sub>2</sub>, si è deciso di effettuare un analogo piano fattoriale 2<sup>3</sup> su foto-elettrodi commerciali per DSSC.

Anche in questo caso al numero di esperimenti richiesti dalla relazione 2<sup>k</sup> sono state aggiunte 3 repliche eseguite nel centro del dominio sperimentale, necessarie per la valutazione dell'errore puramente sperimentale e per il controllo della costanza della risposta della metodica analitica utilizzata.

In Tabella 50 si riporta il piano sperimentale 2<sup>3</sup> effettuato:

<b>Exp</b>	<b>t</b>	<b>D5</b>	<b>CDCA</b>	<b>t(h)</b>	<b>D5 (M)</b>	<b>CDCA(mM)</b>
<b>1</b>	-	-	-	8	5·10 <sup>-5</sup>	0
<b>2</b>	+	-	-	24	5·10 <sup>-5</sup>	0
<b>3</b>	-	+	-	8	5·10 <sup>-4</sup>	0
<b>4</b>	+	+	-	24	5·10 <sup>-4</sup>	0
<b>5</b>	-	-	+	8	5·10 <sup>-5</sup>	16
<b>6</b>	+	-	+	24	5·10 <sup>-5</sup>	16
<b>7</b>	-	+	+	8	5·10 <sup>-4</sup>	16
<b>8</b>	+	+	+	24	5·10 <sup>-4</sup>	16
<b>Repliche punto centrale</b>						
<b>9</b>	0	0	0	16	1·10 <sup>-4</sup>	8
<b>10</b>	0	0	0	16	1·10 <sup>-4</sup>	8
<b>11</b>	0	0	0	16	1·10 <sup>-4</sup>	8

**Tabella 50**

Le 8 soluzioni previste dal piano verranno tenute in contatto con i foto-elettrodi per i tempi previsti da ogni esperimento. Le soluzioni poste a contatto con i foto-elettrodi verranno analizzate mediante spettrometro UV-VIS, per poter risalire per differenza alle molecole di colorante assorbite dallo strato di ossido.

In Tabella 51 si riporta il numero di molecole adsorbite dai foto-elettrodi nei vari esperimenti del piano fattoriale.

Exp.	t	D5	CDCA	Molecole ads. 1cm <sup>2</sup>
1	-	-	-	4,0
2	+	-	-	3,5
3	-	+	-	56,3
4	+	+	-	35,7
5	-	-	+	5,3
6	+	-	+	6,3
7	-	+	+	51,3
8	+	+	+	60,8
<b>Repliche punto centrale</b>				
9	0	0	0	29,1
10	0	0	0	28,9
11	0	0	0	29,2

Tabella 51

In questo caso l'uptake del colorante verrà espresso come numero di molecole adsorbite per cm<sup>3</sup> di TiO<sub>2</sub>, conoscendo lo spessore dei film di TiO<sub>2</sub>, depositati sui foto-elettrodi, (6,5±0,4µm).

Di seguito si riporta il modello di regressione ottenuto:

$$Y = 28,2 + 23,1 \cdot D5 + 3,0 \cdot CDCA + 3,96 \cdot t \cdot CDCA + 2,0 \cdot D5 \cdot CDCA + 3,6 \cdot t \cdot D5 \cdot CDCA$$

Equazione 2

I valori riportati nell'equazione 2 rappresentano il numero di molecole [10<sup>19</sup>] adsorbite per cm<sup>3</sup> di TiO<sub>2</sub>. Gli unici fattori principali rilevanti, con effetto positivo, sono il D5 e il CDCA. Le interazioni a due significative sono t-CDCA e D5-CDCA e presentano entrambe un effetto positivo. Le informazioni contenute nell'interazione a tre possono essere efficacemente estratte mediante un metodo grafico che considera tutte le possibili tabelle a due vie.

	<b>D5 +</b>		<b>D5-</b>	
<b>CDCA+(16mM)</b>	51,3	60,8	5,3	6,3
<b>CDCA-(0mM)</b>	56,3	35,7	4,0	3,5
	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>8</b>	<b>24</b>
	t (h)			

Tabella 52: Tabella a due-vie che illustra l'interazione D5-CDCA-t, fissando i valori (+) e (-) del fattore D5.

Come si può osservare dalla Tabella 52, in cui si riporta l'interazione D5-CDCA-t, gli adsorbimenti maggiori si ottengono quando la concentrazione di D5 è alta (+).

Questo comportamento è causato dalla polidispersità del substrato di TiO<sub>2</sub>. A tempi bassi in assenza di CDCA, gli effetti cinetici prevalgono e i siti meno stabili e più accessibili vengono saturati. Al contrario, a tempi lunghi viene raggiunto l'equilibrio termodinamico,

quindi i siti stabili vengono saturati a discapito dei siti meno stabili. A valori bassi di D5 (-) (tabella 7, destra) i migliori risultati si ottengono a valori alti (+) di CDCA e t, ma il valori di D5 adsorbiti sono molto bassi e comparabili con l'errore sperimentale, quindi le variazioni registrate non possono essere considerate statisticamente significative.

Anche in questo caso il risultato del test F è negativo, il modello utilizzato descrive pienamente il sistema studiato e non sono necessari effetti dei fattori di ordine superiore per descrivere il sistema.

Il diverso effetto della concentrazione del CDCA sullo stato di TiO<sub>2</sub> sui foto-elettrodi e sulla polvere può essere spiegato dalle diverse condizioni di diffusione e dallo spazio disponibile per le molecole di D5 nei due campioni. Nella pasta di TiO<sub>2</sub>, le nano particelle sono sospese nel solvente senza limitazioni nella diffusione e sono facilmente accessibili alle molecole di D5. Allo stesso tempo, a concentrazioni dell'ordine di 10<sup>-4</sup>M, gli effetti di aggregazione sono limitati sia in presenza che assenza di CDCA. Al contrario, sui foto-elettrodi, lo spazio disponibile è minore e la diffusione diventa lo step limitante e si viene a stabilire un compromesso tra gli effetti cinetici e termodinamici. Le molecole di D5 saranno vicine le une con le altre, e questo faciliterà la formazione di dimeri ed aggregati. In questa situazione l'effetto del CDCA come antiaggregante diventa importante per l'ottimizzazione del dye uptake, specialmente ad alte concentrazioni di D5 ed alti tempi di contatto.

## 7.5 *Analisi termo gravimetriche*

La spettroscopia UV-Vis fin qui utilizzata ci ha permesso di misurare, in maniera precisa ma indiretta, il numero di molecole adsorbite dalle soluzioni di TiO<sub>2</sub> e dai foto-elettrodi. Si è quindi deciso di validare questo metodo misurando la quantità di colorante adsorbita mediante analisi termo gravimetrica. La TGA pur essendo una tecnica diretta risulta meno precisa rispetto alla spettroscopia UV-Vis e non può essere applicata ai foto-elettrodi in maniera non distruttiva.

I campioni analizzati sono i seguenti: D5, CDCA, il biossido di titanio (P25), polvere di TiO<sub>2</sub> sensibilizzata in presenza/assenza del CDCA nelle stesse condizioni degli esperimenti 4 (+ + -) e 6 (+ - +) del piano riportato in Tabella 48 che corrispondono ai maggiori uptake in presenza/assenza dell'acido.

Dalle analisi spettroscopiche si è ottenuto un adsorbimento  $1.0 \cdot 10^{17}$  molecole di colorante per 3.0mg di TiO<sub>2</sub>. Se si considera il peso molecolare del colorante, questo corrisponde ad

una perdita in peso del 2.7%. I dati ottenuti dalle analisi termo gravimetriche indicano una perdita in peso che varia dal 3 al 6% a seconda delle condizioni di adsorbimento. Questi valori, essendo dello stesso ordine di grandezza rispetto a quelli ottenuti dalle precedenti analisi, confermano la validità della spettroscopia UV-Vis per quanto tecnica indiretta. In Figura 79 si riportano i profili termici dei tre campioni puri: D5, CDCA e P25.

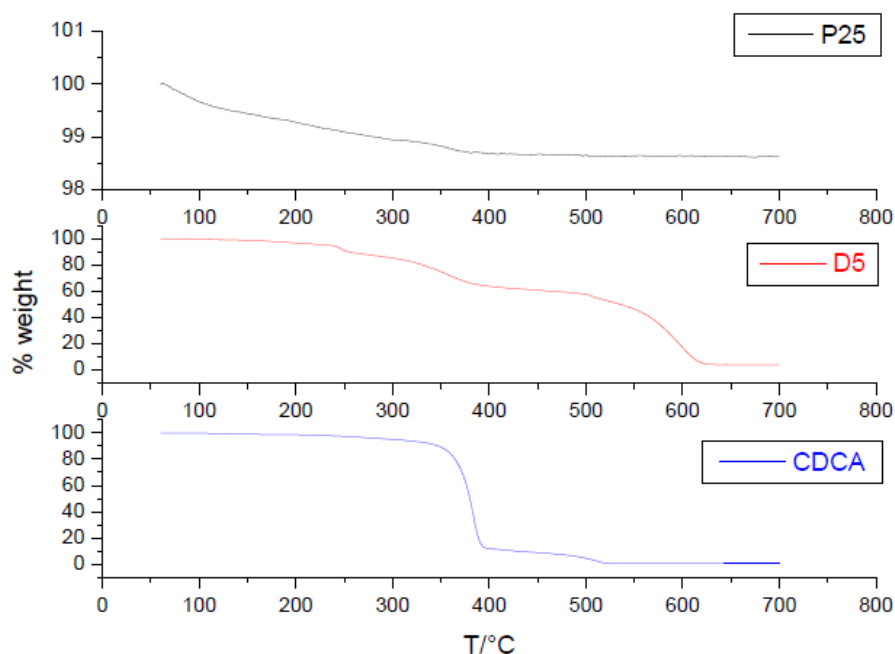


Figura 79

Come aspettato il P25 mostra il desorbimento, fino alla temperatura di 150-200°C, dell'acqua fisisorbita e una lenta e regolare perdita di peso durante il riscaldamento, dato dai siti di condensazione, portando ad una perdita in peso del 1.36%.

Il profilo termico del D5 presenta molti fenomeni degradativi. Il primo alla temperatura di 100°C con una perdita in peso del 4.8%, con il massimo della velocità di degradazione a 196°C (DTG ottenuto derivando la curva). Il secondo nel range di temperatura di 215-280°C con una perdita in peso del 8.3% e il massimo della velocità di degradazione a 247°C. Il terzo step porta ad una perdita in peso del 26.5 % in peso con velocità massima a 358°C nel range 280-450°C. Lo step successivo presenta una ripida diminuzione del peso nel range 460-530°C (509°C in DTG) con una perdita in peso del 6.0%, mentre la degradazione finale avviene dai 530 ai 650°C, portando ad una perdita del 4.1% in peso, con il massimo di velocità a 595°C.

In Figura 80 si riportano i profili termici dei campioni D5-P25-CDCA e D5-P25.

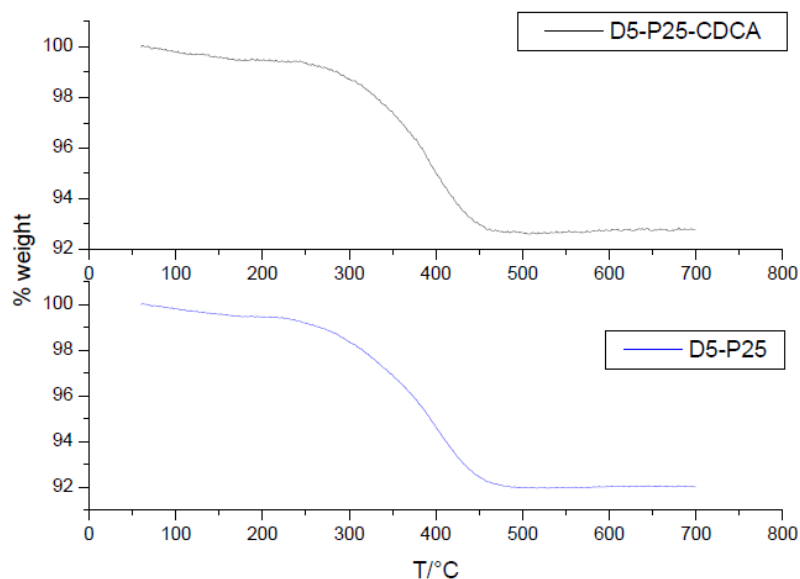


Figura 80

Quando il colorante è adsorbito sul biossido di titanio si hanno fenomeni diversi. Innanzi tutto il campione presenta meno acqua fisisorbita sulla superficie, perdendo di conseguenza meno peso rispetto al P25 puro. La degradazione inizia a 240°C, e la comparazione tra le curve TG e DTG dei due campioni mostrano differenze significative. Infatti la perdita di peso totale si osserva in una ampia degradazione dai 240 ai 530°C (con il picco DTG a 390°C). La perdita di peso finale corrisponde al 7.4% del campione.

I profili TGA del P25 e del colorante adsorbito sul P25 sono significativamente diversi. L'interazione chimica tra il colorante e il substrato è dimostrata dalla differenza nel profilo termico di degradazione del D5 puro rispetto al D5 adsorbito sul P25. Quindi il contatto non dà origine ad una miscela fisica ma ad un sistema con forti interazioni interfacciali, in grado di modificare significativamente i profili termici di degradazione.

Considerando la perdita in peso del P25 puro (1.4%), del D5 adsorbito (7.4%) e la degradazione del D5 (95.9%) si può stimare il numero di molecole di D5 adsorbite per grammo di P25, che è pari a  $9.0 \cdot 10^{19}$  molec g<sup>-1</sup>.

L'acido chenodeossicolico presenta la prima perdita in peso del 1.0% tra i 60 e i 150°C, con la velocità massima di degradazione alla temperatura di 115°C, e una seconda degradazione a 215°C che porta ad una perdita in peso del 88.7% del campione. Lo step finale di decomposizione avviene tra i 430 e i 550°C con il picco DTG a 514°C.

La presenza del CDCA durante l'uptake del colorante porta ad una maggiore perdita in peso e ad un leggero shift di tutti i processi di degradazione verso temperature più basse. Infatti l'inizio della degradazione viene anticipato di 20°C rispetto al sistema D5-P25 e la temperatura corrispondente alla velocità massima di degradazione viene anticipata di 9°C.

Se si comparano i sistemi D5-P25-CDCA e D5-P25 si osserva una differenza in peso del 0.68% causato dalla presenza del CDCA. Si è quindi stimato un rapporto di circa 1:10 tra il CDCA e il D5 sulla superficie della titania.

## *7.6 Razionalizzazione delle fasi di preparazione delle celle- Valutazione dell'efficienza*

Al fine di valutare, oltre all'uptake del colorante, anche l'efficienza di funzionamento della cella DSSC è stato pianificato un lavoro che mirava a razionalizzare anche tutte le fasi di preparazione della celle stesse.

In particolare sono stati presi in considerazione i seguenti aspetti:

5. La verifica della riproducibilità nella procedura di assemblaggio delle celle;
6. La valutazione dell'influenza sull'efficienza dell'utilizzo di elettrodi attivati e non;
7. L'influenza della natura dell'elettrolita sull'efficienza;
8. La valutazione dell'efficacia del trattamento  $TiCl_4$  sui foto-elettrodi.
9. Valutazione di contro-elettrodi prodotti in laboratorio e non

### *7.6.1 Verifica della riproducibilità nella procedura di assemblaggio delle celle*

Sono stati effettuati 3 esperimenti, di nome A, B e C, nelle seguenti condizioni: tempo "t" di contatto elettrodo soluzione 16h, concentrazione dell'antiaggregante "CDCA" 8mM, concentrazione di colorante "D5"  $8 \cdot 10^{-5}M$ , temperatura "T" del sistema  $25^{\circ}C$  ed utilizzo di foto-elettrodi attivati (tutti i passaggi sulla preparazione/attivazione degli elettrodi e sull'assemblaggio delle celle solari è riportata nel paragrafo 7.2.7 del capitolo Materiali e Metodi). Per ogni esperimento sono stati messi a contatto 3 elettrodi con 10 ml di soluzione di D5 e CDCA nelle condizioni sopra riportate. Le tre provette sono quindi state poste in una camera di reazione Buchi Syncore che, oltre al controllo della temperatura, ci ha permesso di tenere sotto agitazione le soluzioni per il tempo richiesto dall'esperimento. Oltre alle tre prove già descritte è stata aggiunta una prova senza elettrodi, con funzione di prova di controllo. Questa soluzione ci permetterà di valutare le variazioni di concentrazione indipendenti dall'adsorbimento da parte degli elettrodi. Terminato il tempo



t previsto dall'esperimento si è proceduto all'assemblaggio delle celle riducendo al minimo l'esposizione alla luce e all'aria che avrebbe influenzato in maniera negativa l'efficienza. L'elettrolita usato in questi esperimenti è L'HSE DyeSol. Le soluzioni vengono poi misurate, dopo il contatto con gli elettrodi cioè il "dipping", mediante analisi Uv-Vis per poter così conoscere, per differenza con la concentrazione iniziale e il numero di molecole di D5 adsorbite mediamente da ciascun elettrodo. L'efficienza delle celle è stata misurata dopo 24, 48, 72, 144 e 240 ore dopo l'assemblaggio. In Tabella 53 si riportano gli spessori, ottenuti mediante analisi profilometrica, dei film di TiO<sub>2</sub> degli elettrodi utilizzati.

nome	Exp	Spessore (µm)
M5	A	5,5
I3		5,6
D3		5,5
E3	B	5,4
L3		5,6
G5		5,5
M4	C	5,5
G4		5,5
N5		5,5

Tabella 53

In Tabella 54 si riportano le concentrazioni e il numero di molecole adsorbite dagli elettrodi con le rispettive deviazioni standard e la DSR %:

Campione	Concentrazione (448nm)	DSR (%)	N. molecole ads.	DSR (%)	n. molecole Ads. per elettrodo	DSR (%)
<b>A</b>	$(62,67 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$	0,14	$(26,0 \pm 0,5) \cdot 10^{15}$	1,98	$(8,67 \pm 0,17) \cdot 10^{15}$	1,98
<b>B</b>	$(62,61 \pm 0,02) \cdot 10^{-6}$	0,03	$(26,3 \pm 0,1) \cdot 10^{15}$	0,37	$(87,8 \pm 0,3) \cdot 10^{14}$	0,37
<b>C</b>	$(62,37 \pm 0,03) \cdot 10^{-6}$	0,04	$(27,8 \pm 0,2) \cdot 10^{15}$	0,58	$(92,7 \pm 0,5) \cdot 10^{14}$	0,58

Tabella 54

In Tabella 55 si riportano le efficienze misurate per le 9 celle dopo 24, 48, 72, 144 e 240 ore, le misure sono state replicate 4 volte. Come si può osservare dalla tabella 55 le deviazioni standard percentuale non superano il 1.92 %, e tendono a rimanere costanti con il passare delle ore. Si ha quindi una buona riproducibilità sulla misura dell'efficienza, che non viene influenzata con il trascorrere delle ore (almeno fino a 240 ore). L'efficienza delle celle N5, M5 e L3 diminuisce con il passare dei giorni, questo può essere dovuto al non corretto assemblaggio delle celle.

nome	24h	48h	72h	144h	240h
------	-----	-----	-----	------	------

	media	RDS%	media	RDS%	Media	RDS%	Media	RDS%	Media	RDS%
<b>M5</b>	2.996	0.71	2.968	0.73	2.86	1.07	2.58	0.72	2,64	0,90
<b>I3</b>	2.974	1.42	3.059	0.98	3.09	0.39	3.13	0.76	3,15	0,61
<b>D3</b>	2.987	1.30	3.047	0.70	3.04	0.95	2.88	0.82	2,81	0,91
<b>E3</b>	2.875	1.14	2.923	0.73	2.95	0.64	2.89	0.74	2,82	0,73
<b>L3</b>	2.659	1.41	2.759	0.66	2.77	1.12	2.63	0.48	2,50	1,11
<b>G5</b>	2.654	1.24	2.722	1.00	2.77	0.36	2.81	0.55	2,83	0,71
<b>M4</b>	2.773	1.60	2.814	0.98	2.84	0.83	2.81	0.91	2,87	1,17
<b>G4</b>	2.897	1.92	2.929	1.18	2.94	0.76	2.94	1.54	3,00	0,85
<b>N5</b>	2.848	1.53	2.858	1.02	2.81	0.69	2.60	1.21	2,55	0,09

Tabella 55

In Tabella 56 si riportano le medie totali, con rispettive deviazioni standard e DSR %, per ogni giorno di misura. Si è raggiunta una buona riproducibilità nell'assemblaggio delle celle DSSC infatti le deviazioni standard relative % vanno da un minimo di 3,9 ad un massimo di 7,1 %.

	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>144h</b>	<b>240h</b>
<b>Media <math>\eta</math></b>	2,851	2,898	2,895	2,808	2,796
<b>Dev. Standard</b>	0,131	0,116	0,113	0,176	0,199
<b>DSR %</b>	4,592	4,012	3,911	6,279	7,128

Tabella 56

Si riportano in Tabella 57 i valori di VOC, ISC e del f.f. misurati dopo 144h dall'assemblaggio delle celle.

	<b>f.f.</b>	<b>DSR (%)</b>	<b>VOC (V)</b>	<b>DSR (%)</b>	<b>ISC (mA)</b>	<b>DSR (%)</b>
<b>M5</b>	0,741	0,389	0,703	0,082	1,236	0,541
<b>I3</b>	0,700	1,100	0,682	0,220	1,665	0,201
<b>D3</b>	0,716	0,197	0,691	0,205	1,454	0,656
<b>E3</b>	0,710	0,422	0,678	0,147	1,501	0,394
<b>L3</b>	0,731	0,409	0,677	0,148	1,326	0,249
<b>G5</b>	0,718	0,377	0,663	0,151	1,475	0,369
<b>M4</b>	0,697	0,318	0,661	0,195	1,525	0,984
<b>G4</b>	0,687	0,481	0,666	0,397	1,60	0,813
<b>N5</b>	0,728	0,695	0,692	0,361	1,287	0,796

Tabella 57

In Figura 81 si riportano come esempio la curva di I-V e P-V e di una delle celle del gruppo B (cella I3). La cella riportata presenta una VOC di 0,69V, ISC di -1,604 mA, JSC di -6,41mA cm<sup>-2</sup>, un fill factor di 0,71 e una efficienza di 3,152.

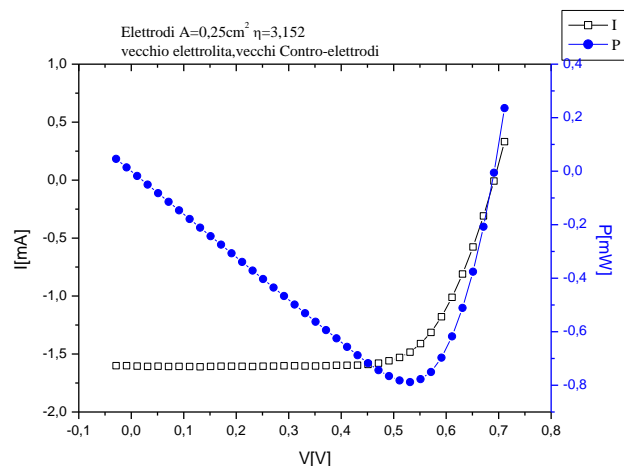


Figura 81 Curve I-V e P-V della cella I3 gruppo B

### 7.6.2 Valutazione dell'influenza sull'efficienza dell'utilizzo di elettrodi attivati e non

Dopo aver verificato la riproducibilità sul sistema di assemblaggio delle celle, il passo successivo consiste nel vedere se l'uso di elettrodi attivati o non può influire sull'efficienza delle DSSC. Sono stati effettuati 4 esperimenti, nelle stesse condizioni usate in precedenza, due con elettrodi attivati e due con elettrodi non attivati. In questo caso nella camera di reazione sono state posizionate 3 prove di controllo. In Tabella 58 si riporta la disposizione delle 4+3 prove nella camera di reazione, in questo modo si potrà misurare, se presente, l'influenza della posizione nella camera sull'adsorbimento del colorante e poi sull'efficienza della cella. Anche in questo caso si mettono in contatto 10 ml della soluzione di D5 con tre elettrodi.

		5	
	1	3	7
	4	2	
	6		

Tabella 58

In Tabella 59 si riportano le concentrazioni e il numero di molecole delle soluzioni madre e di controllo, mentre in Tabella 60 si riportano le concentrazioni e il numero di molecole adsorbite dagli elettrodi:

Campione	Concentrazione (448nm)	N. molecole	DSR (%)
Soluzione madre	$(8,69 \pm 0,02) \cdot 10^{-5}$	$(52,8 \pm 0,1) \cdot 10^{16}$	0,197

<b>Soluzione di controllo 1</b>	$(842,24 \pm 0,06) \cdot 10^{-7}$	$(50,72 \pm 0,04) \cdot 10^{16}$	0,071
<b>Soluzione di controllo 2</b>	$(832,00 \pm 0,06) \cdot 10^{-7}$	$(50,10 \pm 0,04) \cdot 10^{16}$	0,072
<b>Soluzione di controllo 3</b>	$(83,32 \pm 0,01) \cdot 10^{-6}$	$(50,14 \pm 0,06) \cdot 10^{16}$	0,121

Tabella 59

<b>Campione</b>	<b>Concentrazione (448nm)</b>	<b>N. molecole ads.</b>	<b>n. molecole Ads. per elettrodo</b>	<b>DSR (%)</b>
<b>P1</b>	$(76,34 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$	$(4,35 \pm 0,05) \cdot 10^{16}$	$1,45 \cdot 10^{16}$	1,14
<b>P2</b>	$(76,32 \pm 0,03) \cdot 10^{-6}$	$(4,36 \pm 0,02) \cdot 10^{16}$	$1,45 \cdot 10^{16}$	0,37
<b>P3</b>	$(80,68 \pm 0,06) \cdot 10^{-6}$	$(1,73 \pm 0,04) \cdot 10^{16}$	$5,78 \cdot 10^{15}$	2,27
<b>P4</b>	$(7,60 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$	$(4,57 \pm 0,33) \cdot 10^{16}$	$1,52 \cdot 10^{16}$	7,32

Tabella 60

In Tabella 61 si riportano le efficienze misurate per le 12 celle dopo 24, 120 e 144 ore, le misure sono state replicate 4 volte. Anche in questo caso gli DSR non peggiorano con il passare dei giorni. Si sono riscontrati dei problemi nell'assemblaggio delle celle P1C, P3A e P3C, di conseguenza non è stato possibile misurarne l'efficienza. Le celle degli esperimenti P1 e P3 sono state assemblate con elettrodi non attivati.

<b>Nome prova</b>	<b>24h</b>		<b>120h</b>		<b>144h</b>	
	$\eta$ (%)	<b>DSR (%)</b>	$\eta$ (%)	<b>DSR (%)</b>	$\eta$ (%)	<b>DSR (%)</b>
<b>P1A</b>	2,07	2,71	2,17	2,79	1,86	0,92
<b>P1B</b>	2,19	2,51	2,25	1,61	1,76	1,58
<b>P2a</b>	2,58	4,16	2,76	3,60	2,23	1,60
<b>P2b</b>	2,91	2,06	2,86	2,38	1,10	2,16
<b>P2c</b>	3,15	0,87	3,06	1,89	0,98	8,35
<b>P3B</b>	1,84	2,83	2,19	1,36	1,46	2,91
<b>P4A</b>	3,00	2,54	3,07	2,00	2,99	0,82
<b>P4B</b>	3,12	1,39	3,03	1,34	1,11	1,78
<b>P4C</b>	3,17	1,93	2,27	1,79	3,07	0,72

Tabella 61

In Tabella 62 si riportano i valori di  $V_{OC}$ , f.f. e di  $I_{SC}$  misurati dopo 24 ore.

	<b>f.f.</b>		<b><math>V_{OC}</math> (V)</b>		<b><math>I_{SC}</math> (mA)</b>	
	<b>Media</b>	<b>DSR (%)</b>	<b>Media</b>	<b>DSR (%)</b>	<b>Media</b>	<b>DSR (%)</b>
<b>P1-A</b>	0,703	0,980	0,660	0,208	1,114	2,16
<b>P1-B</b>	0,707	0,670	0,663	0,034	1,171	1,873
<b>P2-A</b>	0,544	2,040	0,682	0,264	1,743	0,661
<b>P2-B</b>	0,627	1,478	0,691	0,093	1,680	0,506
<b>P2-C</b>	0,641	1,395	0,689	0,143	1,764	0,545

<b>P3-B</b>	0,682	1,038	0,657	0,115	1,029	1,740
<b>P4-A</b>	0,626	1,164	0,668	0,360	1,796	1,010
<b>P4-B</b>	0,629	0,390	0,691	0,450	1,794	0,572
<b>P4-C</b>	0,632	1,008	0,688	0,463	1,823	0,503

Tabella 62

L'utilizzo di foto-elettrodi attivati porta ad un aumento in valore assoluto della corrente  $I_{SC}$  e della  $V_{OC}$  ed una diminuzione del f.f. L'aumento della  $|I_{SC}|$  e della  $V_{OC}$  compensano il peggioramento del f.f. portando ad un aumento significativo dell'efficienza, confermato dall'analisi della varianza ANOVA riportato in Tabella 63.

	<b>Gradi di libertà</b>	<b>varianze</b>	<b>F<sub>calc</sub><sup>a</sup></b>
<b>Tra i gruppi</b>	$c-1=1$	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 10,25$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 523,21$
<b>All'interno dei gruppi</b>	$c(n-1)=25$	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0,02$	$F_{tab} = 4,24, \alpha = 0,05$
<b>totale</b>	$nc-1 = 26$	<b>H<sub>0</sub>: <math>\mu_A = \mu_B = \mu_C</math></b>	

Tabella 63

In Figura 82 si riporta come esempio la curva I-V e l'andamento della potenza generata delle celle P4-C e P1-B.

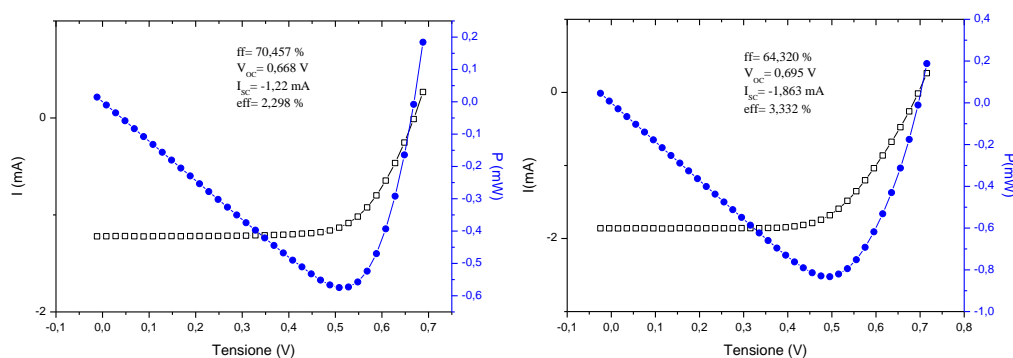


Figura 82. Curve I-V delle celle P4-C e P1-B (120h)

L'effetto dell'attivazione dei foto-elettrodi sul funzionamento delle DSSC si può vedere anche graficamente dal confronto diretto delle curve corrente-tensione, riportate in Figura 83. L'attivazione dei foto-elettrodi porta ad un netto aumento della corrente.

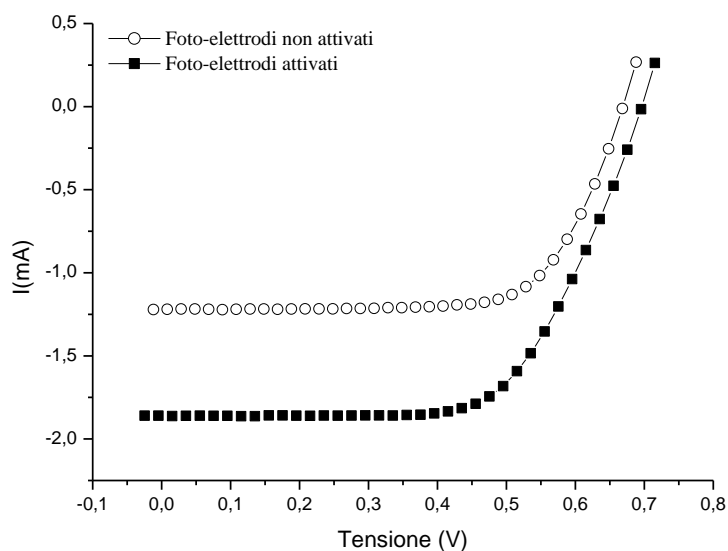


Figura 83

### 7.6.3 Scelta dell'elettrolita

A questo punto, è stato testato un ulteriore elettrolita. Visto che gli elettroliti a base di LiI presentano efficienze maggiori, si effettueranno ulteriori prove sempre nelle stesse condizioni ma con il seguente elettrolita: I<sub>2</sub> 0.05M, TBAI 0.6M, LiI 0.1M e 4-TBP 0.5M in acetonitrile [67].

Sono stati effettuati 6 esperimenti due dei quali con il vecchio elettrolita HSE (1, 2) e 4 con il nuovo elettrolita in ACN (3, 4, 5, 6). In questo esperimento sono stati utilizzati gli elettrodi DyeSol per capire se l'uso di elettrodi commerciali potesse influire sull'efficienza e sulla riproducibilità delle celle. In questo caso da ogni esperimento si otterranno solo 2 celle a causa delle dimensioni maggiori dei foto-elettrodi.

In Tabella 64 si riportano le concentrazioni e il numero di molecole adsorbite dagli elettrodi con le rispettive deviazioni standard e la DSR %:

Campione	Concentrazione (448)	DSR (%)	N. molecole ads.	DSR (%)	n. molecole Ads. per elettrodo	DSR (%)
<b>P1</b>	$(50,45 \pm 0,04) \cdot 10^{-8}$	0,085	$(15,04 \pm 0,03) \cdot 10^{16}$	0,172	$(50,13 \pm 0,09) \cdot 10^{15}$	0,172
<b>P2</b>	$(49,55 \pm 0,07) \cdot 10^{-8}$	0,147	$(15,58 \pm 0,04) \cdot 10^{16}$	0,281	$(5,19 \pm 0,01) \cdot 10^{16}$	0,281
<b>P3</b>	$(50,44 \pm 0,03) \cdot 10^{-8}$	0,060	$(15,04 \pm 0,02) \cdot 10^{16}$	0,122	$(50,14 \pm 0,06) \cdot 10^{15}$	0,122
<b>P4</b>	$(49,24 \pm 0,02) \cdot 10^{-8}$	0,035	$(15,76 \pm 0,01) \cdot 10^{16}$	0,065	$(52,55 \pm 0,03) \cdot 10^{15}$	0,065

			$\cdot 10^{16}$			
<b>P5</b>	$(48,66 \pm 0,14) \cdot 10^{-8}$	0,298	$(16,12 \pm 0,09) \cdot 10^{16}$	0,543	$(53,72 \pm 0,29) \cdot 10^{15}$	0,543
<b>P6</b>	$(49,63 \pm 0,03) \cdot 10^{-8}$	0,070	$(15,53 \pm 0,02) \cdot 10^{16}$	0,135	$(51,66 \pm 0,07) \cdot 10^{15}$	0,135

Tabella 64

L'efficienza è stata misurata subito dopo l'assemblaggio delle celle e dopo 24h. Nella seguente tabella si riportano i valori medi per ogni cella di Voc, Isc, f.f. e dell'efficienza misurati subito dopo l'assemblaggio:

	Voc Media	Isc media	f.f. (%) media	$\eta$ (%)		
				Media	Dev. St.	DSR (%)
1	627.22	-4.39	44.70	1,39	0,16	6.10
	628.13	-4.67	43.49	1,43	0,35	2.92
2	626.12	-4.36	47.10	1,46	0,11	7.56
	631.63	-4.16	47.41	1,41	0,08	6.06
3	637.48	-6.43	42.60	1,99	0,09	4.64
	634.87	-6.74	40.53	1,91	0,10	5.52
4	642.81	-6.50	42.02	2,00	0,08	4.05
	645.12	-6.24	44.05	2,01	0,13	6.51
5	633.06	-6.56	43.64	1,92	0,15	8.06
	631.46	-6.69	40.05	2,06	0,08	4.12
6	638.75	-6.61	42.70	2,05	0,09	4.28
	646.25	-6.42	41.03	1,94	0,20	6.87

Tabella 65

Come si può osservare dalla Tabella 65 e dalla Figura 84 il nuovo elettrolita ha portato ad un lieve aumento in valore assoluto della Voc e della Isc e ad una diminuzione del fill factor tradotto in un aumento medio del 28 % dell'efficienza, (che verrà verificato mediante ANOVA). Quindi l'effetto della corrente e della Voc risultano preponderanti rispetto a quello del f.f.

Quest'ultimi valori di efficienza risultano nettamente inferiori a quelli ottenuti dagli esperimenti precedenti, questo è dovuto dalle dimensioni dell'area attiva del foto elettrodo.

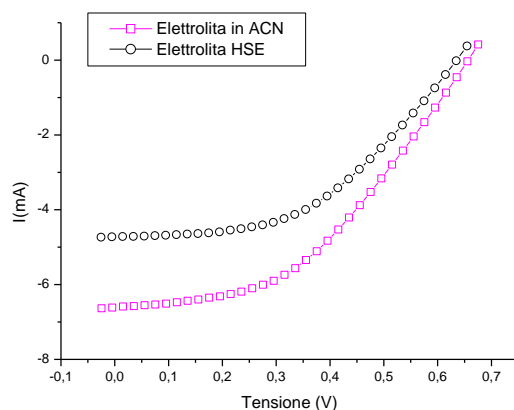


Figura 84

La deviazione standard intra-day varia dal 2.92 al 8.06 % con un valor medio del 5.56%, contro il valor medio di 2.67% ottenuto nel precedente esperimento, media ottenuta dall'efficienze misurate dopo 24 ore dall'assemblaggio delle celle. L'uso di foto elettrodi commerciali ha portato ad una diminuzione dell'efficienza a causa della maggiore dimensione dell'area attiva, e ad un aumento della deviazione standard relativa percentuale (DSR%). Per questi motivi nelle fasi successive sono nuovamente stati utilizzati i foto elettrodi non commerciali caratterizzati da un'area attiva di 0,25 cm<sup>2</sup>

In Tabella 66 si riporta la tabella ANOVA relativa agli esperimenti sopracitati: il valore di  $F_{calc}$  risulta maggiore rispetto al valore di  $F_{tab}$  quindi i due gruppi considerati sono statisticamente differenti, di conseguenza l'uso del nuovo elettrolita porta ad un effettivo miglioramento dell'efficienza delle celle.

	<b>Gradi di libertà</b>	<b>varianze</b>	<b><math>F_{calc}^a</math></b>
<b>Tra i gruppi</b>	$c-1 = 1$	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 2.576$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 215.82$
<b>All'interno dei gruppi</b>	$N_t - c = 43$	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0.012$	$F_{tab} = 4.085, \alpha = 0.05$
<b>totale</b>	$N_t - 1 = 44$	<b><math>H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C</math></b>	

Tabella 66

In Figura 85 si riporta come esempio la curva I-V e P-V delle celle 1 e 6.



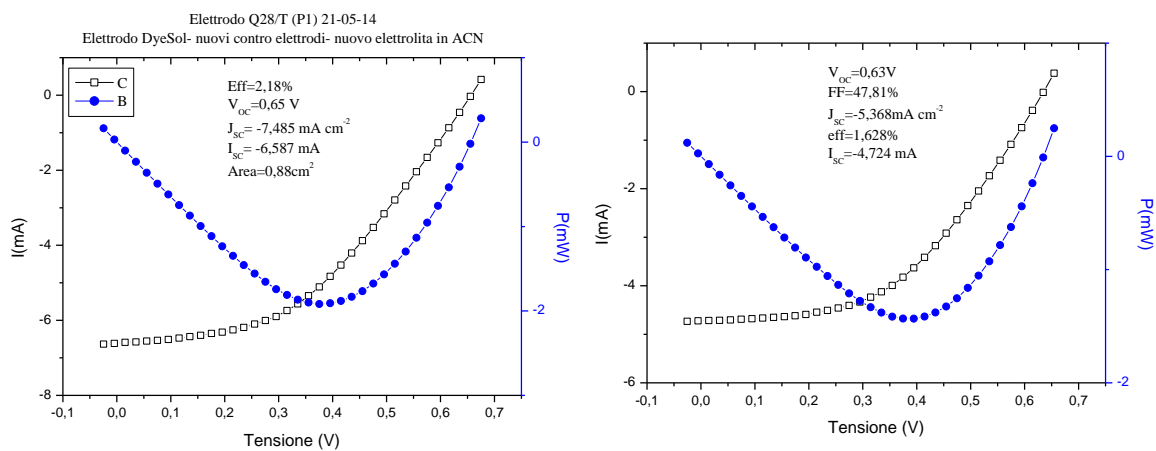


Figura 85

#### 7.6.4 La valutazione dell'efficacia del trattamento $TiCl_4$ sui foto-elettrodi.

Sono stati effettuati 4 esperimenti, da cui si otterranno 3 celle per ognuno, sempre nelle stesse condizioni. Per il primo esperimento sono stati usati foto elettrodi trattati una decina di giorni prima (A), per il secondo elettrodi non trattati (B), per il terzo elettrodi trattati il giorno stesso esattamente prima del dipping (C) e per il quarto elettrodi non trattati ed in questo caso è stato usato il vecchio elettrolita (HSE) per avere un confronto (D), tra i due elettroliti fin ora usati, con i foto elettrodi di nostra produzione.

In Tabella 67 si riportano le concentrazioni e il numero di molecole adsorbite dagli elettrodi con le rispettive deviazioni standard e la DSR %:

Campione	Concentrazione (448)	DSR (%)	N. molecole ads.	DSR (%)	n. molecole Ads. per elettrodo	DSR (%)
A	$(65,26 \pm 0,05) \cdot 10^{-8}$	0,075	$(8,96 \pm 0,02) \cdot 10^{16}$	0,226	$(29,87 \pm 0,07) \cdot 10^{15}$	0,226
B	$(68,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	0,142	$(7,06 \pm 0,07) \cdot 10^{16}$	1,004	$(23,5 \pm 0,2) \cdot 10^{15}$	1,004
C	$(65,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	0,381	$(8,9 \pm 0,1) \cdot 10^{16}$	1,287	$(29,8 \pm 0,4) \cdot 10^{15}$	1,287
D	$(66,89 \pm 0,08) \cdot 10^{-8}$	0,114	$(7,98 \pm 0,08) \cdot 10^{16}$	0,967	$(26,6 \pm 0,3) \cdot 10^{15}$	0,967

Tabella 67

Come si può osservare in Tabella 67 i foto elettrodi trattati presentano un adsorbimento maggiore (15,77%) rispetto a quelli non trattati, risultato confermato anche dall'ANOVA riportata in Tabella 68.

	<b>Gradi di libertà</b>	<b>Deviazioni standard</b>	<b>varianze</b>	<b>F<sub>calc</sub><sup>a</sup></b>
<b>Tra i gruppi</b>	c-1=1	SSA= 2,28 · 10 <sup>31</sup>	MSA= $\frac{SSA}{\frac{c-1}{10^{31}}}$ =2,28·	F= $\frac{MSA}{MSW}$ = 15,45
<b>All'interno dei gruppi</b>	Nt-c=10	SSW=1,48 · 10 <sup>31</sup>	MSW= $\frac{SSW}{\frac{n-c}{10^{30}}}$ =1,48·	F <sub>tab</sub> =4.97, α=0.05
<b>totale</b>	nt-1= 11	SST=8,31 · 10 <sup>31</sup>	<b>H<sub>0</sub>: μ<sub>A</sub> = μ<sub>B</sub> = μ<sub>C</sub></b>	

Tabella 68

Nella seguente tabella si riportano i valori medi per ogni cella di Voc, Isc, f.f. e dell'efficienza misurati subito dopo l'assemblaggio:

	Voc (mV) Media	Isc (mA) media	f.f. (%) media	η (%)		
				Media	Dev. St.	Dev. S. %
A	670.029	-2.014	55.323	2.99	0.02	0.70
	681.149	-2.023	53.428	2.94	0.05	1.65
	689.905	-1.916	53.587	2.84	0.06	2.12
B	813.172	-820.475(μA)	62.073	1.64	0.06	3.90
	683.957	-1.792	57.499	2.82	0.03	1.11
	694.046	-1.635	57.208	2.63	0.02	0.71
C	681.391	-2.113	54.315	3.12	0.05	1.61
	664.176	-1.965	51.951	2.71	0.09	3.45
	670.881	-2.040	56.595	3.08	0.04	1.43
D	658.539	-1.505	60.528	2.40	0.03	1.46
	647.564	-1.617	55.703	2.33	0.06	2.52
	650.345	-1.630	58.728	2.49	0.04	1.74

Tabella 69 esperimento A: elettrodi trattati una settimana prima-ACN, esperimento B: elettrodi non trattati-ACN, esperimento C: elettrodi trattati lo stesso giorno-ACN ed esperimento D: elettrodi non trattati-HSE.

Osservando i dati sopra riportati si può notare come le DSR% (media 1.87 %) siano nettamente inferiori rispetto ai valori ottenuti con gli elettrodi DyeSol (media 5.56%).

L'efficacia del trattamento con TiCl<sub>4</sub> e dell'uso del nuovo elettrolita sono stati verificati mediante test statistici (ANOVA), gli esiti sono riportati nelle tabelle Tabella 70, Tabella 71 e Tabella 72. Il test per il confronto dei due elettroliti, anche se già stato effettuato per i foto elettrodi dyeSol, è riportato in tabella 70 e conferma i dati ottenuti nei precedenti

esperimenti cioè l'uso del nuovo dell'elettrolita porta ad un aumento statisticamente significativo dell'efficienza.

	Gradi di libertà	varianze	$F_{calc}^a$
Tra i gruppi	$c-1=1$	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 0.478$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 58.64$
All'interno dei gruppi	$Nt-c=18$	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0.008$	$F_{tab} = 4.414,$ $\alpha = 0.05$
totale	$nt-1 = 19$	$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C$	

Tabella 70

In Figura 86 si riporta come esempio la curva I-V e l'andamento della potenza generata delle celle B e D.

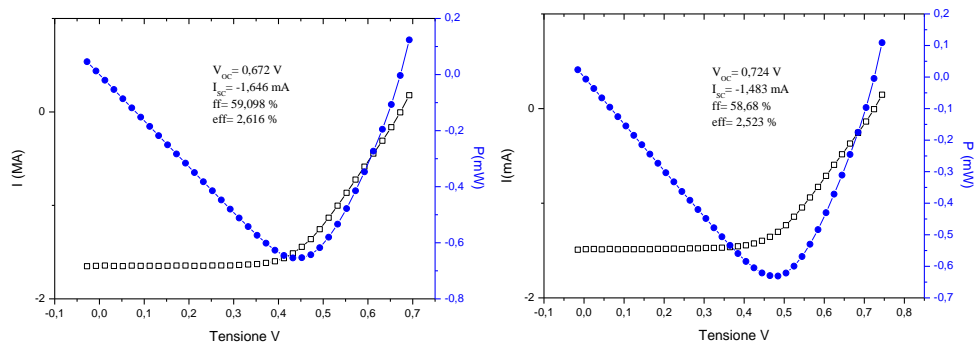


Figura 86

L'effetto dell'elettrolita sul funzionamento delle DSSC si può vedere anche graficamente dal confronto diretto delle curve corrente-tensione, riportate in Figura 87. Confrontando le Figura 84 e Figura 87 si nota che con l'utilizzo di foto-elettrodi di nostra produzione l'effetto positivo, dato dal cambio dell'elettrolita, è minore.

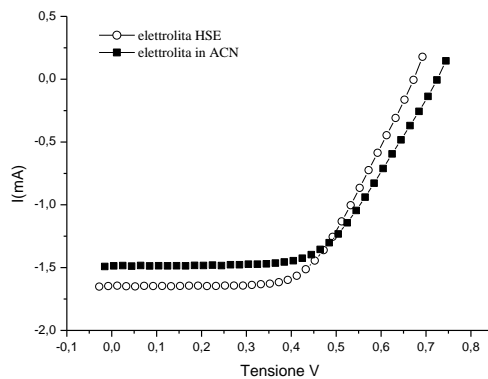


Figura 87

In Tabella 71 invece è riportato il confronto tra i diversi trattamenti subiti dai foto elettrodi. Gli elettrodi dell'esperimento A sono stati trattati una settimana circa prima del dipping, mentre gli elettrodi dell'esperimento C hanno subito il trattamento subito prima del dipping, facendo combaciare il trattamento stesso con l'attivazione. Il trattamento effettuato subito prima dell'immersione dell'elettrodo nelle soluzioni di colorante porta ad un aumento statisticamente significativo dell'efficienza.

	Gradi di libertà	varianze	$F_{calc}^a$
<b>Tra i gruppi</b>	$c-1=1$	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 0.144$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 31.64$
<b>All'interno dei gruppi</b>	$Nt-c=18$	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0.005$	$F_{tab} = 4.301, \alpha = 0.05$
<b>totale</b>	$nt-1 = 19$	$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C$	

Tabella 71

In Figura 88 si riportano come esempio le curve I-V e P-V delle celle C e A.

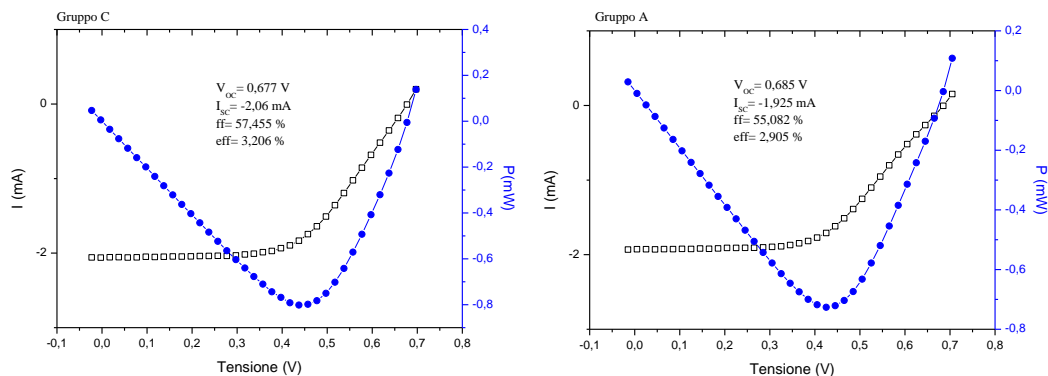


Figura 88

L'effetto del trattamento sul funzionamento delle DSSC si può vedere anche graficamente dal confronto diretto delle curve corrente-tensione, riportate in Figura 89.

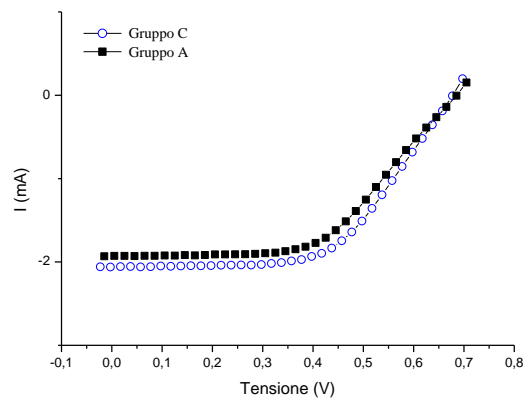


Figura 89

L'ultimo test effettuato confronta i foto elettrodi trattati prima del dipping con quelli non trattati, il risultato del test è riportato in Tabella 72. Il trattamento porta ad un aumento dell'efficienza confermato dal test F, che considera i due gruppi di repliche statisticamente differenti cioè non appartenenti allo stesso gruppo.

	Gradi di libertà	varianze	F <sub>calc</sub> <sup>a</sup>
<b>Tra i gruppi</b>	c-1=1	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 0.558$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 83.59$
<b>All'interno dei gruppi</b>	Nt-c=14	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0.007$	$F_{tab} = 4.600, \alpha = 0.05$
<b>totale</b>	nt-1= 15	$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C$	

Tabella 72

In Figura 90 si riportano come esempio le curve I-V e P-V delle celle B e C.

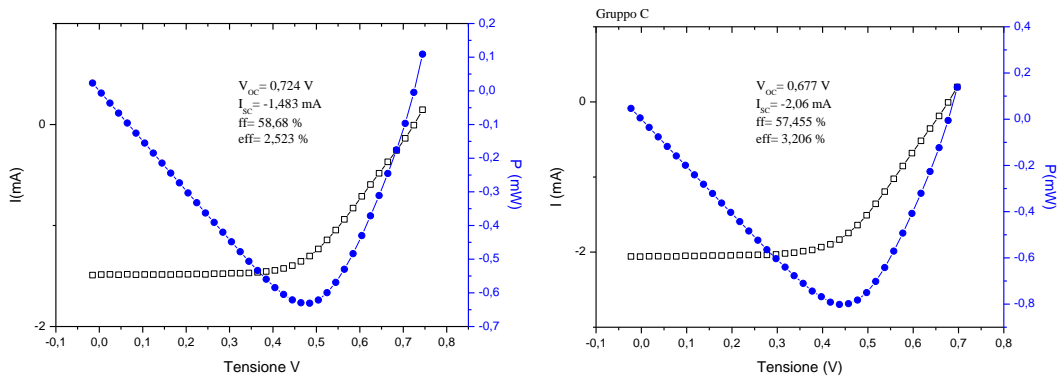
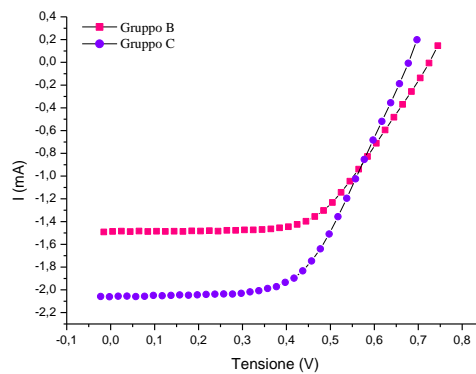


Figura 90

L'effetto del trattamento sul funzionamento delle DSSC si può vedere anche graficamente dal confronto diretto delle curve corrente-tensione, riportate in Figura 91.



**Figura 91**

Come si è potuto osservare da quest'ultimi esperimenti c'è stato un peggioramento nei valori di efficienza, a causa dei contro-elettrodi. Infatti nelle ultime analisi si è riscontrato un netto peggioramento del fill factor. A causa dei problemi nella fabbricazione dei contro-elettrodi da parte di un nostro collaboratore da questo momento in avanti si utilizzeranno contro-elettrodi di nostra produzione.

#### 7.6.5 Valutazione di contro-elettrodi prodotti in laboratorio con differenti metodologie.

Sono stati testati 5 diversi tipi di preparazione di contro-elettrodi ottenuti mediante ripetute deposizioni di differenti quantità di una soluzione di  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  5mM, in modo da determinare il numero ottimale di deposizioni e di quantità deposta, come schematizzato di seguito:

- EXP A: 3 deposizioni di cui le prime due con 30  $\mu\text{l}$  e l'ultima con 60  $\mu\text{l}$  (a)
- EXP B: 3 deposizioni di cui la prima da 30  $\mu\text{l}$  e le restanti da 60  $\mu\text{l}$  (b),(f)
- EXP C: 2 deposizioni da 60  $\mu\text{l}$
- EXP D: 3 deposizioni da 60  $\mu\text{l}$
- EXP E: 4 deposizioni da 60  $\mu\text{l}$

Sono state assemblate 3 celle utilizzando i contro-elettrodi di tipo A e B, mentre sono state assemblate due celle utilizzando i contro-elettrodi di tipo C, D ed E (Tabella 73).

Per tutti i foto-elettrodi, non trattati con la soluzione di  $TiCl_4$ , il dipping è stato effettuato nelle seguenti condizioni: 16h,  $25^\circ C$  e 2,75M di D5 e 8mM di CDCA. Per tutte le celle, indipendentemente dai contro-elettrodi utilizzati è stato usato l'elettrolita HSE DyeSol. In tabella 34 si riportano gli spessori degli elettrodi utilizzati.

exp	repliche	Spessore	D.S.
A	1° cella	5.98	0.13
	2° cella	6.12	0.14
	3° cella	6.00	0.11
B	1° cella	5.88	0.12
	2° cella	6.12	0.07
	3° cella	6.10	0.21
C	1° cella	6.40	0.05
	2° cella	6.41	0.16
D	1° cella	6.42	0.09
	2° cella	6.44	0.16
E	1° cella	6.27	0.10
	2° cella	6.42	0.07

**Tabella 73**

In Tabella 74 si riportano il numero di molecole adsorbite da ogni esperimento effettuato.

Exp	n. molec Ads	D.S	D.S.%
A	$8.15 \cdot 10^{16}$	$4.18 \cdot 10^{14}$	0.51
B	$1.20 \cdot 10^{17}$	$7.42 \cdot 10^{14}$	0.62
C	$4.16 \cdot 10^{16}$	$9.42 \cdot 10^{14}$	2.27
D	$7.13 \cdot 10^{16}$	$9.97 \cdot 10^{14}$	1.40
E	$5.00 \cdot 10^{16}$	$7.14 \cdot 10^{14}$	1.43
F	$3.79 \cdot 10^{17}$	$8.59 \cdot 10^{14}$	0.23

**Tabella 74**

In Tabella 75 si riportano i valori di VOC, ISC, f.f. e l'efficienza media con le rispettive deviazioni standard .

	VOC	ISC	f.f.	$\eta\%$		
				media	D.S.	D.S.%
A	695.408	-1.792	70.713	3.524	0.06	1.81

B	688.439	-1.777	71.134	3.482	0.06	1.87
C	688.570	-1.831	69.518	3.508	0.10	2.82
D	686.021	-1.790	68.707	3.380	0.02	0.59
E	694.345	-1.773	69.557	3.456	0.11	3.21
F	700.472	-1.760	69.724	3.438	0.09	2.57

Tabella 75

Come si può osservare dalla Tabella 75 l'utilizzo di contro-elettrodi di nostra produzione ha portato ad un notevole miglioramento dell'efficienza, dato dall'aumento di tutti e tre i parametri (fil factor, VOC ed ISC).

In Tabella 76 si riporta il confronto tra i contro-elettrodi degli esperimenti A e B, mediate analisi della varianza (ANOVA).

	Gradi di libertà	varianze	F <sub>calc</sub> <sup>a</sup>
<b>Tra i gruppi</b>	c-1=1	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 0.008$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 1,974$
<b>All'interno dei gruppi</b>	Nt-c=16	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0.004$	F <sub>tab</sub> =4,49, α=0.05
<b>totale</b>	nt-1= 17	<b>H<sub>0</sub>: μ<sub>A</sub> = μ<sub>B</sub> = μ<sub>C</sub></b>	

Tabella 76: Confronto, mediante ANOVA, tra le efficienze dei gruppi A (30-30-60 μl) e B (30-60-60 μl).

I contro-elettrodi ottenuti mediante tre deposizioni da 30-30-60μl non differiscono da quelli ottenuti mediante tre deposizioni da 30-60-60 μl, come si può osservare dalla analisi della varianza riportata in Tabella 76.

In Tabella 77 invece si confronteranno le efficienze ottenute utilizzando contro-elettrodi aventi un diverso numero di deposizioni.

	Gradi di libertà	varianze	F <sub>calc</sub> <sup>a</sup>
<b>Tra i gruppi</b>	c-1=2	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 0.025$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 3,323$
<b>All'interno dei gruppi</b>	Nt-c=15	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0.075$	F <sub>tab</sub> =3,68, α=0.05
<b>totale</b>	nt-1= 17	<b>H<sub>0</sub>: μ<sub>A</sub> = μ<sub>B</sub> = μ<sub>C</sub></b>	

Tabella 77

Anche in questo caso il valore calcolato di F risulta minore del valore tabulato per  $\nu_1=1$  e  $\nu_2=16$  gradi di libertà ed un livello di confidenza del 95%. Il numero di deposizioni da 60 μl, nel range considerato (2-4 deposizioni), non influisce sull'efficienza della cella.



In fine in Tabella 78 si riporta il confronto tra i contro-elettrodi ottenuti mediante le deposizioni da 30-30-60  $\mu\text{l}$  /30-60-60  $\mu\text{l}$  e quelli ottenuti dalle 2/3/4 deposizioni da 60  $\mu\text{l}$ .

	Gradi di libertà	varianze	$F_{\text{calc}}^a$
Tra i gruppi	$c-1=2$	$MSA = \frac{SSA}{c-1} = 0.027$	$F = \frac{MSA}{MSW} = 3,908$
All'interno dei gruppi	$Nt-c=34$	$MSW = \frac{SSW}{n-c} = 0.007$	$F_{\text{tab}}=4,17, \alpha=0.05$
totale	$nt-1= 35$	$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C$	

Tabella 78

Anche in questo caso non vi è differenza tra i gruppi considerati. Si può quindi ipotizzare che una volta raggiunta la quantità minima di platino necessaria per il buon funzionamento del contro-elettrodo, l'aumento della quantità di platino o la differenziazione degli strati non influisca sull'efficienza della cella.

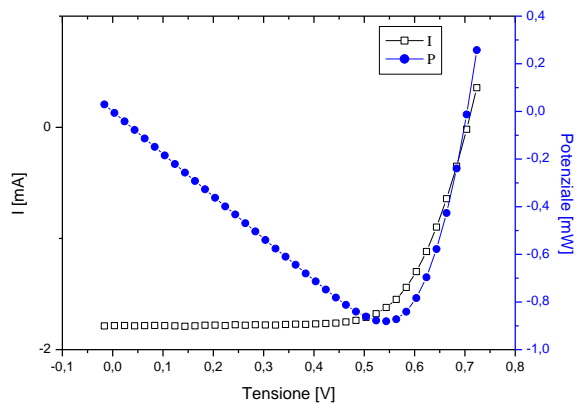


Figura 92

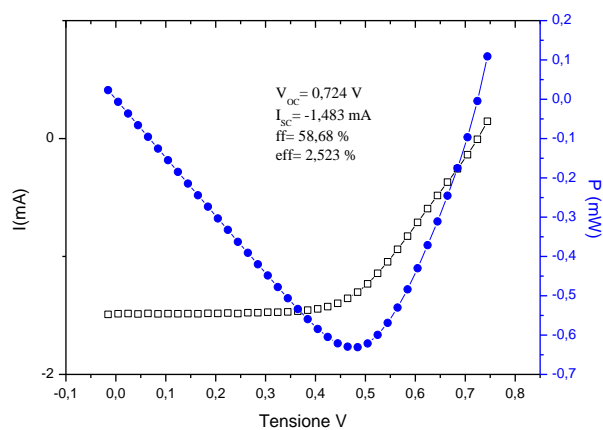


Figura 93

In Figura 92 si riporta a titolo d'esempio le curva I-V e P-V misurate da una cella assemblata con un contro-elettrodo di nostra produzione. Confrontando le curve I-V riportate in figura 92 e 93 si può notare il netto miglioramento della curva data dalla diminuzione della  $R_s$  (Materiali e metodi, I fattori che influenzano l'efficienza delle dye-sensitized solar cell) .

## 7.7 Conclusioni

Dallo studio dell'adsorbimento di un sensibilizzatore poliene-difenilalanina (detto "D5") su ossido di titanio è stato possibile comprendere l'effetto dei fattori determinanti il successo del processo di deposizione (Dye uptake), fondamentale per il funzionamento della cella fotovoltaica DSSC.

Si è partiti dal sistema più semplice in cui diverse quantità di ossido di titanio, sotto forma di polvere, sono state messe a contatto con soluzioni di colorante a diverse concentrazioni in presenza ed assenza di un antiaggregante per tempi di contatto diversi; in questo modo è stato possibile valutare quantitativamente, tramite misure di spettrofotometria UV-Visibile, come l'ossido di titanio, il colorante e il CDCA influiscano sull'adsorbimento. Tutti i fattori principali risultano rilevanti: la concentrazione di D5 e il tempo di contatto hanno un effetto positivo sul sistema, contrariamente alla concentrazione del CDCA che ha un effetto negativo.

Avendo così messo a punto la metodica di analisi e studiato i fattori in teoria più importanti si può procedere all'analisi di un sistema più complicato e realistico. Si è deciso di effettuare un analogo piano fattoriale  $2^3$  su foto-elettrodi commerciali per DSSC.

Anche in questo sistema la risposta sperimentale è stata il numero di molecole adsorbite dall'ossido e nuovamente emerge che la concentrazione del colorante influisce positivamente sull'adsorbimento; inoltre risulta significativa l'interazione contemporanea dei tre fattori in studio da cui, in particolare, risulta interessante e non prevedibile che alle alte concentrazioni di D5 si ottengono ottimi adsorbimenti anche senza l'aggiunta dell'antiaggregante a patto di lasciare a contatto la soluzione il foto-elettrodo per tempi brevi. Il modello studiato descrive esaurientemente il sistema in quanto non è stata riscontrata la necessità di studiare gli effetti quadratici dei fattori.

Successivamente sono stati studiati altri 3 parametri che, oltre al dye uptake, possono influire sull'efficienza delle celle DSSC, ovvero le caratteristiche dell'elettrolita, dei foto-elettrodi e dei contro-elettrodi. Vista la mancanza di dati riguardo a queste variabili, è stata utilizzato il metodo dell'analisi della varianza (ANoVA), preliminare ad un approccio DoE.

La riproducibilità è stata testata misurando l'efficienza fotovoltaica di 9 celle, replicando 4 volte la misura, ottenendo così una efficienza percentuale media di  $2,8 \pm 0,1$ .

Si è poi studiato l'effetto dell'attivazione dei foto-elettrodi sia mediante trattamento termico che del trattamento con un soluzione di  $\text{TiCl}_4$ . Entrambi i trattamenti portano ad un aumento dell'efficienza dovuto soprattutto all'aumento della  $|\text{ISC}|$  e della VOC.

Anche la scelta opportuna dell'elettrolita ha permesso di aumentare ulteriormente VOC e  $|\text{ISC}|$ , con conseguente aumento dell'efficienza.

Infine, sono stati testati 5 diversi tipi di preparazione di contro-elettrodi ottenuti mediante ripetute deposizioni di differenti quantità di una soluzione di  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , in modo da determinare il numero ottimale di deposizioni e di quantità deposta. Le varie preparazioni testate non sono risultate statisticamente differenti, è stato quindi ipotizzato che una volta raggiunta la quantità minima di platino necessaria per il buon funzionamento del contro-elettrodo, l'aumento della quantità di platino o la differenziazione degli strati non influisca sull'efficienza della cella.

# Conclusioni

---

Nel corso del dottorato di ricerca sono state sviluppate ed ottimizzate metodologie cromatografiche e spettrofotometriche, per applicazioni in campo ambientale, energetico e dei nuovi materiali.

In ambito ambientale è stato sviluppato e validato un metodo HPLC-DAD rapido in grado di rilevare e determinare simultaneamente, in 19 minuti, otto dei pesticidi più utilizzati nelle colture di grano e barbabietola da zucchero in diverse matrici ambientali. E' stata anche messa a punto la metodica di estrazione Solid Phase Extraction (SPE) che garantisce l'applicabilità dell'intera metodica cromatografica ai campioni di acque superficiali.

La ricerca nel campo dei nuovi materiali è stata incentrata sulla messa a punto di un metodo analitico HPLC-DAD per la determinazione della quantità di monomeri consumata durante le reazioni di sintesi di copolimeri random polistirene-polimetilmetacrilato. Con il metodo così sviluppato è stato possibile determinare il grado di conversione e quindi la relativa composizione del polimero di sei reazioni di polimerizzazione caratterizzate da diversi quantità di monomeri nella soluzione di partenza della sintesi.

Infine sono stati sviluppati ed efficacemente utilizzati i metodi necessari per la razionalizzazione dei parametri principali che influiscono sull'efficienza delle celle solari DSSC: ovvero il dye uptake e le caratteristiche dell'elettrolita, dei foto-elettrodi e dei contro-elettrodi.

# Bibliografia

---

- [1] 16. Kalyanasundaram K, Grätzel M, *Coord. Chem. Rev.* **77**, 347–414 (1998).
- [2] Kohjiro Hara and Hironori Arakawa. Dye-sensitized Solar Cells, *Handbook of Photovoltaic Science and Engineering*. Edited by A. Luque and S. Hegedus. 2003 John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 0-471-49196-9
- [3] Wolfbauer G., Bond A. M., Eklund J.C., MacFarlane D. R.; A channel flow cell system specifically designed to test the efficiency of redox shuttles in dye sensitized solar cells; *Solar Energy Materials and Solar Cells*; 2001, Vol. 70, Issue 1, 85–101.
- [4] 83. Bonhôte P *et al.*, *Inorg. Chem.* **35**, 1168–1178 (1996).
- [5] 84. Papageorgiou N *et al.*, *J. Electrochem. Soc.* **143**, 3099–3108 (1996).
- [6] K. Hara, T. Horiguchi, T. Kinoshita, K. Sayama, H. Arakawa. Influence of electrolytes on the photovoltaic performance of organic dye-sensitized nanocrystalline TiO<sub>2</sub> Solar cells. *Solar Energy Materials & Solar Cells* 70 (2001) 151-161
- [7] Haque S, Tachibana Y, Klug D, Durrant J, *J. Phys. Chem. B* **102**, 1745–1749 (1998).
- [8] Nasr S, Hotchandani S, Kamat P, *J. Phys. Chem. B* **102**, 4944–4951 (1998).
- [9] 85. Papageorgiou N, Maier W, Grätzel M, *J. Electrochem. Soc.* **144**, 876–884 (1997).
- [10] Solar cell nanotechnology a cura di Atul Tiwari, Rabah Boukherroub, Maheshwar Sharon, *Advanced Energy: An International Journal (AEIJ)*, Vol. 1, No. 2, April 2014  
*Advanced Energy: An International Journal (AEIJ)*, Vol. 1, No. 2, April 2014
- [11] Colin Baird: *Chimica Ambientale*; Zanichelli
- [12] Gennari M. & Trevisan M.: *Agrofarmaci conoscenze per uso sostenibile*, Ed. Gruppo Perdisa, 2008, 623.

[13] Perin, G. *Ecotoxicologia*. 2004, cap IX.

[14] Reemtsma, T.; Aldera, L.; Banasiaka, U. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*. 2013, 1271, 95-104.

[15] Velkoska-Markovska, L.; Petanovska-Ilievska, B.; Vodeb, L. Simultaneous Determination of Phenmedipham, Desmedipham, and Ethofumesate in a Pesticide Formulation by Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Acta Chromatogr.* 2008, 109-118.

[16] Velkoska-Markovska, L.; Petanovska-Ilievska, B.; Vodeb, L. RP-HPLC-DAD method for simultaneous determination of Desmedipham, Phenmedipham and Ethofumesate in a pesticide formulation. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 2012, 31, 39-46.

[17] Walorczyk, S.; Drozdzyński, D.; Gnusowski, B. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2011, 85, 1856-1870.

[18] Gervais, G.; Brosillon, S.; Laplanche, A.; Helenb, C. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *J. Chromatogr., A*. 2008, 1202, 163-172.

[19] Gomides Freitas, L.; Götz, C. W.; Ruff, M.; Singer, P.H.; Müller, P.H. Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2004, 1028, 277–286

[20] Shapovalova, E.,N.; Yaroslavtseva, L.,N.; Merkulova, N., L.; Yashin, A., Y.; Shpigun, O., A. Separation of Pesticides by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection. *J. Anal. Chem.* 2009, 64, 164-170.

- [21] Merkulova, N. L.; Shapovalova, E. N.; Shpigun, O. A. Features of the Separation of Pesticides of Different Classes by Reversed-Phase High-Performance Chromatography. *J of Anal. Chem.* 2006, 61, 343–349.
- [22] Carabias-Martinez, R.; Rodriguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Dominguez-Alvarez, J. Solid-phase extraction and sample stacking–micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of multiresidues of herbicides and metabolites. *J. Chromatogr. A.* 2003, 990, 291–302.
- [23] C. A. Chávez-Moreno, C. A.; Guzmán-Mar, J. L.; Hinojosa-Reyes, L.; Hernández-Ramírez, A.; Ferrer, L.; Cerdà, V. Applicability of multisyringe chromatography coupled to on-line solid-phase extraction to the simultaneous determination of dicamba, 2,4-D, and atrazine. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 403, 2705–2714.
- [24] D'Archivio, A. A.; Fanelli, M.; Mazzeo, P.; Ruggieri, F. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 2007, 71, 25–30.
- [25] Eisert, R.; Levsen, K. Analysis of polar thermally labile pesticides using different solid-phase-extraction (SPE) materials with GC and HPLC techniques. *J. Environ. Anal. Chem.* 1995, 58, 103-120.
- [26] Molina, C.; Grasso, P.; Benfenati, E.; Barcelo, D. Determination and stability of phenmediphan, ethofumesate and fenamiphos in ground water samples using automated solid phase extraction cartridges followed by liquid chromatography high flow pneumatically assisted electrospray mass spectrometry. *J. Environ. Anal. Chem.* 1996, 65, 69-82.
- [27] Bruzzoniti, M. C.; Sarzanini, C.; Costantino, G.; Fungi, M. Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography–mass spectrometry in drinking waters. *Anal. Chimica Acta*, 2006, 578, 241–249.



- [28] Tuzimski, Tomasz. Application of RP-HPLC-Diode Array Detector after SPE to the Determination of Pesticides in Pepper Samples. *Journal of AOAC International*, 2012, 95, 1357-1361.
- [29] Ye, Y. Q. ; Wu, N. ; Huang, H. T.; Yang, G. Y.; Hu, Q. F. Determination of Some Pesticides in Tobacco Leaf by High Performance Liquid Chromatography and Sample Preparation with Matrix Solid Phase Dispersion. *Asian Journal Of Chemistry*. 2010, 22, 3659-3663.
- [30] Berg, M.; Muller, S. R.; Schwanenbach, R. P. Simultaneous Determination of Triazines Including Atrazine and Their Major Metabolites Hydroxyatrazine, Desethylatrazine, and Deisopropylatrazine in Natural Waters. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1860- 1865.
- [31] Lawrence, J. F.; Menard, C.; Hennlon, M. C.; Pichon, V.; LeGoffic, F.; Durand, N. Evaluation of immunoaffinity chromatography as a replacement for organic solvent clean-up of plant extracts for the determination of triazine herbicides by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1996, 752, 147-154.
- [32] Kolb, M.; Englert, B. Determination of Atrazine, Terbutylazine and their Deethyl- and Hydroxymetabolites in Soil by SFE and HPLC/UV-DAD. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 1996, 24, 277-282.
- [33] Yanqing, Y.; Na, W.; Haitao, H.; Guangyu, Y.; Qiufen, H. Determination of Some Pesticides in Tobacco Leaf by High Performance Liquid Chromatography and Sample Preparation with Matrix Solid Phase Dispersion. *Asian, J. Chem.* 2010, 22, 3659-3663.
- [34] Chary, N. S.; Herrera, S.; Gómez, M. J.; Fernández-Alba, A. R. Parts per trillion level determination of endocrine-disrupting chlorinated compounds in river water and wastewater effluent by stir-bar-sorptive extraction followed by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404, 1993–2006.

- [35] Sauret-Szczepanski, N.; Mirabel, P.; Wortham, H. Development of an SPMEeGCeMS/MS method for the determination of pesticides in rainwater: Laboratory and field experiments. *Environmental Pollution*, 2006, 139, 133-142.
- [36] Polati, S.; Bottaro, M.; Frascarolo, P.; Gosetti, F.; Gianotti, V.; Gennaro, M.C. HPLC-UV and HPLC-MS<sup>n</sup> multiresidue determination of amidosulfuron, azimsulfuron, nicosulfuron, rimsulfuron, thifensulfuron methyl, tribenuron methyl and azoxystrobin in surface waters *Analytica Chimica Acta* 2006, 579, 146–151
- [37] Sun, F. C.; Li, X. W.; Li, L. L.; Ding, Y. Q.; Zhao, H. Simultaneous determination of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics in soils using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Advanced Materials Research*, 2013, 718-720, 1071-1076
- [38] European Directive 2000/60/CE of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy, 2000.
- [39] Gianotti V., S. Angioi, F. Gosetti, E. Marengo, M.C. Gennaro. (2005).  
Chemometrically assisted development of IP-IR-HPLC and spectrophotometric methods for the identification and determination of synthetic dyes in commercial soft-drinks for preliminary degradation studies. *JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES*, 28, 923-937
- [41] Marengo E., Gennaro M.C., Gianotti V. (2001).  
A Simplex-Optimised Chromatographic separation of 14 cosmetic preservatives. Analysis of commercial products. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE*, 39, 339-344
- [42] E.Marengo, M.C.Gennaro, Gianotti V. (2000).  
Chemometrically Assisted Simultaneous Separation of 21 Aromatic Sulfonates in Ion-Interaction RP-HPLC. *CHEMOMETRICS AND INTELLIGENT LABORATORY SYSTEMS*, 53, 57-67.
- [43] K. Weissermel, H-J. Arpe, C. R. Lindley, *Industrial organic chemistry*, ed. Wiley-VCH.

- [44] 12th Report on Carcinogens (RoC). U.S. Department of Health and Human Services, 12<sup>th</sup> Report on Carcinogens, 10 giugno 2011.
- [45] K. Saido, K. Koizumi, H. Sato et al., “New analytical method for the determination of styrene oligomers formed from polystyrene decomposition and its application at the coastlines of the North-West Pacific Ocean”, *Science of the Total Environment* 473–474 (2014) 490–495.
- [46] B. G. Kwon, K. Saido, K. Koizumi et al., “Regional distribution of styrene analogues generated from polystyrene degradation along the coastlines of the North-East Pacific Ocean and Hawaii”, *Environmental Pollution* 188 (2014) 45 e 49.
- [47] A. Verzera, C. Condurso, V. Romeo, G. Tripodi, M. Ziino, “Solid-Phase Microextraction Coupled to Fast Gas Chromatography for the Determination of Migrants from Polystyrene-Packaging Materials into Yoghurt”, *Food Anal. Methods* (2010) 3:80–84.
- [48] M-R. Khaksar, M. Ghazi-Khansari, “Determination of migration monomer styrene from GPPS (general purpose polystyrene) and HIPS (high impact polystyrene) cups to hot drinks”, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2009; 19(3): 257–261.
- [49] L. M. Chiesa, S. Panseri, S. Soncin, L. Vallone, I. Dragoni, “Determination of styrene content in Gorgonzola PDO cheese by headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) and gas-chromatography mass-spectrometry (GC-MS)”, *Vet Res Commun* (2010) 34 (Suppl 1):S167–S170.
- [50] E. Haddadi, E. Mehravar, F. Abbasi, K. Jalili, “Expandable Styrene/Methyl Methacrylate Copolymer: Synthesis and Determination of VOCs by Combined Thermogravimetry/Differential Thermal Analysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry”, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 124, 4711–4720 (2012).

[51] M.C. Garrigòs, M.L. Marìn, A. Cantò, A. Sànchez, “Determination of residual styrene monomer in polystyrene granules by gas chromatography–mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1061 (2004) 211–216.

[52] Scheda di sicurezza sul metacrilato di metile.

[53] R. D. Singh, R. Gautam, R. Siddhartha et al., “High Performance Liquid Chromatographic Determination of Residual Monomer Released from Heat-Cured Acrylic Resin. An In Vivo Study”, *Journal of Prosthodontics* **22** (2013) 358–361.

[54] W. D. Callister, *Material Science and Engineering: An Introduction*, ed. John Wiley & Sons Inc.

[55] V. Gianotti et al., Rationalization of dye uptake on TiO<sub>2</sub> slides for Dye-sensitized Solar Cells by a combined chemometric and structural approach. *ChemSusChem*, DOI: 10.1002/cssc.201402194.

[56] R. Y. Ogura, S. Nakane, M. Morooka, M. Orihashi, Y. Suzuki, K. Noda, *APL* 94 2009, 073308.

[57] For comprehensive reviews, see: a) H. Imahori, T. Umeyama, S. Ito, *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 1809 – 1818; b) A. Mishra, M. K. R. Fischer, P. Bauerle, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 2474 –2499; *Angew. Chem.* 2009, 121, 2510 –2536; c) J. N. Clifford, M. Planells, E. Palomares, *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 24195– 24201; d) J. Park, G. Viscardi, C. Barolo, N. Barbero, *Chimia* 2013, 67, 129 –135; for some selected recent examples, see: e) A. Yella, H.-W. Lee, H. N. Tsao, C. Yi, A. K. Chandiran, M. K. Nazeeruddin, E. W.-G. Diao, C. Y. Yeh, S. M. Zakeeruddin, M. Grätzel, *Science* 2011, 334, 629 –634; f) J. Park, C. Barolo, F. Sauvage, N. Barbero, C. Benzi, P. Quagliotto, S. Coluccia, D. Di Censo, M. Grätzel, Md. K. Nazeeruddin, G. Viscardi, *Chem. Commun.* 2012, 48, 2782 – 2784; g) C. Barolo, J-H Yum, E. Artuso, N. Barbero, D. Di Censo, M. G. Lobello, S. Fantacci, F. De Angelis, M. Grätzel, Md. K. Nazeeruddin, G. Viscardi, *ChemSusChem* 2013, 6, 2170 –2180.

[58] N. Cai, R. Li, Y. Wang, M. Zhang, P. Wang, *Energy Environ. Sci.* 2013, 6, 139– 147.

- [59] a) B. O'Regan, L. Xiao, T. Ghaddar, *Energy Environ. Sci.* 2012, 5, 7203 – 7215; b) V. Johansson, L. Ellis-Gibbings, T. Clarke, M. Gorlov, G. G. Andersson, L. Kloo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 711 –718.
- [60] D. P. Hagberg, J.-H. Yum, H. J. Lee, F. De Angelis, T. Marinado, K. M. Karlsson, R. Humphry-Baker, L. Sun, A. Hagfeldt, M. Grätzel, Md. K. Nazeeruddin, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 6259 –6266.
- [61] E. Ronca, M. Pastore, L. Belpassi, F. Tarantelli, F. De Angelis, *Energy Environ. Sci.* 2013, 6, 183– 193.
- [62] M. Pastore, E. Mosconi, F. De Angelis, M. Grätzel, *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, 7205 –7212.
- [63] F. Labat, T. Le Bahers, I. Ciofini, C. Adamo, *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 1268 –1277.
- [64] H.-P. Lu, C.-Y. Tsai, W.-N. Yen, C.-P. Hsieh, C.-W. Lee, C.-Y. Yeh, E. W.-G. Diau, *J. Phys. Chem.* 2009, 113, 20990 –20997. 65 J. Li, W. J. Wu, J. B. Yang, J. Tang, Y. T. Long, J. L. Hua, *Science China Chem.* 2011, 54, 699 –706.
- [65] J. Li, W. J. Wu, J. B. Yang, J. Tang, Y. T. Long, J. L. Hua, *Science China Chem.* 2011, 54, 699 –706.
- [66] D. P. Hagberg, T. Edvinsson, T. Marinado, G. Boschloo, A. Hagfeldt, L. Sun, *Chem. Commun.* 2006, 2245– 2247.
- [67] D. P. Hagberg, T. Marinado, K. M. Karlsson, K. Nonomura, P. Qin, G. Boschloo, T. Brinck, A. Hagfeldt and L. Sun. *J. Org. Chem.*, Vol. 72, No. 25, 2007.
- [68] Favaro G., Antonioli D., Sparnacci K., Laus M., Gianotti V., Determination of the conversion in radicalic controlled polymerization by HPLC method. *Analytical Methods* (in preparazione)

[69] Favaro G., Benzi M., Robotti E., Gianotti V. Simple and fast RP-HPLC-DAD method for trace analysis of wheat and sugar beet pesticides. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* IF 1.321. (inviato)

# Publicazioni

---

- Gianotti V., Favaro G., Bonandini L., Palin L., Croce G., Boccaleri E., Artuso E., Beek W., Barolo C., e Milanesio M., (2014) (Inside Cover) “Rationalization of dye uptake on TiO<sub>2</sub> slides for Dye-sensitized Solar Cells by a combined chemometric and structural approach”. *ChemSusChem*. 7, 3039 – 3052. DOI:10.1002/cssc.201402194. IF 7.48.
- Viterbo D., Conterosito E., Croce G., Palin L., Antonioli D., Favaro G., Perioli L., Milanesio M., Gianotti V., (2014). “Carbonate contamination in nitrate and organic hydrotalcites by XRPD/TGA-GC-MS”. *Acta Crystallographica, Section A*, 70, C955. IF 2.069
- Benzi M., Favaro G., Gianotti V., “Development of an extraction method for the determination and the speciation of Selenium in different vegetables matrices”. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, ISSN 2079-0538, 2012

## Inviati

- Conterosito E., Croce G., Palin L., Favaro G., Antonioli D., Viterbo D., Mugnaioli E., Perioli L., Milanesio M., Gianotti V. “TGA-GC-MS study of complex LDH samples: degradation, deintercalation, and carbonate contamination in nitrate and organic-exchanged hydrotalcites”. *Chemistry – A European Journal*. IF = 5.696
- Favaro G., Benzi M., Robotti E., Gianotti V. “Simple and fast RP-HPLC-DAD method for trace analysis of wheat and sugar beet pesticides”. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* IF 1.321

## In preparazione

Favaro G., Antonioli D., Sparnacci K., Laus M., Gianotti V., “Determination of the conversion in radicalic controlled polymerization by HPLC method”. *Analytical Methods*.

# Partecipazione a congressi e scuole

---

- G. Favaro, G. Gatti, C. Barolo, M. Milanesio, V. Gianotti “Rationalization of dye uptake on TiO<sub>2</sub> slides for DSSC solar cells by chemometric approach”. VI Giornate Italo-Francesi di chimica | 16-17/04/2012 | Marsiglia
- G. Favaro, M. Benzi, V. Gianotti “Development of an extraction method for the determination and the speciation of Selenium in different vegetables matrices”. IX Congresso Italiano di chimica degli alimenti | 3-7/06/2012 | Ischia.
- G. Favaro, C. Barolo, M. Milanesio, V. Gianotti “Rationalization of dye uptake on TiO<sub>2</sub> slides for DSSC solar cells by chemometric approach” Dye-sensitized Solar Cells: from materials to devices | dal 31/01/2013 al 1/02/2013 | Torino
- G. Favaro, D. Antonioli, E. Conterposito, M. Milanesio, V. Gianotti. “Calibration and performance evaluation of a pulsed repetitive interface for online TGA-GC-MS analysis; application to the characterisation of complex LDH samples”. XXIV Congresso Nazionale della Divisione di Chimica Analitica della SCI | 15-19/09/2013 | Sestri Levante
- G. Favaro, S. Galliano, C. Barolo, M. Milanesio, V. Gianotti, “Rationalization of dye soaking parameters in relation with DSSC efficiency by a chemometric approach”. Giornate Italo-Francesi 2014 | 5-6/05/2014 | Torino
- 17° Corso di Spettrometria di Massa 2013 | 18-22/03/2013 | Siena



# Seminari

---

<b>Titolo Seminario</b>	<b>Professore/i</b>	<b>ore</b>	<b>data</b>
Luminescent Ru(II) complexes in liposomes and nano discs: impact of environment on photophysical properties."	Prof. Edward Rosenberg	1	23/10/2014
Giornata del dottorato		3	26/09/2014
Recent Progress in Dye Solar Cells and Perovskite Solar Cells	Jun-Ho Yum e Soo-Jin Moon	2,5	12/09/2014
Dottorato di ricerca in Scienze Ambientali (Acque Interne e Agroecosistemi)		6,5	12/03/2014
Plastiche: risorsa o rischio ambientale?	Vari	7	10/02/2014
Polymer crystallization under processing conditions. A paradigmatic example of complex structuring phenomena	Dario Cavallo e Giovanni Carlo Alfonso	2	13/05/2014
NMR Relaxometry: Principles and Applications	Organizzatore Prof. Mauro Botta	6	07/07/2014
Giornate Italo-Francesi 2014 Torino		19,5	5-6/05/2014
Canali del calcio attivati dal potenziale e da neurotrasmettitori	Dr.ssa Carla Marchetti	1,5	15/05/2014
Esame finale del Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche ciclo XXVI		4	11/03/2014
Opportunità applicative del PLA: Problematiche ed aspettative	Vari	3	25/02/2014
Relazioni annuali Del dottorato di Scienze Ambientali		4	19/11/2014