



Università degli studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in

SCIENZE CHIMICHE

Tesi di Laurea

**METODI ANALITICI INNOVATIVI PER LA
DETERMINAZIONE DI IDROCARBURI
POLICICLICI AROMATICI IN MATRICI
VEGETALI**

Relatrice

Prof.ssa Marina Di Carro

Candidata

Eleonora Di Maira

Correlatrici

Dott.ssa Barbara Benedetti

Prof.ssa Simona Delsante

Anno Accademico

2021-2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 INTEGRATORI ALIMENTARI E GEMME VEGETALI	6
1.2 PROGETTO FINNOVER	8
1.3 GREEN CHEMISTRY	9
1.4 SCOPO DELLA TESI	10
2. IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA) PRIORITARI	12
2.1 GLI ANALITI: PROPRIETÀ, SORGENTI, TRASPORTO E TOSSICITÀ	12
2.1.1 Proprietà chimico-fisiche	13
2.1.2 Sorgenti	14
2.1.3 Trasporto e destino	14
2.1.4 Tossicità per l'ambiente e per l'uomo	15
2.2 NORMATIVA	16
2.2.1 Normativa degli integratori alimentari	17
3. STATO DELL'ARTE	18
3.1 VEGETAZIONE: UN BIOINDICATORE	18
3.2 ESTRAZIONE DI IPA DA MATRICI VEGETALI	20
3.2.1 Solventi eutettici profondi	22
3.2.2 Microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME)	23
4. ACCOPPIAMENTO GC-MS	27
4.1 GAS CROMATOGRAFIA	27
4.2 SPETTROMETRIA DI MASSA	31
4.2.1 Sorgente di ioni	32
4.2.2 Analizzatore quadrupolare	34
4.2.3 Rivelatore	36
4.3 TECNICHE ACCOPPIATE E MODALITÀ DI ACQUISIZIONE	37
4.3.1 Tecniche accoppiate: GC-MS	37
4.3.2 Modalità di acquisizione	38
5. MATERIALI E METODI	40
5.1 MATERIALI	40
5.1.1 Campioni e siti di campionamento	41
5.1.1.1 Analisi degli estratti di <i>Tilia tomentosa</i>	41
5.1.1.2 HS-SPME	43
5.1.2 Standard interni	44
5.2 STRUMENTI E METODI	45
5.2.1 Chemiometria ed Experimental Design	45
5.2.2 Analisi strumentale	47

5.2.2.1	Analisi degli estratti di <i>Tilia tomentosa</i>	47
5.2.2.2	HS-SPME.....	49
6.	RISULTATI E DISCUSSIONE	50
6.1	METODO DELLO STANDARD INTERNO	50
6.2	LIMITI DI RIVELABILITÀ NEGLI ESTRATTI DELLE GEMME	51
6.3	RISULTATI OTTENUTI	53
6.4	ANALISI DEGLI ESTRATTI DELLE GEMME	53
6.4.1	Rette di calibrazione	53
6.4.2	Valutazione della precisione del metodo	58
6.5	OTTIMIZZAZIONE DEL METODO HS-SPME	60
6.5.1	Scelta del modello	60
6.5.1.1	Central Composite Design (CCD)	61
6.5.1.1.1	<i>Experimental Design a 4 fattori</i>	62
6.5.1.1.2	<i>Experimental Design a 2 fattori</i>	79
6.5.1.1.3	<i>Metodi ottimali per IPA leggeri e pesanti</i>	94
6.5.1.1.4	<i>Costruzione della retta di calibrazione</i>	95
7.	CONCLUSIONI	98
8.	BIBLIOGRAFIA	100
9.	RINGRAZIAMENTI	103

1. INTRODUZIONE

In chimica analitica, la determinazione di sostanze inquinanti nell'ordine di tracce e ultra-tracce in diverse matrici ambientali rappresenta un aspetto fondamentale.

Le fasi che governano lo sviluppo di un metodo, in grado di fornire informazioni affidabili sul problema analitico in questione, sono correlabili a fattori critici, quali: la tipologia e il numero di analiti da monitorare ed eventualmente quantificare, il trattamento del campione e il metodo strumentale con cui gli analiti vengono analizzati.

Il raggiungimento di un dato che sia accurato e rappresentativo del campione reale è uno dei primari scopi della chimica analitica. Le tecniche di trattamento del campione scelte prevedono un'estrazione degli analiti dalla matrice ambientale in esame.

Si ha la necessità di sviluppare procedure veloci, idonee a quantificare in un breve lasso di tempo il maggior numero di analiti, e che siano estremamente sensibili poiché le concentrazioni degli analiti nella matrice possono essere anche molto basse.

La strumentazione è scelta in base alle sue performance analitiche, infatti, deve avere determinati livelli di sensibilità e specificità che siano soddisfacenti e deve essere in grado di separare e quantificare gli analiti in tempi brevi e con risultati affidabili.

In questo lavoro di tesi, l'attenzione è focalizzata sull'estrazione di Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e sulla loro quantificazione nelle matrici vegetali, atta a comprendere se queste possano essere impiegate per ottenere dei prodotti di valore aggiunto quali gli integratori alimentari.

1.1 INTEGRATORI ALIMENTARI E GEMME VEGETALI

Gli integratori alimentari sono fonti concentrate di micronutrienti (cioè minerali e vitamine) o di altre sostanze con effetto nutrizionale o fisiologico, commercializzati sotto forma di “dose” (ad es. pillole, compresse, capsule, liquidi a dosi misurate). Gli integratori alimentari possono contenere un’ampia varietà di sostanze nutritive e altri ingredienti, tra cui: vitamine, minerali, amminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre e diverse piante ed estratti di erbe. Hanno lo scopo di correggere le carenze nutrizionali, mantenere un adeguato apporto di alcuni nutrienti o coadiuvare specifiche funzioni fisiologiche. Non possono essere considerati medicinali e, in quanto tali, infatti, non possono esercitare un'azione farmacologica, immunologica o metabolica. Pertanto, il loro uso non ha lo scopo di trattare o prevenire malattie nell’uomo o di modificarne le funzioni fisiologiche. Nell'Unione Europea gli integratori alimentari sono regolamentati come gli alimenti [1].

Negli ultimi anni, la fitoterapia si sta diffondendo come rimedio alternativo da associare alle terapie tradizionali perché si ritiene presenti un minor numero di effetti collaterali e per la falsa convinzione secondo la quale tutto ciò che proviene dal mondo naturale è “sicuro” [2]. Lo stato naturale dell'estratto non è tuttavia garanzia della sua innocuità per l'uomo e per l'ambiente. In particolare, gli estratti devono essere ottenuti da materie prime precisamente identificate e ispezionate secondo procedure definite, in modo da garantire la loro provenienza naturale. Esistono, infatti, normative che stabiliscono che l’estratto debba possedere determinati requisiti di qualità e ottemperare a regolamentazioni di preparazione che dipendono dal destino finale del prodotto. Queste regolamentazioni sono piuttosto rigorose nel caso di prodotti destinati all’impiego alimentare e farmaceutico.

La gemmoterapia, nata grazie al medico belga Henry negli anni '50 del secolo scorso, è un metodo terapeutico, nell’ambito della fitoterapia, che utilizza tessuti vegetali freschi allo stato embrionale [3]. In particolare, si basa sull’impiego di gemme e giovani germogli da cui si estrae la “droga vegetale”, la parte della pianta ricca di principi attivi che in seguito viene utilizzata per la produzione di prodotti fitoterapici. Le gemme sono germogli non sviluppati o embrionali e possono essere protette da una copertura di foglie modificate dette “perule” (o squame o scaglie), che proteggono le parti più delicate del germoglio. Come mostrato in Figura 1, la perula può essere “appiccicosa”, ovvero ricoperta da una sostanza gommosa e cerosa che funge da protezione aggiuntiva. Esistono gemme “nude”, definite tali perché non possiedono le squame, ma hanno la superficie ricoperta da “peluria” (Figura 2). Le gemme sono le più ricche di principi attivi, ma devono essere raccolte durante il “periodo balsamico”, che corrisponde al momento in cui esse non risultano né in uno stadio troppo giovane né in uno troppo avanzato.

Le gemme risultano in numero limitato come materia prima ed è per questo che, in questo lavoro di tesi, è interessante capire se possano essere sfruttate quelle gemme provenienti da residui di patata in aree urbane a diverso impatto ambientale. In particolare, sono state valutate tre zone: a basso, medio e alto inquinamento (riportate nel paragrafo “5.1.1 Campioni e siti di

campionamento”). Le gemme vegetali ricavate dagli scarti sopra citati possono essere utilizzate per ottenere estratti da cui produrre successivamente integratori alimentari.

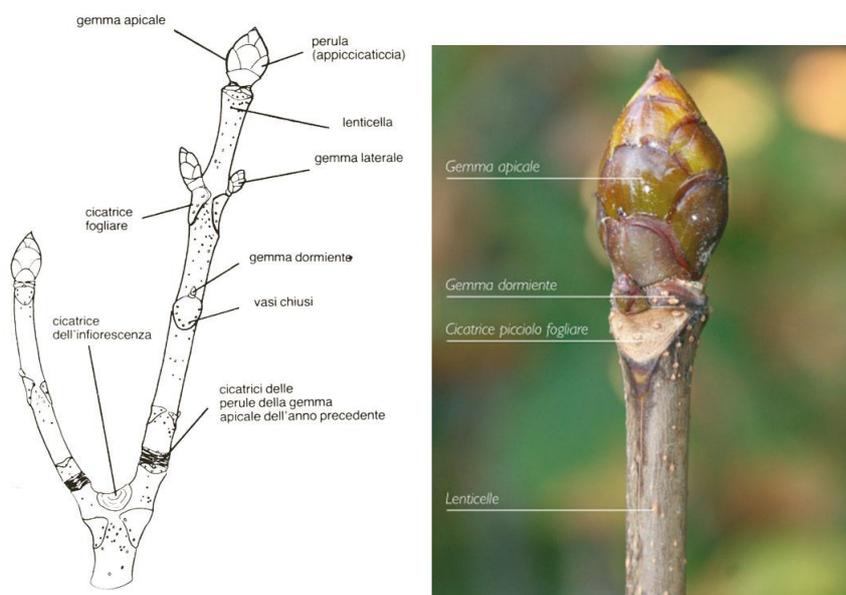


Figura 1: A sinistra: rappresentazione della porzione di pianta su cui è situata la gemma; a destra: una gemma



Figura 2: Gemme "nude" ricoperte da peluria

1.2 PROGETTO FINNOVER

Il lavoro di tesi, in collaborazione con il Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Torino e con il Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Genova, è parte integrante del progetto FINNOVER (Strategie Innovative per lo sviluppo di Filiere Verdi transfrontaliere). Esso fornisce un supporto alle filiere verdi del territorio transfrontaliero e propone un percorso tecnico-economico indirizzato alla produzione ed impiego di sostanze di origine naturale ottenute dalla biodiversità del territorio ALCOTRA (Alpi Latine Cooperazione TRAnsfrontaliera) ed impiegabili nel campo nutraceutico (principi nutrienti contenuti negli alimenti che hanno effetti benefici sulla salute), terapeutico e fitofarmaceutico [4]. Nell'ambito del progetto di tesi, si incentra l'attenzione su un possibile nuovo impiego di residui di potatura provenienti da alberi situati in viali e zone urbane torinesi, al fine di ottenere integratori alimentari, in particolare, dagli estratti delle gemme vegetali ricavabili da tali scarti.

Per la preparazione dei fitoterapici si è scelto di utilizzare le gemme derivanti da piante del genere *Tilia*, in particolare di *Tilia tomentosa* (Figura 3), poiché coltivate diffusamente in parchi, giardini e viali alberati urbani torinesi.



Figura 3: Gemma di *Tilia tomentosa*

La *Tilia tomentosa* ha proprietà spasmolitiche, sedative ed ansiolitiche ed è un ottimo rimedio per gli stati d'ansia che influenzano l'asse cervello-cuore; inoltre, sostiene la produzione della serotonina e contribuisce a migliorare, perciò, il tono dell'umore. Le gemme di *Tilia* vengono sfruttate anche per l'alto contenuto di polifenoli, che sono sostanze caratterizzate da molteplici gruppi fenolici e con azione antiossidante e antinfiammatoria; inoltre, essi sono in grado di proteggere le cellule dallo stress ossidativo e mantenere sotto controllo i livelli di colesterolo.

La biodisponibilità corrisponde alla frazione di un nutriente che l'organismo è in grado di assorbire e di utilizzare per le proprie funzioni fisiologiche e quella relativa all'assunzione di cibi contenenti polifenoli, quali frutta e verdura, tè, vino e caffè, risulta bassa. È perciò utile aumentare la loro assunzione introducendoli in integratori alimentari, dove il contenuto di polifenoli è più concentrato e maggiormente biodisponibile.

1.3 GREEN CHEMISTRY

La *Green Chemistry* è stata teorizzata ufficialmente nel 1998 da Paul Anastas e John Warner, due chimici, che hanno avuto il merito di stilarne i dodici principi fondanti.

- 1) Prevenzione: è meglio prevenire a monte la produzione di rifiuti e scarti, piuttosto che trattarli e bonificarli una volta creati.
- 2) Economia atomica: le reazioni chimiche di sintesi devono essere progettate cercando di massimizzare l'incorporazione di tutti gli atomi dei reagenti iniziali nei prodotti finali di interesse.
- 3) Sintesi chimiche meno pericolose: dove possibile, i metodi di sintesi devono essere progettati utilizzando e generando sostanze poco o per nulla tossiche per l'uomo e l'ambiente.
- 4) Progettazione di prodotti chimici più sicuri: si deve cercare di progettare prodotti chimici funzionali al loro utilizzo, minimizzando la tossicità.
- 5) Solventi e additivi più sicuri: l'uso di sostanze ausiliarie, come solventi e agenti di separazione, deve essere evitato o limitato il più possibile; se usati, devono essere innocui.
- 6) Efficienza energetica: la richiesta energetica per i processi chimici deve essere valutata tenendo conto del suo impatto ambientale ed economico e minimizzata.
- 7) Utilizzo di materie prime rinnovabili: le materie prime devono essere rinnovabili per quanto fattibile dal punto di vista tecnico ed economico.
- 8) Ridurre i derivati: si deve minimizzare o eliminare, se possibile, la produzione di derivati non necessari poiché richiedono ulteriori reagenti, aumentano i costi e possono produrre scarti. Si tratta di ridurre i passaggi sintetici da fare per arrivare al prodotto desiderato.
- 9) Catalisi: i catalizzatori possono facilitare una reazione in diversi modi, per esempio accelerandola o incrementandone la resa.
- 10) Degradazione: i prodotti chimici che si progettano devono potersi decomporre facilmente alla fine del loro ciclo di vita, in modo da rimanere innocui e da non persistere nell'ambiente.
- 11) Analisi in tempo reale per prevenire l'inquinamento: si devono sviluppare metodologie di monitoraggio e controllo durante un processo chimico per prevenire la formazione di sostanze pericolose nel corso della lavorazione negli impianti chimici.
- 12) Sicurezza: si devono scegliere sostanze e formulazioni che permettano di minimizzare il rischio di incidenti. L'attenzione alla sicurezza non riguarda solo le sostanze chimiche in quanto tali, ma anche la loro gestione nella filiera di produzione: è infatti importante aumentare anche la sicurezza dei lavoratori e delle comunità che vivono in prossimità di impianti chimici [5].

Nell'ambito della *Green Chemistry*, l'obiettivo del lavoro concerne una valutazione su un possibile ottenimento di nuovi prodotti ad elevato valore aggiunto, quali gli integratori alimentari, a partire da scarti e sottoprodotti di origine vegetale, le cui definizioni sono:

- Scarto o rifiuto: qualsiasi materiale il cui destino è l'eliminazione tramite un centro di smaltimento rifiuti, l'incenerimento o la discarica. Non ha valore economico.
- Sottoprodotto: prodotto residuo di un processo, la cui produzione non è intenzionale, ma imprevedibile. Può essere utilizzato direttamente o sfruttato come ingrediente in un altro processo di produzione per generare un differente manufatto. Ha un valore economico [6].

È perciò importante comprendere se gli scarti possano considerarsi “materia prima di seconda generazione”, ovvero una fonte di materie prime che derivano da scarti industriali di vario genere.

L'impiego di piante come materia prima per la produzione di prodotti fitoterapici, la cui richiesta sul mercato risulta elevata, comporta un eccessivo sfruttamento delle risorse vegetali presenti in natura. È per questo motivo che si sta cercando di rivolgere l'attenzione all'impiego di varietà di piante che abbiano un alto contenuto di principi attivi ma siano derivanti da scarti di potatura, quali le gemme di *Tilia* prese in esame in questo lavoro.

In conclusione, gli scarti di potatura risultano i candidati ideali per la concretizzazione delle politiche dell'economia circolare, che prevedono, in Europa, di accentuare il riciclo di materiali e prodotti esistenti, contribuendo a ridurre i rifiuti al minimo. Per attuare ciò, il materiale dello scarto viene reintrodotta nel ciclo economico, generando ulteriore valore.

1.4 SCOPO DELLA TESI

Il lavoro di tesi si colloca all'interno del progetto FINNOVER, che ha come scopo la ricerca di nuove metodologie ecosostenibili per l'estrazione di molecole bioattive provenienti da sottoprodotti di origine vegetale. Si sfruttano scarti di lavorazione di materie prime vegetali (gemme di *Tilia tomentosa*), in particolare residui di potatura provenienti da alberi situati in viali e zone urbane torinesi, che di norma vengono destinati al compostaggio o all'incenerimento, per ottenere gli estratti da destinare alla produzione di integratori alimentari. Affinché queste gemme possano essere impiegate per tale scopo, bisogna valutare che gli estratti non contengano sostanze tossiche derivanti dall'inquinamento cittadino.

Questo lavoro di ricerca è stato suddiviso in due parti: nella prima, ci si è focalizzati sulla verifica della quantificazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) negli estratti ricavati dalle gemme di *Tilia tomentosa*, preparati per un precedente lavoro di tesi. Successivamente è stato sviluppato un metodo analitico per la determinazione di IPA in campioni solidi vegetali, simili alle gemme, che impiega la microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME) seguita da

gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) con analizzatore quadrupolare. Questa è un metodo strumentale ampiamente utilizzato per la quantificazione di IPA, grazie alla sua elevata selettività, sensibilità, robustezza, unitamente al fatto che possiede un basso limite di rivelabilità (LOD) [7].

La HS-SPME, che comprende il campionamento, l'estrazione e la purificazione, è stata ottimizzata per mezzo di un approccio multivariato, al fine di determinare l'eventuale presenza di IPA e quantificarne il contenuto nella matrice di partenza (gemme di *Tilia tomentosa*) impiegata per la preparazione degli estratti.

2. IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA) PRIORITARI

2.1 GLI ANALITI: PROPRIETÀ, SORGENTI, TRASPORTO E TOSSICITÀ

Gli idrocarburi aromatici policiclici (IPA) sono un ampio gruppo di composti organici costituiti soltanto da atomi di carbonio e di idrogeno e da due o più anelli, aromatici e non, fusi fra loro in un'unica struttura con disposizione angolare e/o lineare e non contengono eteroatomi nel ciclo o nei sostituenti. Il naftalene ($C_{10}H_8$) è l'IPA più semplice ottenuto dalla condensazione di due benzeni.

In condizioni normali (0 °C, 1 atm), sono solidi incolori, bianchi o giallo pallido. Si tratta di un gruppo ubiquitario di diverse centinaia di composti chimicamente correlati, persistenti nell'ambiente con diverse strutture e varia tossicità [8].

In particolare, la *United States Environment Protection Agency* (USEPA o EPA) e la *World Health Organization* (WHO) hanno individuato 16 IPA “prioritari” (Figura 4).

I 16 IPA prioritari possono essere monitorati contemporaneamente in uno stesso comparto ambientale e la loro distribuzione ricondotta ad uno specifico evento che ha coinvolto il sito in esame.

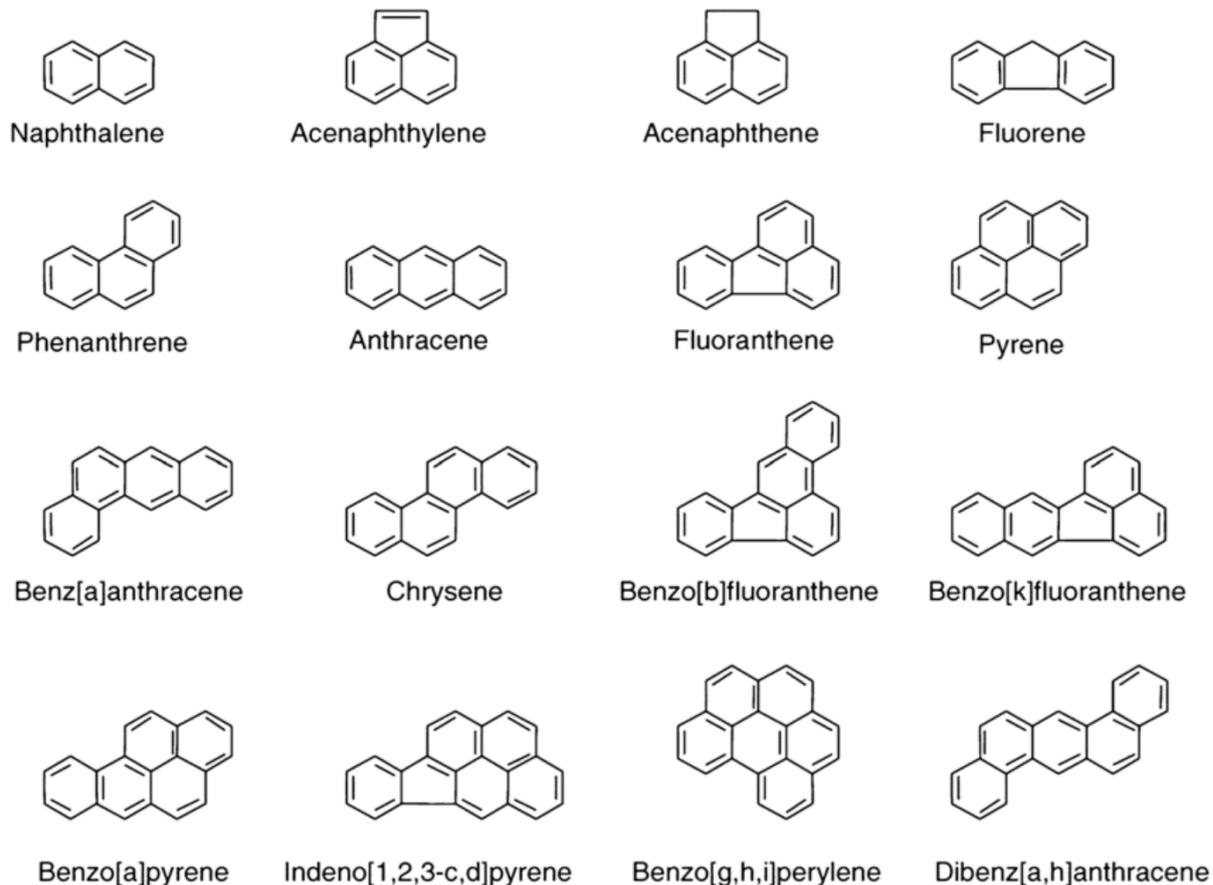


Figura 4: Strutture chimiche dei 16 IPA prioritari

2.1.1 Proprietà chimico-fisiche

Tabella 1: Proprietà chimico-fisiche di ciascun IPA prioritario [9]

Polycyclic aromatic hydrocarbons ^a	Structure (# of rings)	Molecular weight (g/mole)	Solubility (mg/L)	Vapor pressure (mm Hg)
Naphthalene	2	128.17	31	8.89E-02
Acenaphthene	3	154.21	3.8	3.75E-03
Acenaphthylene	3	152.20	16.1	2.90E-02
Anthracene	3	178.23	0.045	2.55E-05
Phenanthrene	3	178.23	1.1	6.80E-04
Fluorene	3	166.22	1.9	3.24E-03
Fluoranthene	4	202.26	0.26	8.13E-06
<i>Benzo(a)anthracene</i>	4	228.29	0.011	1.54E-07
<i>Chrysene</i>	4	228.29	0.0015	7.80E-09
Pyrene	4	202.26	0.132	4.25E-06
<i>Benzo(a)pyrene</i>	5	252.32	0.0038	4.89E-09
<i>Benzo(b)fluoranthene</i>	5	252.32	0.0015	8.06E-08
<i>Benzo(k)fluoranthene</i>	5	252.32	0.0008	9.59E-11
<i>Dibenz(a,h)anthracene</i>	6	278.35	0.0005	2.10E-11
<i>Benzo(g,h,i)perylene</i>	6	276.34	0.00026	1.00E-10
<i>Indeno[1,2,3-cd]pyrene</i>	6	276.34	0.062	1.40E-10

In Tabella 1 sono mostrate alcune proprietà chimico-fisiche degli IPA prioritari [9].

Gli IPA risultano particolarmente stabili nei differenti comparti ambientali a causa della loro struttura aromatica e ad anelli condensati, perciò la loro degradazione è complessa e risultano persistenti nell'ambiente.

Come anticipato, in condizioni normali, sono in fase solida, quindi posseggono elevati punti di fusione e di ebollizione, bassa tensione di vapore e scarsa solubilità in acqua. Queste ultime due caratteristiche tendono a diminuire all'aumentare del peso molecolare; al contrario, al crescere di quest'ultimo, aumentano la resistenza all'ossidazione e alla riduzione.

Inoltre, sono molto solubili in solventi apolari, ma manifestano anche sensibilità alla luce, resistenza al calore, conducibilità, resistenza alla corrosione e azioni fisiologiche differenti [8].

2.1.2 Sorgenti

Le principali sorgenti sono suddivisibili in due tipologie principali:

- naturali (sempre di tipo stazionario, ovvero fisse): incendi boschivi, eruzioni vulcaniche, sintesi organiche ad opera di batteri e alghe, infiltrazioni naturali di petrolio, erosione di rocce sedimentarie contenenti idrocarburi petroliferi.
- antropiche di tipo:
 - stazionario: impianti di produzione di alluminio, ferro e acciaio; impianti di riscaldamento e quelli di incenerimento dei rifiuti solidi urbani
 - mobile: traffico aereo, nautico, ferroviario e quello di veicoli a motore su strada

Inoltre, nel comparto ambientale, gli IPA possono formarsi tramite:

1. processi di lenta maturazione della materia organica (origine petrogenica, “IPA petrogenici”)
2. combustione incompleta o la pirolisi di materiali organici (origine pirogenica, “IPA pirogenici”)
3. processi biologici (“IPA biologici”), in percentuale minima rispetto ai petrogenici e pirogenici

Le tecniche di identificazione delle fonti spesso completano gli studi per la definizione di intervalli di fondo (“*background*”) degli IPA nell'ambiente.

Inoltre, la temperatura di formazione può essere una chiave per identificare le fonti di IPA, poiché, generalmente, le temperature più elevate tendono a produrre IPA con meno catene alchilate rispetto agli IPA formati da processi a temperatura più bassa [8].

2.1.3 Trasporto e destino

Gli idrocarburi aromatici policiclici (IPA) nell'aria *indoor*, ovvero nell'aria interna che si respira negli ambienti confinati, si trovano in parte in fase di vapore e in parte adsorbiti su particolato. Le sorgenti principali sono le fonti di combustione incompleta e pirolisi di materiali organici.

L'atmosfera è, infatti, il più importante mezzo di dispersione degli IPA pirogenici. Questo comporta un trasporto e un deposito anche molto distante dalla fonte di emissione rendendo questi composti ubiquitari.

Nell'atmosfera gli IPA si ripartiscono tra le fasi particolato e gassosa, influenzandone fortemente il loro destino, il trasporto nell'atmosfera e il modo con cui vengono veicolati all'interno del corpo umano.

Gli IPA con peso molecolare più elevato e caratterizzati da una bassa tensione di vapore tendono rapidamente a condensare e vengono adsorbiti dalla superficie del particolato atmosferico, mentre quelli a minore peso molecolare e con una maggior tensione di vapore rimangono parzialmente in fase vapore [8].

La rimozione degli IPA dal comparto atmosferico può avvenire mediante:

- deposizione secca: gli IPA si adsorbono alle particelle atmosferiche e si depositano a terra, o altrove, anche in assenza di precipitazioni.
- deposizione umida: gli IPA si adsorbono sulle fasi del particolato mediante precipitazione, ma può anche prevedere la dissoluzione dei contaminanti in fase vapore nell'acqua propria delle precipitazioni.
- vari meccanismi di degradazione

La temperatura influenza la velocità con cui gli IPA vengono rimossi dal comparto atmosferico e depositati al suolo o sulle foglie degli alberi. Ha un diretto impatto sulle concentrazioni e sulla distribuzione degli IPA nelle fasi vapore e del particolato. In particolare, le concentrazioni di IPA in fase gassosa aumentano in estate o in generale nelle regioni tropicali, mentre gli IPA in fase particellare sono dominanti durante l'inverno o in generale nelle regioni artiche [8].

2.1.4 Tossicità per l'ambiente e per l'uomo

Alcuni idrocarburi policiclici aromatici sono da sempre considerati come ubiquitari (naftalene e fluorene), mentre altri, purtroppo, lo stanno diventando (ad esempio il benzo[e]pirene e benzo[a]pirene sono presenti nell'asfalto, nel bitume e nel catrame).

Il loro ruolo nei confronti dell'ambiente (flora e fauna) e dell'uomo è da monitorare perché alcuni IPA sono ben noti come cancerogeni, mutageni e teratogeni; altri risultano essere potenti immunosoppressori. Particolarmente tossico è il benzo(a)pirene, che si è dimostrato cancerogeno nell'essere umano ed è ritenuto causa di mutazioni genetiche, malformazioni fetali e disturbi dello sviluppo. L'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha inserito il benzo(a)pirene [10] e altri IPA con 4-6 anelli condensati nelle classi 2A o 2B (possibili o probabili cancerogeni per l'uomo).

A causa di questa serie di motivi, il livello di concentrazione degli IPA deve essere mantenuto il più basso possibile, al di sotto di determinati limiti di legge.

In particolare, nell'uomo, gli IPA esplicano la loro tossicità interferendo con la funzione delle membrane cellulari e con i sistemi enzimatici associati alle stesse.

Le vie di esposizione comprendono: l'ingestione, il contatto cutaneo e l'inalazione; quest'ultima aumenta il rischio di cancro ai polmoni.

Le principali vie di esposizione nella popolazione sono la respirazione dell'aria ambiente e aria indoor inquinata, il consumo di cibi contenenti IPA e il fumo di sigaretta. Una volta introdotti nel corpo umano si distribuiscono rapidamente in un'ampia varietà di tessuti, in particolare, in quelli grassi, essendo gli IPA delle sostanze apolari [8].

Anche le piante possono assorbire gli IPA tramite il fogliame o tramite il suolo, attraverso le radici, e traslocarli in altre parti della pianta: i tassi di assorbimento sono generalmente regolati dalla concentrazione, dalla solubilità in acqua e dallo stato chimico-fisico dell'IPA coinvolto, nonché dal tipo di suolo.

2.2 NORMATIVA

La presenza di sostanze inquinanti o tossiche è verificata direttamente negli estratti delle gemme prelevate da scarti di potatura. Analizzare direttamente gli estratti è conveniente dal momento in cui è proprio da questi che vengono prodotti gli integratori alimentari. Inoltre, se le gemme avessero una percentuale non trascurabile di inquinanti, ciò non implicherebbe a prescindere che anche gli estratti da esse ottenuti siano contaminati. Se, invece, gli estratti risultassero inquinati, allora sarebbe utile effettuare un'analisi sulle gemme di partenza.

Se negli estratti risultasse presente una concentrazione di inquinanti:

- inferiore al limite di legge, ma nelle gemme fossero in quantità nettamente superiore: potrebbe significare che il metodo estrattivo impiegato per ottenere i principi attivi non sia in grado di estrarre considerevolmente anche gli inquinanti indagati.
- superiore ai limiti di legge: l'analisi delle gemme può considerarsi non più fondamentale, in quanto si è già ad una concentrazione eccessiva, a prescindere da quale fosse effettivamente quella originaria. L'analisi sulle gemme può essere utile per evidenziare il fatto che queste non siano utilizzabili in quanto provenienti da zone eccessivamente inquinate.

Gli inquinanti principali, che contaminano le foglie e le gemme degli alberi presenti in zone urbane, sono relativi al traffico veicolare e all'attività antropica, industriale e urbana. Le foglie e le gemme sono porzioni diverse della pianta e possono subire una contaminazione con un meccanismo differente da parte degli inquinanti.

2.2.1 Normativa degli integratori alimentari

Esiste una normativa che stabilisce i limiti massimi di legge degli IPA in diverse matrici, tra cui gli integratori alimentari. Essa è espressa nel “Regolamento (UE) 2015/1933 della Commissione del 27 ottobre 2015” (modifica del Regolamento (CE) n. 1881/2006). I limiti sono applicati a “integratori alimentari contenenti prodotti botanici e loro preparati”, intendendo con ciò “preparazioni ottenute da piante (ad esempio, piante intere, a pezzi o tagliate, parti di piante) mediante processi vari (come spremitura, torchiatura, estrazione, frazionamento, distillazione, concentrazione, essiccazione e fermentazione). In tale definizione rientrano anche piante triturate o polverizzate, parti di piante, alghe, funghi, licheni, tinture, estratti, oli essenziali, succhi ottenuti per spremitura ed essudati lavorati” [11].

I limiti di legge nel Regolamento (UE) 2015/1933 riguardano solo determinati IPA; in particolare è previsto un limite massimo per:

- il benzo[a]pirene, pari a 10 µg/Kg
- per la somma di benzo[a]antracene, crisene, benzo[b]fluorantene e benzo[a]pirene, che deve essere pari a 50 µg/Kg

Nel Regolamento (CE) n. 1881/2006, inizialmente, il limite era espresso in µg/Kg di peso fresco di prodotto. Per quanto riguarda gli integratori alimentari, si presume che la valutazione sia su Kg di prodotto destinato alla produzione dell'integratore, quale l'estratto [11].

3. STATO DELL'ARTE

L'interesse per gli idrocarburi policiclici aromatici ha coinvolto numerosi studiosi nel corso degli anni. La continua attenzione è posta sulla ricerca di tecniche che siano sempre più selettive e sensibili nella valutazione degli IPA per varie matrici.

Come anticipato precedentemente, le foglie e le gemme degli alberi sono in grado di adsorbire gli IPA, sia quando essi sono in fase gassosa, sia quando sono adsorbiti al particolato atmosferico. Queste possono quindi considerarsi una sorta di bioindicatore di inquinanti in grado di monitorare la qualità dell'aria.

In questo lavoro, si sono anche valutati studi pregressi su matrici solide con l'impiego della tecnica di microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME).

3.1 VEGETAZIONE: UN BIOINDICATORE

Il biomonitoraggio è un approccio indiretto che impiega forme di vita in grado di accumulare i contaminanti, come una sorta di campionatori naturali.

La vegetazione può essere considerata un "bioindicatore" perché sensibile a cambiamenti apportati da fattori inquinanti all'ecosistema in cui vive.

Un bioindicatore deve:

- non interferire con la concentrazione dei contaminanti dello studio
- essere residente e abbondante
- avere dimensioni ragionevoli
- fornire un dato integrato nel tempo
- accumulare i contaminanti in modo che la concentrazione nei "tessuti" sia idealmente lineare di quella nell'ambiente [12]

La presenza di numerose aree verdi è correlata al fatto che la vegetazione è in grado di mitigare l'inquinamento atmosferico, catturando parte degli inquinanti presenti nell'aria, tra cui gli IPA e, quindi migliorando la qualità dell'aria.

Le foglie di diverse specie sono state utilizzate come bioindicatore dell'inquinamento atmosferico, in particolare di inquinanti organici lipofili, tra cui gli IPA.

Le foglie di arancio amaro (*Citrus aurantium*) sono state impiegate per un biomonitoraggio annuale degli inquinanti emergenti presenti nell'aria in aree urbane della città di Siviglia. La distribuzione spaziale ha permesso di valutare l'influenza delle aree popolate nella concentrazione di alcuni composti studiati, come ad esempio alcuni dei composti studiati, come i plastificanti e i

composti perfluorurati, e l'influenza delle aree industriali, nella concentrazione dei tensioattivi [13].

Gli aghi della famiglia delle conifere sono in grado di accumulare, un'ampia gamma di composti non volatili, semivolatili e volatili di diversa struttura e polarità, come i pesticidi e gli inquinanti organici persistenti.

In un lavoro condotto da Baroudi et al [14], è stata sviluppata una procedura di estrazione basata sulla metodica QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*, ovvero tecniche d'analisi che sfruttano un metodo rapido, facile, economico, efficace, robusto e sicuro) per l'estrazione e l'analisi simultanea di 134 pesticidi, 22 policlorobifenili e 16 idrocarburi policiclici aromatici. Una volta sviluppato, il metodo è stato applicato a campioni di conifere raccolti in 15 diversi siti del Libano settentrionale. L'analisi dei campioni raccolti ha mostrato una persistenza dei diversi inquinanti valutati a seconda delle caratteristiche di ciascun sito.

In uno studio guidato da un gruppo di ricerca in Svezia [15], si è effettuato un confronto tra il contenuto degli IPA nelle foglie di quercia (*Quercus palustris*) e negli aghi di pino nero (*Pinus nigra*) di Göteborg, in Svezia, durante l'estate del 2018. Le conifere hanno mostrato di essere in grado di catturare una quantità maggiore di particolato rispetto alle latifoglie, e ciò può essere correlato alle loro proprietà aerodinamiche. In particolare, l'accumulo di IPA nelle foglie può essere espresso sfruttando il coefficiente di ripartizione aria-pianta (K_{PA}), definito come il rapporto tra le concentrazioni di equilibrio di IPA presenti nell'aria (C_A) e nella pianta (C_P) (Equazione 1):

$$K_{PA} = \frac{C_A}{C_P}$$

Equazione 1

Ipotizzando che il comparto di stoccaggio lipofilo delle piante si comporti come l'ottanolo, K_{PA} risulta direttamente proporzionale al coefficiente di ripartizione ottanolo-aria (K_{OA}), entrambi in funzione della temperatura.

L'accumulo dei contaminanti nelle piante è determinato da uno dei seguenti processi:

- Deposizione gassosa governata dall'equilibrio di ripartizione tra la vegetazione e la fase gassosa
- Deposizione gassosa governata dalla cinetica
- Deposizione umida e secca di particelle appartenenti al particolato atmosferico

A seconda del valore di $\log_{10}(K_{OA})$, ne prevale uno. Se minore di 9, il processo dominante è il primo, mentre, se è più elevato il processo prevalente è quello di deposizione delle particelle. Il coefficiente ottanolo-aria, quindi, svolge un ruolo fondamentale nell'accumulo di IPA gassosi,

semivolatili, nelle foglie. La vegetazione rimuove maggiormente dall'atmosfera gli IPA ad elevata massa molecolare perché caratterizzati da maggior lipofilia.

Inoltre, è riscontrata una forte correlazione tra le concentrazioni nell'aria di IPA e NO_2 , dimostrando che gli inquinanti provengono in larga misura dalle stesse fonti.

Come anticipato, sia K_{PA} che K_{OA} sono influenzati dalla temperatura. Se la temperatura ambientale è:

- Bassa (primavera, autunno): IPA in fase gassosa (bassa massa molecolare, MM) si ripartiscono preferenzialmente nella superficie cerosa delle foglie
- Alta (estate): IPA volatilizzano e tornano in atmosfera [15]

Nel caso dello studio sulle gemme trattate in questo lavoro di tesi, se la loro raccolta avviene ad inizio primavera, si può affermare che il quantitativo di IPA a basso peso molecolare in esse contenuto sia mediamente elevato rispetto a quello di IPA ad alta MM.

3.2 ESTRAZIONE DI IPA DA MATRICI VEGETALI

Al fine di rilevare concentrazioni di IPA in matrici vegetali, in letteratura sono state applicate diverse tipologie di estrazione, dalle più convenzionali (Soxhlet o ultrasuoni) alle più alternative, quali: ASE/PLE (estrazione accelerata con solvente/estrazione tramite liquidi pressurizzati), MAE (estrazione assistita da microonde); SFE (estrazione con fluidi supercritici o subcritici) [7]. Lo scopo di queste tecniche è ottenere un'efficienza di estrazione che sia la più elevata possibile.

L'estrazione in fase solida (SPE) viene impiegata per una eventuale purificazione o pulizia (*clean up*) dell'estratto con l'uso di opportuni solventi organici, utili alla successiva separazione cromatografica, e, successivamente, preconcentrato mediante evaporazione rotativa, sotto flusso di gas inerte di azoto ad elevata purezza oppure utilizzando il vuoto o la pressione ridotta.

L'analisi e la quantificazione degli IPA può essere effettuata o sfruttando una tecnica accoppiata, quale la GC-MS (gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa), o la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC); entrambe forniscono risultati accurati e affidabili. La GC-MS è un metodo di analisi, identificazione e misurazione ampiamente accettato per la quantificazione di IPA atmosferici grazie alle sue caratteristiche di selettività, sensibilità, robustezza e risoluzione [7].

Per la ricerca di IPA in matrici vegetali si segue un diagramma di flusso che prevede gli steps riportati in Figura 5.

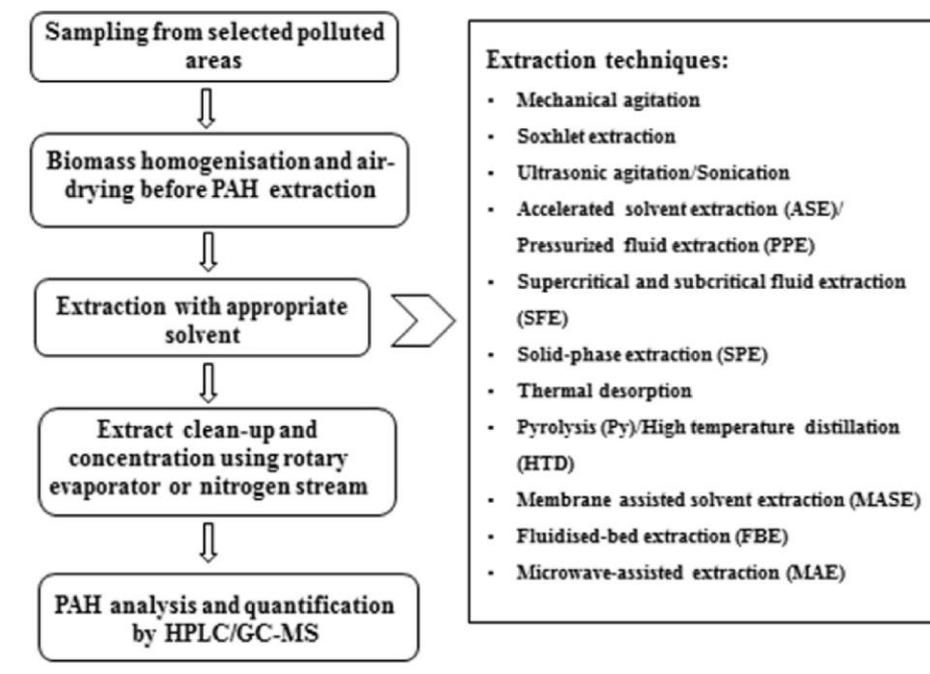


Figura 5: Diagramma di flusso per valutazione di IPA in matrici vegetali [7]

I solventi organici utilizzati nelle tecniche di estrazione meno recenti sono indicati in Tabella 2.

Tabella 2: Principali solventi organici utilizzati nelle tecniche di estrazione meno recenti [7]

Sl. No.	Extraction technique	Solvent
1.	Mechanical agitation	Hexane, hexane:acetone, toluene, t-butanol, 2-propanol.
2.	Soxhlet extraction	DCM, hexane, toluene, hexane:acetone (1:1), diethylether, cyclohexane, acetone.
3.	Sonication	Cyclohexane, DCM, hexane.
4.	ASE/PFE	DCM, hexane, acetone, toluene.
5.	PHWE/SWE	Hot water under pressure
6.	SFE	Supercritical fluids (e.g. CO ₂ in supercritical state)
7.	SPE	Hexane, methanol, ethyl acetate, isopropyl alcohol, methylene chloride.
8.	MASE	Cyclohexane, methanol, ethyl acetate, DCM, diisopropyl ether.
9.	MAE	Hexane, DCM, acetonitrile, acetone, hexane:acetone (1:1).

Il solvente influenza in modo diretto il processo di estrazione, che dipende dalla solubilità degli IPA nel solvente impiegato a seconda della sua polarità e delle interazioni solvente-matrice. Il solvente ideale dovrebbe essere atossico, non infiammabile, chimicamente stabile e inerte, per evitare reazioni con gli analiti. La viscosità, la tensione di vapore e il punto di congelamento dovrebbero essere bassi per rendere più semplice la sua manipolazione e conservazione. Dovrebbe

poi essere altamente selettivo nei confronti degli IPA rispetto agli altri componenti della matrice ed essere compatibile con la successiva analisi cromatografica [7].

Con il passare degli anni, si è cercato di impiegare un quantitativo di solvente minimo o nullo al fine di rivolgere l'attenzione verso processi più sostenibili ed ottenere una miglior efficienza estrattiva. Tali tecniche includono: microestrazione a goccia singola; microestrazione in fase solida con fibra fredda; MSPD, ovvero microestrazione basata su SUPRAS (*Supramolecular Solvent extraction*: estrazione con solvente supramolecolare) e i metodi di estrazione QuEChERS, già sopra citati.

3.2.1 Solventi eutettici profondi

Accanto alle classiche tecniche di estrazione, si è proposto, nel corso degli anni, l'impiego di solventi diversi.

I solventi eutettici profondi (DES, *Deep Eutectic Solvents*) sono, infatti, solventi alternativi e sostenibili per una chimica analitica green.

Vengono comunemente considerati “liquidi ionici di nuova generazione” grazie a caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle dei tradizionali, come la bassa volatilità, la conduttività e l'elevato potere solvente. Rispetto ai convenzionali presentano però numerosi vantaggi che negli ultimi anni ne hanno facilitato una veloce diffusione in numerosi settori della chimica. Si sono rivelati ottimi solventi per le biotrasformazioni, la sintesi organica e la preparazione di materiali, sostituendo solventi organici volatili o poco efficienti. Uno dei settori in cui i DES sono risultati maggiormente promettenti è quello dell'estrazione da fonti naturali. Nonostante il loro recente successo alcune problematiche legate al loro utilizzo risultano ad oggi ancora irrisolte, tra queste, una completa caratterizzazione eco-tossicologica ed il recupero quantitativo dei composti dalla miscela solvente.

Questi solventi risultano compatibili a tecniche di microestrazione quali: LPME (Microestrazione in fase liquida), UAME (Microestrazione assistita da ultrasuoni) e MAE (Estrazione assistita a microonde).

Un caso studio ha sfruttato un DES composto da un nanoferrofluido a base di ossido di ferro per effettuare una microestrazione selettiva di IPA in campioni di caffè [16]. Si sono adoperati dei NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*), ovvero dei solventi eutettici profondi ma di origine naturale, ottenuti da una miscela di accettori di legami idrogeno (HBA) e donatori di legami idrogeno (HBD), che provengono principalmente da piante o costituenti cellulari. In particolare, sono stati sintetizzati quattro tipi di NADES dalla combinazione casuale di mentolo, borneolo, canfora e timolo e si è studiato il loro comportamento con e senza aggiunta di ossido di ferro *ultrasmall* (“nanoferrofluido”). Il sistema ottimale è costituito da una classe di NADES ternaria formata da mentolo, borneolo e canfora in un rapporto molare di 5:1:4 con un'aggiunta di 80 mg di nanoferrofluido.

Un altro studio ha impiegato i NADES per l'estrazione di antocianine (sostanze con azione antiossidante e antiinfiammatoria) dalla specie *Catharanthus roseus* [17]. È stata condotta un'analisi dei dati multivariata e, in particolare, tra i NADES testati, l'acido lattico-glucosio (LGH) e 1,2-propandiolo-cloruro di colina (PCH) hanno presentato un alto potere di estrazione nei confronti delle antocianine. Rispetto ai solventi convenzionali, uno svantaggio dei NADES è rappresentato dalla loro elevata viscosità, che causa un lento trasferimento di massa e determina una diminuzione della loro capacità di estrazione; perciò, i risultati migliori si sono raggiunti effettuando l'estrazione sotto agitazione, a 40 °C per 30 minuti.

3.2.2 Microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME)

In generale, la microestrazione in fase solida (SPME) consente, in un solo semplice passaggio, di effettuare: il campionamento, l'isolamento e l'arricchimento degli analiti.

Sfruttando il principio di assorbimento/adsorbimento e desorbimento, si avvale di una fibra rivestita con una fase estraente per concentrare i composti volatili e semivolatili presenti in un campione.

La scelta del rivestimento della fibra è correlata al tipo di estrazione degli analiti. Nel dettaglio, se l'estrazione avviene per:

- Assorbimento (molecole di analita sono solvate da quelle del rivestimento): si predilige l'impiego di Polidimetilsilossano (PDMS) o Poliaccrilato (PA)
- Adsorbimento (interazione dell'analita sulla superficie porosa del rivestimento): si preferisce usare una miscela di più fasi, PDMS/DVB (Polidimetilsilossano/Divinilbenzene), CAR/PDMS (Carboxen/Polidimetilsilossano), CW/DVB (Carbowax/Divinilbenzene), DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzene/Carboxen/Polidimetilsilossano).

Controllando la polarità e lo spessore del rivestimento della fibra, mantenendo costante il tempo di campionamento e calibrando numerosi altri parametri dell'estrazione, con la SPME è possibile ottenere risultati altamente costanti e quantificabili, anche quando gli analiti sono presenti nel campione a basse concentrazioni.

La microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME) è una tecnica che utilizza una fibra (ad esempio costituita da silice fusa), rivestita esternamente da una piccola quantità di fase stazionaria, che viene esposta allo "spazio di testa" che corrisponde al volume sovrastante il campione. Una volta completata l'estrazione, gli analiti, volatili o semivolatili (come gli IPA), vengono desorbiti direttamente nello strumento analitico, nel dettaglio nella porta di iniezione di un gascromatografo [12].

In Figura 6 è riportato uno schema della HS-SPME [18].

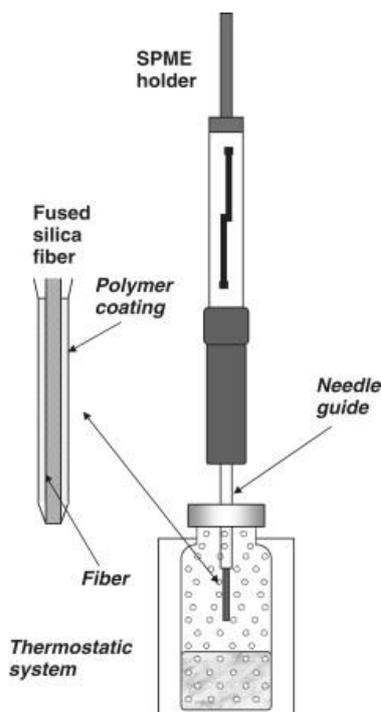


Figura 6: Schema della tecnica HS-SPME [18]

La SPME:

- non utilizza solventi
- è facile da automatizzare
- non distrugge il campione
- è applicabile a quasi tutti i campioni o le matrici
- le fibre sono riutilizzabili ed economiche
- la piccola dimensione delle fibre ne rende agevole l'utilizzo anche per il lavoro sul campo
- è compatibile con gli strumenti GC o HPLC [12]

In uno studio condotto da Ratola et al [19], è stata validata una metodologia per l'estrazione e la quantificazione di 16 IPA in aghi e corteccia di due specie di pino (*Pinus pinaster Ait.* e *Pinus pinea L.*) basata sull'estrazione assistita da microonde accoppiata alla microestrazione in fase solida dello spazio di testa (MA-HS-SPME) seguita da GC-MS. Un forno a microonde domestico è stato adattato per consentire l'introduzione di un matraccio contenente i campioni ed era collegato a un condensatore e a una fibra SPME. I rivestimenti delle fibre testate erano costituiti da polidimetilsilossano (PDMS) da 100 μm e polidimetilsilossano/divinilbenzene (PDMS/DVB) da 65 μm . I campioni erano costituiti da corteccia, macinata con pestello e mortaio, o aghi, sminuzzati in piccoli pezzi, che sono stati inseriti nei matracci con un opportuno solvente di reazione (50 mL di H_2O , 900 μl di etanolo e 50 ng/g di surrogato deuterato di IPA). Dopo l'estrazione dalla durata di 60 minuti, la fibra SPME è stata rimossa e inserita nel gascromatografo accoppiato alla spettroscopia di massa (GC-MS) e desorbita tramite l'uso di un iniettore in modalità *splitless*.

L'applicazione del metodo è stata studiata per campioni naturalmente contaminati provenienti da quattro siti in Portogallo, due urbani (Porto) e due rurali (Estrela e Loulé). Sia per gli aghi che per la corteccia, i siti urbani hanno mostrato una maggiore incidenza rispetto a quelli rurali e, in particolare, le specie di *P. pinaster* avevano livelli più elevati di IPA rispetto a quelle di *P. pinea* nello stesso tipo di sito.

Se si considerano le differenze tra aghi e corteccia nello stesso sito, si verifica che, per i siti rurali, i valori dei livelli degli IPA sono simili per le due matrici, mentre per le aree urbane la concentrazione totale degli IPA negli aghi raddoppia rispetto alla corteccia

Gli aghi tendono ad assorbire prevalentemente IPA più leggeri sul loro strato ceroso ed hanno una maggiore affinità per la deposizione di materiale particolato nella superficie porosa della corteccia. Invece, i campioni di corteccia intrappolano percentuali più elevate di IPA più pesanti.

La corteccia mostra, tuttavia, un comportamento meno coerente tra un sito e l'altro, il che potrebbe essere spiegato dal fatto che i parametri meteorologici, come il vento o la pioggia, possano contribuire a una più facile rimozione del materiale particolato dalla superficie della rispettiva matrice [19].

In un altro lavoro è stato sviluppato un metodo per la determinazione quantitativa di 8 idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei vegetali, basato sulla HS-SPME, accoppiata alla gascromatografia [20]. Si è confrontata la capacità di estrazione degli IPA di due fibre: la prima sol-gel contenente l'unità calix[6]arene (rappresentata in Figura 7, [21]) e una in PDMS.

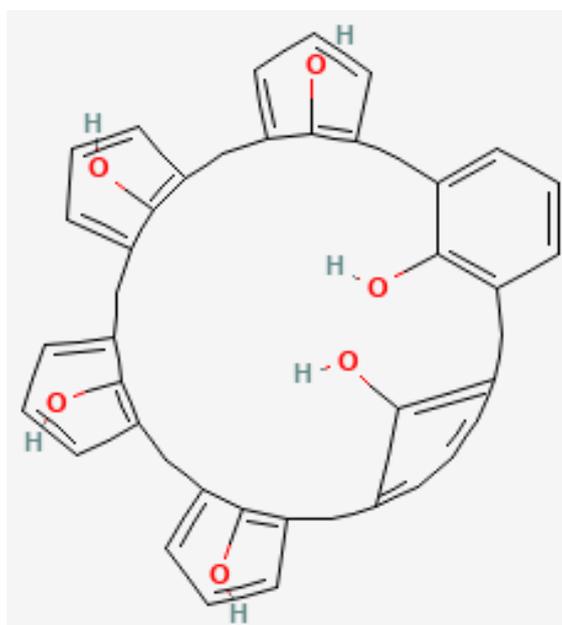


Figura 7: Calix[6]arene [21]

L'elevata capacità di estrazione dei rivestimenti SPME sol-gel contenenti calix[6]arene è dovuta alle interazioni: π - π , idrofobiche e di inclusione ospite-ospite.

Inoltre, l'elevata area superficiale del rivestimento sol-gel influenza direttamente l'efficienza di estrazione in SPME che risulta la più alta possibile.

La tostatura del caffè è un processo necessario che comporta uno sviluppo di colore, aroma e sapore, essenziali per la qualità del prodotto. Il problema nasce dal fatto che può portare alla formazione di composti indesiderati quali gli IPA, correlabile alla pirolisi dei lipidi del caffè, dei carboidrati e degli amminoacidi. Perciò, l'estrazione di idrocarburi policiclici aromatici è stata valutata anche nel caffè.

A titolo d'esempio, si menziona uno studio [22] volto all'estrazione e determinazione degli IPA e dei loro derivati nitrati e ossigenati nelle bevande a base di caffè, impiegando un efficiente metodo di microestrazione in fase solida su fibra fredda (CF-SPME), raffreddata da azoto liquido (Figura 8, [23]). A differenza degli esempi riportati sopra, l'estrazione degli analiti è stata effettuata con iniezione diretta (DI) e non in spazio di testa (HS). Inoltre, i campioni di caffè sono stati ottenuti attuando una infusione del caffè macinato. Per ottimizzare il metodo si sono impiegati due differenti rivestimenti di fibra: PDMS (100 μm) e PDMS/DVB (85 μm), che è risultata la scelta migliore, essendo più efficiente nell'estrazione della maggior parte degli analiti.

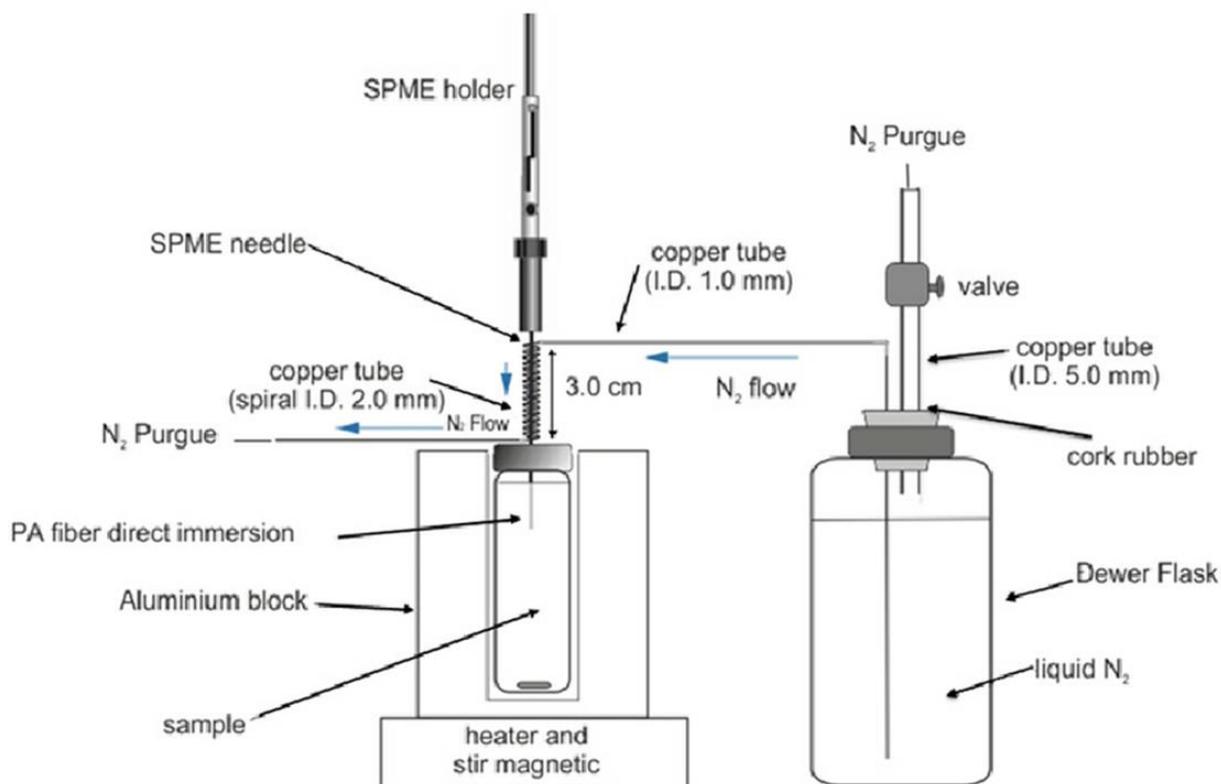


Figura 8: Rappresentazione schematica del funzionamento del dispositivo CF-SPME [23]

4. ACCOPPIAMENTO GC-MS

4.1 GAS CROMATOGRAFIA

La GC nasce da un'idea di Martin e Synge (1941) (premio Nobel nel 1952) e poi sviluppata da James e Martin (1952).

La gascromatografia (GC) è una tecnica analitica comunemente usata per separare e analizzare i diversi composti di una miscela, in particolare quelli volatili e semivolatili. La GC è una tecnica analitica apprezzata perché combina un eccellente potere risolutivo con rapidità e sensibilità.

Come altre tecniche cromatografiche, la GC impiega una fase stazionaria e una fase mobile. Nella GC, la fase mobile è un gas inerte e ad elevata purezza, solitamente N₂, He (utilizzato in questo lavoro di tesi), Ar e H₂, mentre la fase stazionaria può essere un adsorbente solido (cromatografia gas-solido - GSC) o un liquido legato chimicamente a un supporto inerte (cromatografia gas-liquido - GLC o semplicemente GC).

La separazione cromatografica avviene nella colonna GC, la cui scelta deve tener conto di: fase stazionaria, diametro interno della colonna (D.I.), spessore del film e lunghezza della colonna. Questi fattori influiscono su efficienza, risoluzione e capacità del campione della colonna [12].

Le colonne cromatografiche disponibili per la gascromatografia sono di due tipi:

- Impaccate: sono tubi in acciaio inossidabile, PTFE o vetro riempiti di fase stazionaria, che può essere solida o liquida, che è continuamente attraversata da un gas di trasporto. Il diametro interno è compreso tra 2 e 4 mm e lunghezza tra 1 e 4 m.
- Capillari: hanno le pareti costituite da acciaio inossidabile o silice fusa. La fase stazionaria è legata alle pareti. Il diametro interno è compreso tra 0,1 e 0,32 mm e la lunghezza è 20-30 m.

Esistono diversi tipi di colonne capillari (Figura 9, [24]), di cui le più importanti sono:

- WCOT (*Wall Coated Open Tubular*): dove la fase stazionaria ricopre le pareti
- SCOT (*Support Coated Open Tubular*): in cui la fase stazionaria è ancorata ad un supporto;
- PLOT (*Porous Layer Open Tubular*): in cui la fase stazionaria solida riveste la parete interna del capillare.

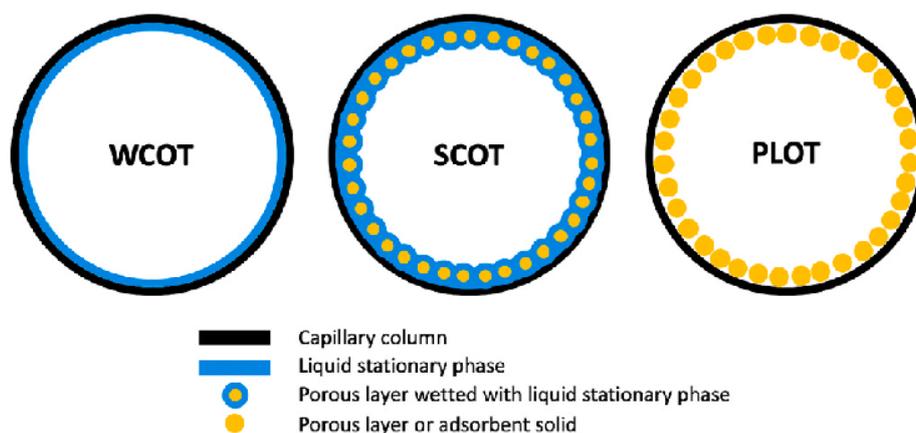


Figura 9: Schema delle possibili fasi stazionarie nelle colonne capillari [24]

Quelle comunemente impiegate sono le capillari poiché rappresentano un'importante innovazione per la loro rapidità di eluizione e per una risoluzione migliore (il numero di picchi risolti, in metà tempo, è superiore di oltre quattro volte quello della colonna impaccata). Inoltre, esse hanno una miglior efficienza separativa correlata alla lunghezza che esse possono raggiungere, una minor contropressione verso la colonna e un migliore interfacciamento con lo spettrometro di massa. La separazione delle sostanze avviene sfruttando le diverse temperature di ebollizione e proprietà chimico-fisiche. La polarità della fase stazionaria svolge un ruolo fondamentale perché viene scelta opportunamente in modo da poter interagire con le molecole d'interesse.

Nel lavoro di tesi, la colonna impiegata presenta al suo interno una fase a bassa polarità, composta da 1,4-bis(dimetilsilossi)fenilene dimetilpolisilossano *Crossbond*® [25], che incorpora gruppi fenilici (chiamati silarilene) nel supporto polimerico (selettività simile alla fase 5% fenile / 95% polidimetilsilossano). Questa fase risulta ideale per analisi di composti semivolatili poco polari o apolari, quali gli idrocarburi policiclici aromatici [24].

La strumentazione viene chiamata gascromatografo e comprende:

1. Una bombola che contiene il gas carrier che è collegata allo strumento e mediante regolatori di flusso è possibile controllare la sua velocità di erogazione. Nel lavoro di tesi si è adoperato He ad elevata purezza (99,9%) come fase mobile.
2. Un iniettore e una camera di iniezione che permettono l'introduzione del campione in colonna. L'elevata temperatura della camera di iniezione permette una rapida vaporizzazione del liquido iniettato in essa, che è poi trasportato dal gas carrier in testa alla colonna. La temperatura della camera può essere modificata attraverso un sistema di resistenze.

La presenza di un autocampionatore permette un'introduzione del campione in colonna priva di errori da parte dell'operatore. L'autocampionatore utilizza una microsiringa

automatica in grado di effettuare un'iniezione forando un setto (in gomma o silicone) e deponendo il piccolo volume di campione all'interno della camera di iniezione.

L'iniettore, mostrato in Figura 10, può lavorare in due modalità:

- *Split*: il campione viene premiscelato con il gas di trasporto e solo una piccola porzione è introdotta effettivamente in colonna, mentre il restante è diretto verso la valvola di spurgo. Si impiega per concentrazioni elevate di analiti, analisi di matrici complesse o alti volumi di campione.
- *Splitless*: tutto il campione è introdotto in colonna poiché la valvola di spurgo è mantenuta chiusa. È adatta all'analisi in tracce che è di nostro interesse in questo lavoro di tesi [12].

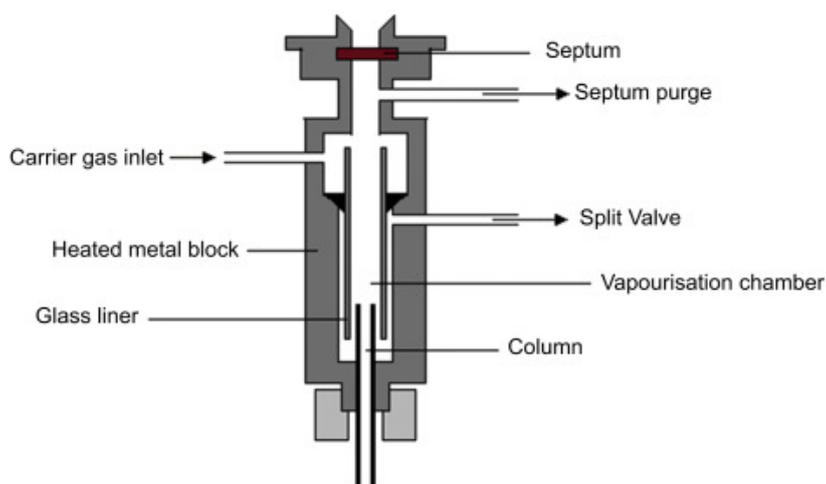


Figura 10: Schema dell'iniettore split/splitless

3. Una colonna capillare lungo il cui cammino avviene l'effettiva separazione degli analiti.
4. Una camera termostatica, denominata "forno" (Figura 11), dove alloggia la colonna capillare avvolta a forma di spirale e che garantisce una termostatazione e la possibilità di effettuare rampe (programmate di temperatura) regolando finemente la temperatura.

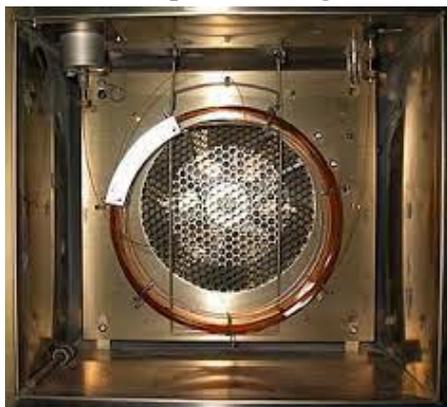


Figura 11: Interno del forno in cui è possibile osservare la colonna capillare

5. Un rivelatore che permette di rivelare la presenza degli analiti nel gas carrier è posto alla fine della colonna ed è collegato ad un sistema di elaborazione dei dati. Esso può essere selettivo o universale: il primo tipo permette di identificare solo una determinata classe di composti, mentre il secondo è atto a rivelare tutte le sostanze sopra ad una certa concentrazione.

In Figura 12 è mostrato uno schema di un gascromatografo.

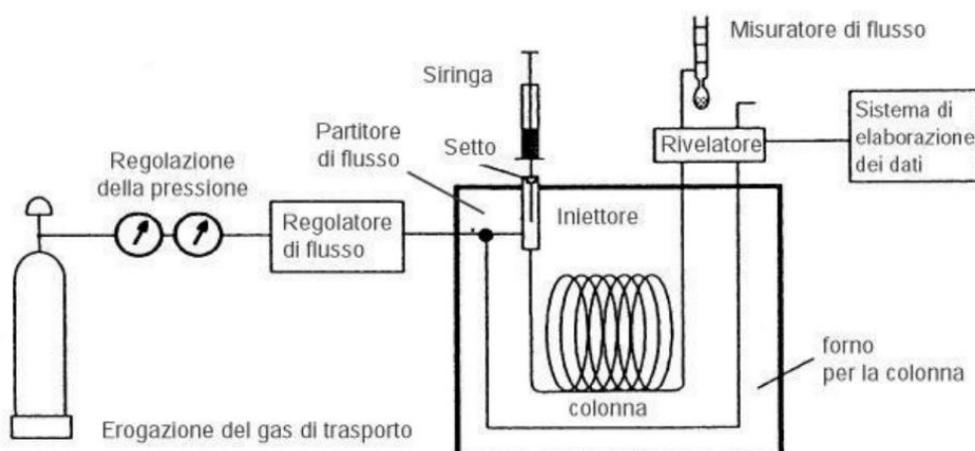


Figura 12: Schema di un gascromatografo

Dall'analisi gascromatografica si ottengono i cromatogrammi, che sono grafici che riportano in ascissa il tempo di ritenzione delle varie sostanze, ovvero il tempo relativo al loro rilascio dalla colonna che è rappresentato sotto forma di un picco gaussiano e in ordinata la risposta del rivelatore. Il cromatogramma restituisce, quindi, informazioni sia qualitative, dal tempo di ritenzione di ciascun analita, sia quantitative tramite l'area del picco che è direttamente legata alla concentrazione di analita.

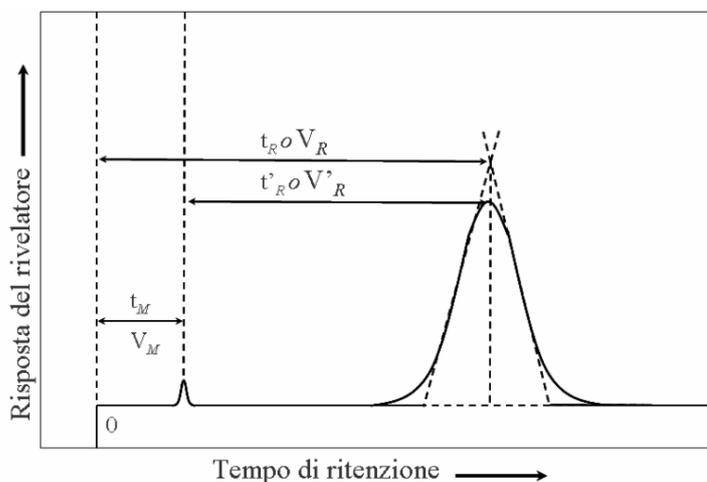


Figura 13: Esempio di un generico cromatogramma

In Figura 13 è riportato un esempio di un cromatogramma. È possibile osservare un segnale molto piccolo il cui simbolo è V_M ed indica il “volume morto”, ovvero il volume interstiziale o interparticellare della colonna. Il picco più intenso è invece relativo ad un generico analita di interesse che cade ad un determinato tempo di ritenzione (t_{rit} o t_R).

4.2 SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi in tracce di sostanze. Permette lo studio di specie chimiche. Nasce come tecnica fisica per lo studio degli isotopi degli elementi: è in grado di differenziare ioni gassosi in base al loro rapporto m/z .



Alle molecole viene fornita una quantità sufficiente di energia tale da ionizzarla, ovvero da strapparle un elettrone; in questo modo si trasforma in un radical catione $M^{\cdot+}$. La ionizzazione avviene, ad esempio, tramite una sorgente a ionizzazione elettronica (EI o impatto elettronico, dove un fascio di elettroni colpisce la molecola) a cui segue frammentazione. Gli ioni generati sono in fase gas, per poterli ottenere è necessario avere il campione allo stato gassoso nel sistema sottovuoto. Esistono processi ibridi, come la ionizzazione allo stato liquido, ma nelle altre componenti dello strumento si trova sempre allo stato gassoso [12].

Nella spettrometria di massa si sfruttano due fenomeni correlati alla massa ed alla carica:

- 1) la traiettoria di uno ione o di una particella carica in movimento può essere modificata per azione di un campo magnetico od elettrico, e l'entità della deviazione è funzione del rapporto massa/carica della particella: a parità di carica, particelle di massa minore subiranno deviazione maggiore.
- 2) ioni o particelle cariche, accelerati da un campo elettrico, assumo velocità diverse in dipendenza della loro massa: a parità di carica, particelle di massa maggiore assumono velocità minore.

Ad oggi la spettrometria di massa è un metodo analitico consolidato che offre una serie di vantaggi come alta selettività, alta sensibilità e la possibilità di determinare contemporaneamente più analiti in uno stesso campione.

Uno spettrometro di massa è impiegato sia per la rivelazione e l'identificazione di molecole sconosciute, come in questo lavoro di tesi, sia per l'analisi di sostanze in tracce.

Lo spettro di massa di una molecola risulta caratteristico. Questa tipologia di grafico prevede in ascissa m/z degli ioni e in ordinata l'abbondanza ionica. Gli spettri di massa permettono di ottenere un'informazione di tipo qualitativo, connettendo un certo spettro ad uno specifico composto. Infatti, i picchi caratteristici sono valutati tramite l'uso di un sistema che permette di confrontare quelli acquisiti da vari databases nel mondo (biblioteche di spettri), fornendo una tabella con probabilità decrescente che i segnali in esame siano effettivamente i medesimi.

Lo schema in Figura 14 mostra lo spettrometro di massa scomposto nelle sue componenti.

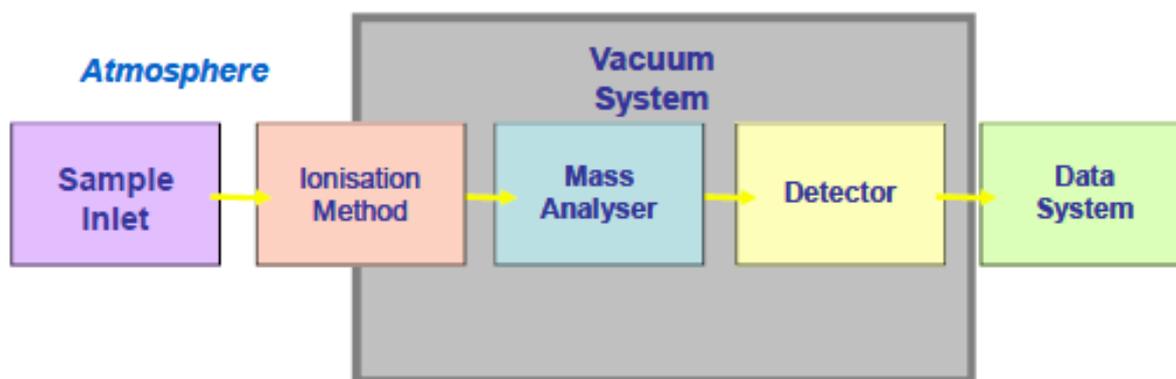


Figura 14: Schema delle componenti di uno spettrometro di massa

L'analisi prevede una generazione, selezione e rivelazione di ioni provenienti dalla molecola in esame.

4.2.1 Sorgente di ioni

La sorgente di ioni può essere sottovuoto o a pressione atmosferica nel caso della tecnica API (*Atmospheric Pressure Interface*). Generalmente essa è posta in condizioni di vuoto, così come l'analizzatore di massa e il detector. Il vuoto è necessario per evitare urti con molecole quali ad esempio H_2O , O_2 e N_2 presenti nell'aria, poiché l'impatto con esse causerebbe deviazioni di traiettoria, collisioni con le pareti e frammentazione degli ioni in specie secondarie indesiderate.

Nella sorgente avviene la produzione degli ioni in fase gas ad opera di un'interazione delle molecole in fase gas con un flusso di particelle ad elevata energia. A seguito di questa interazione vengono prodotte anche molecole neutre che, però, vengono indirizzate lontano dall'analizzatore di massa in cui, infatti, arrivano solo le particelle cariche, ossia gli ioni.

Come mostrato sopra, la specie che si forma nel processo di ionizzazione è un radical catione M^+ , detto "ione molecolare", che ha la stessa massa della molecola da cui è stato generato e che può subire frammentazione.

Le sorgenti possono distinte a seconda dell'energia che forniscono al campione. Possono essere:

- *Soft*: se è fornita una piccola quantità di energia alla molecola, che perciò si frammenta poco; lo ione genitore è quello presente nello spettro in maggior quantità. Forniscono informazioni sul peso molecolare dell'analita. Un esempio di questo tipo di sorgente è indicato come CI (ionizzazione chimica).
- *Hard*: se è fornita una grande quantità di energia alla molecola, che perciò frammenta molto lo ione genitore (o molecolare). Si ottengono informazioni sulla struttura delle molecole che possono essere identificate. Un esempio è rappresentato da EI (ionizzazione elettronica).

La sorgente EI è costituita da un filamento metallico (di tungsteno o renio) riscaldato, attraverso cui passa della corrente. Applicando una differenza di potenziale positiva rispetto al filamento, alcuni elettroni del filamento vengono strappati e attratti dalla polarità positiva, generando un flusso costante di elettroni che acquista un'energia molto elevata (70 eV). Quando questo flusso incontra una molecola si genera un fascio di ioni, generalmente positivi, che viene diretto verso un analizzatore da un repeller. Lo schema del funzionamento della sorgente EI è rappresentato in Figura 15 [12].

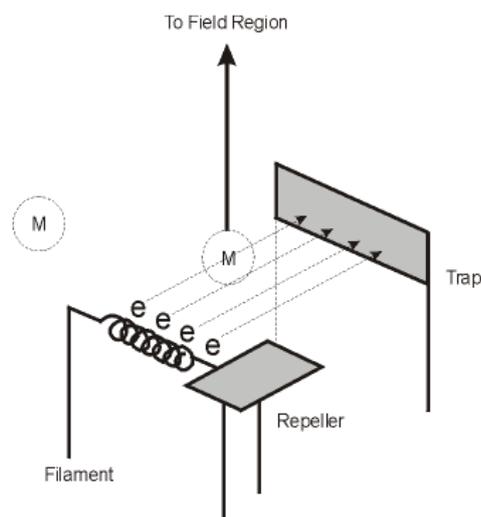


Figura 15: Funzionamento della sorgente EI [12]

Indicativamente solo una molecola su mille si ionizza a 70 eV e produce uno spettro di massa. Un esempio è mostrato nella Figura 16 [12].

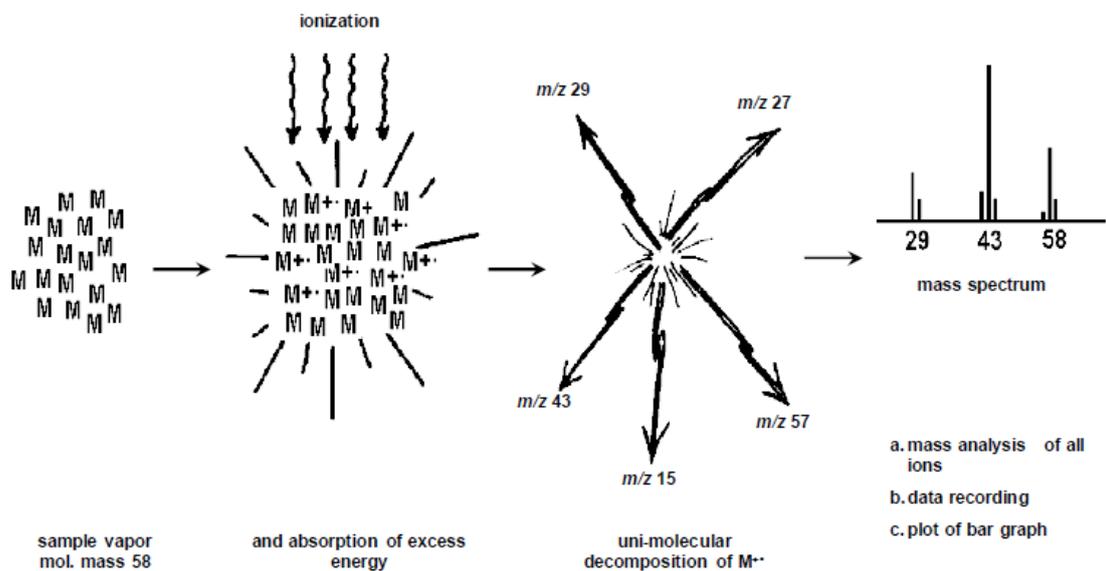


Figura 16: Esempio di ionizzazione a 70 eV [12]

4.2.2 Analizzatore quadrupolare

L'analizzatore di massa permette di separare gli ioni del flusso ionico e selezionarli in base al loro m/z . In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un analizzatore a singolo quadrupolo.

È chiamato "filtro" o "selettore" di massa perché permette il passaggio di ioni con un determinato m/z . È costituito da quattro barre su cui si applica corrente continua (DC) e alternata (AC); in questo modo si crea un campo magnetico che fa oscillare gli analiti e solo alcuni oscilleranno senza collidere contro le barre. In particolare, solo quegli ioni con un particolare m/z riescono a mantenere una traiettoria stabile e raggiungere il detector. Gli altri urteranno contro le barre, scaricandosi su esse; ciò provoca l'allontanamento dal sistema poiché le specie diventano neutre (Figura 17).

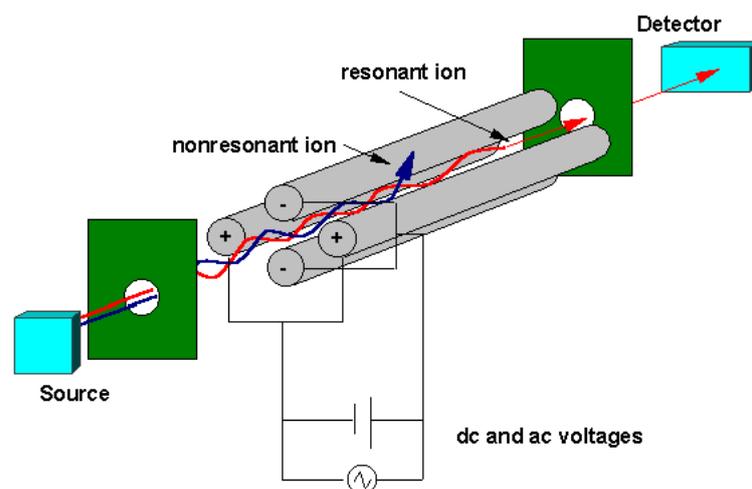


Figura 17: Funzionamento di un analizzatore di massa quadrupolare

Solo gli ioni che soddisfanno l'equazione differenziale di Mathieu (Equazione 2) possono attraversare il quadrupolo e raggiungere il detector.

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0$$

Equazione 2

Dove u rappresenta la generica direzione (x o y), ξ include la correlazione con il tempo, essendo la metà del prodotto ωt . a_u e q_u , comprendono una serie di grandezze costanti per ogni quadrupolo, quali ω , r_0 (il 'raggio' della cavità compresa tra i quattro poli), e la carica dell'elettrone e . Esse, inoltre, dipendono da U , V , e, soprattutto, dal rapporto m/z dello ione considerato (in modo inversamente proporzionale, come descritto dalle Equazioni 3 [26]).

$$a_u = \frac{8zeU}{m\omega^2 r_0^2}; \quad q_u = \frac{4zeV}{m\omega^2 r_0^2}$$

Equazioni 3

Per una data coppia di U e V (prodotti rispettivamente da DC e AC), solo specifici valori di m/z soddisfano l'equazione di Mathieu, come mostrato in Figura 18 [26]. Eseguendo una rapidissima scansione di U e V , quindi, si renderanno stabili, nel tempo, le traiettorie di ioni a diverso m/z che giungeranno al detector.

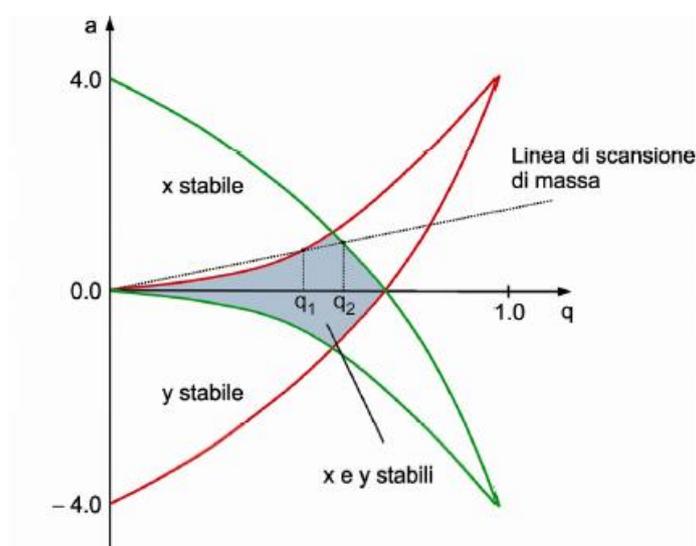


Figura 18: Diagramma di stabilità di Mathieu [26]

4.2.3 Rivelatore

Un rivelatore di ioni deve essere caratterizzato da elevata sensibilità, elevato rapporto segnale/rumore, rapidità di risposta, indipendenza della risposta dalla massa e ampio intervallo di linearità. I più importanti rivelatori digitali di ioni sono il moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo e il moltiplicatore di elettroni a dinodo discreto.

Il primo, mostrato in Figura 19, è il più diffuso ed è costituito da un tubo di vetro aperto ricoperto di un materiale semiconduttore, alle cui estremità viene applicata un'elevata differenza di potenziale. Perciò, il potenziale varia con continuità lungo la superficie del tubo, da valori negativi in corrispondenza dell'apertura (circa -3 kV) fino ad un collettore, posto a terra.

Gli ioni positivi selezionati dall'analizzatore di massa giungono al rivelatore perché attratti dal potenziale negativo dell'apertura del tubo, impattano sulla superficie, determinando la produzione di alcuni elettroni, detti elettroni primari. Questi vengono attratti dal potenziale più positivo del tubo e impattano nuovamente, producendo altri elettroni, chiamati secondari.

Il processo si ripete un certo numero di volte, determinando una moltiplicazione di elettroni, di un fattore circa 10^8 . Alla fine del tubo, gli elettroni prodotti sono diretti sulla superficie di un elettrodo collettore e il risultante impulso viene acquisito ed elaborato dal sistema elettronico [26].

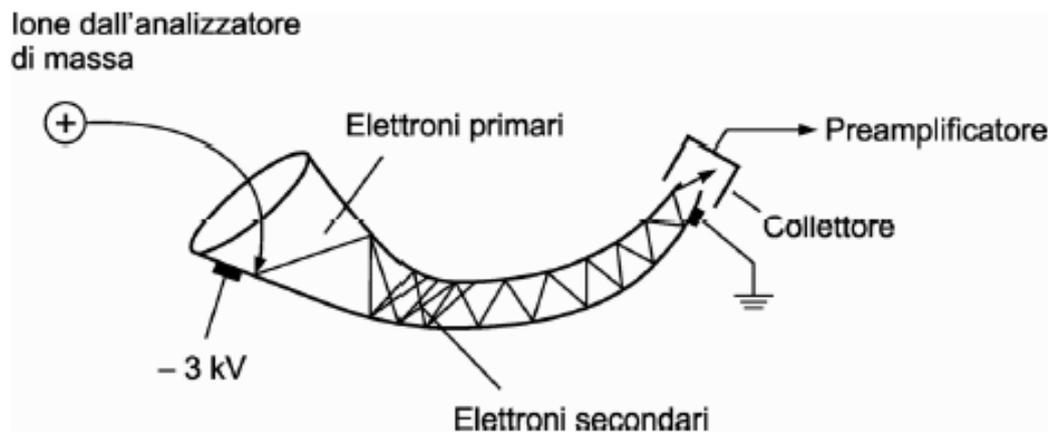


Figura 19: Elettromoltiplicatore a dinodo continuo [26]

4.3 TECNICHE ACCOPPIATE E MODALITÀ DI ACQUISIZIONE

4.3.1 Tecniche accoppiate: GC-MS

L'accoppiamento di gascromatografia e spettrometria di massa, indicato con l'acronimo GC-MS, è stata introdotto per la prima volta nel 1957 e risulta uno dei più utilizzati poiché la cromatografia, essendo una tecnica separativa, permette di distinguere i vari analiti, mentre la spettrometria restituisce informazioni sulla loro natura fino a permetterne l'identificazione.

In Figura 20 è riportato uno schema della tecnica accoppiata GC-MS [27], mentre in Figura 21 una fotografia dello strumento vero e proprio impiegato in questo lavoro di tesi.

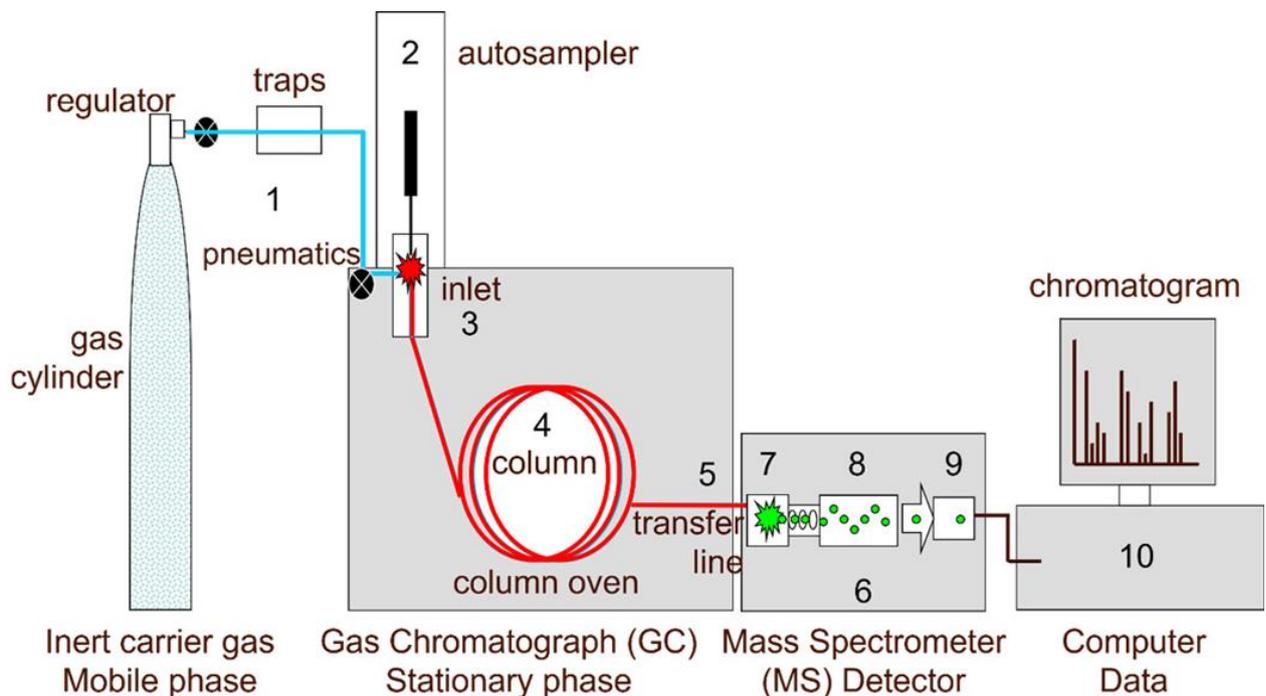


Figura 20: Schema della tecnica accoppiata GC-MS [27]



Figura 21: Fotografia dell'apparecchiatura utilizzata nel lavoro di tesi

4.3.2 Modalità di acquisizione

Le modalità di scansione che possono essere utilizzate con un GC-MS dotato di un analizzatore quadrupolare sono:

- *Total Ion Current (TIC, Figura 22)*: si sceglie un intervallo di rapporti m/z sui quali effettuare ogni singola scansione. La scansione viene fatta partire solitamente da $m/z = 50$ per evitare di comprendere ioni relativi al rumore di fondo. In questo modo si ottiene un primo cromatogramma, che permette di comprendere dopo quanto tempo le varie specie raggiungano lo spettrometro di massa: il cromatogramma viene costruito riportando in ordinata la somma delle correnti ioniche degli ioni scansionati, espressa come corrente ionica totale, e ogni punto del picco cromatografico corrisponde ad uno spettro di massa completo, sfruttabile per l'identificazione della struttura della molecola. La scansione TIC è l'ideale per analisi qualitative.
- *Single Ion Monitoring (SIM, Figura 23)*: si sceglie di monitorare solo un determinato numero di rapporti m/z , corrispondenti a ioni rappresentativi dell'analita, presenti in determinate fasce temporali. In questo caso, la selettività e la sensibilità dell'analisi sono aumentate perché lo spettrometro effettua scansioni più veloci e ripetute sugli

ioni di interesse. La scansione SIM è l'ideale per analisi quantitative e per la rivelazione di analiti in tracce.

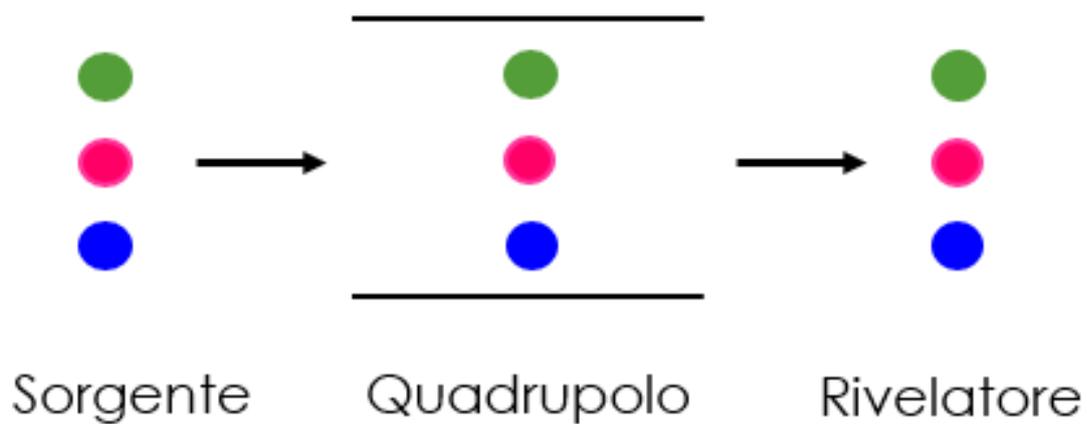


Figura 22: Schema acquisizione TIC

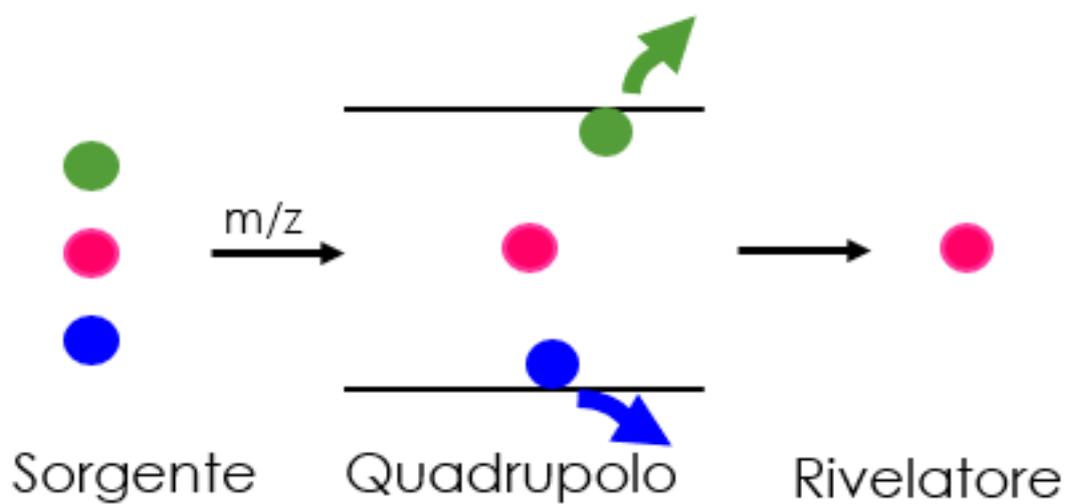


Figura 23: Schema acquisizione SIM

5. MATERIALI E METODI

5.1 MATERIALI

Durante il lavoro di tesi si sono impiegati i seguenti materiali:

- Soluzione standard di IPA 2000 ng/ μ L, contenente i 16 IPA “prioritari”, disciolti in una soluzione di acetone/benzene (PAH-Mix 25, fornitore: Dr. Ehrenstorfer)
- Soluzione standard di IPA deuterati 1000 ng/ μ L, contenente lo standard interno costituito da 5 IPA completamente deuterati (naftalene, acenaftene, fenantrene, crisene e perilene), disciolti in toluene (PAH-Mix 31 *deuterated*, fornitore: Dr. Ehrenstorfer).

Per preparare le soluzioni standard si è adoperata una micropipetta tarata con cui si sono prelevati quantitativi di volume idoneo del solvente scelto e di soluzione madre. Le soluzioni così ottenute sono agitate mediante Vortex e conservate in frigo. I puntali delle micropipette, sia per il prelievo di solvente sia per quello di soluzione madre, sono normalizzati due volte con la soluzione da prelevare, evitando il fenomeno di gocciolamento dal puntale.

Solventi:

- Glicerolo (o glicerina): $(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})_3$, a grado di purezza farmaceutica, fornito dal Dipartimento di Farmacia dell’Università degli Studi di Genova
- Etanolo, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, “EtOH”, 96% volume (grado di purezza cromatografica, fornito da VWR *Chemicals*)
- Acetone, CH_3COCH_3 (grado di purezza cromatografica, fornito da VWR *Chemicals*)
- n-Esano, C_6H_{14} (grado di purezza cromatografica, fornito da VWR *Chemicals*)
- Acqua ultrapura, H_2O (purificata sfruttando un sistema Milli-Q ®Direct 8 ‘mQ’ Millipore; Watford, UK)

La strumentazione utilizzata comprende:

- Vortex *M. Zipperer*
- Centrifuga *Hermile Z 300*
- Agitatore meccanico *Stuart Rotatordrive STR4*
- Bilancia analitica *Sartorius* (sensibilità $\pm 0,1$ mg)
- Micropipette (p5000, p1000, p250, p100, p20) e puntali in polipropilene (PP)
- Vetreria (principalmente *vials* di vario diametro, beaker)

- Gascromatografo *Agilent 7890A* accoppiato a spettrometro di massa con analizzatore quadrupolare *Agilent 5975C MSD (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)*

Il gascromatografo è corredato di autocampionatore *Gerstel MPS MultiPurpose Sampler* e ospita al suo interno una colonna capillare *Rxi®-5Sil MS*, prodotta da Restek

- Fibra in polidimetilsilossano (PDMS, 100 µm) per microestrazione in fase solida (SPME)
- Programma “*GC/MSD MassHunter Acquisition Software*” per poter eseguire le analisi al gascromatografo e registrare i cromatogrammi
- Programma “*MassHunter MSD Data Analysis*” per eseguire analisi di tipo qualitativo e quantitativo
- Software “*CAT (Chemometric Agile Tool)*” per analisi chemiometriche e di *experimental design* [28]

5.1.1 Campioni e siti di campionamento

5.1.1.1 Analisi degli estratti di *Tilia tomentosa*

Come già evidenziato, nella prima parte di questo lavoro di tesi sono stati analizzati nuovamente gli estratti di *Tilia tomentosa*, preparati per un precedente lavoro di ricerca. I campioni di gemme di tiglio prelevate in zone a diverso impatto antropico, infatti, erano state fornite dal Dipartimento di Agraria dell’Università degli Studi di Torino al Dipartimento di Farmacia dell’Università di Genova; i colleghi farmacisti hanno preparato gli estratti vegetali trattando le gemme stesse con il solvente estrattivo glicerina:etanolo 50:50 w/w. In questo lavoro di tesi sono stati analizzati:

- Estratti di gemme di *Tilia tomentosa* raccolte ad aprile 2021, ottenuti con metodo di estrazione ad ultrasuoni
- Estratti di gemme di *Tilia tomentosa* del 2019, ottenuti mediante macerazione tradizionale
- Estratti di gemme di *Tilia tomentosa* del 2019, ottenuti tramite la tecnica di estrazione ad ultrasuoni

Gli estratti che ci sono stati forniti erano relativi a zone definite a basso, a medio e ad elevato inquinamento, per un totale di nove campioni (tre per tipo di estratto), mostrati in Figura 24. Sono stati conservati in frigo a +4 °C, avvolti in carta stagnola.

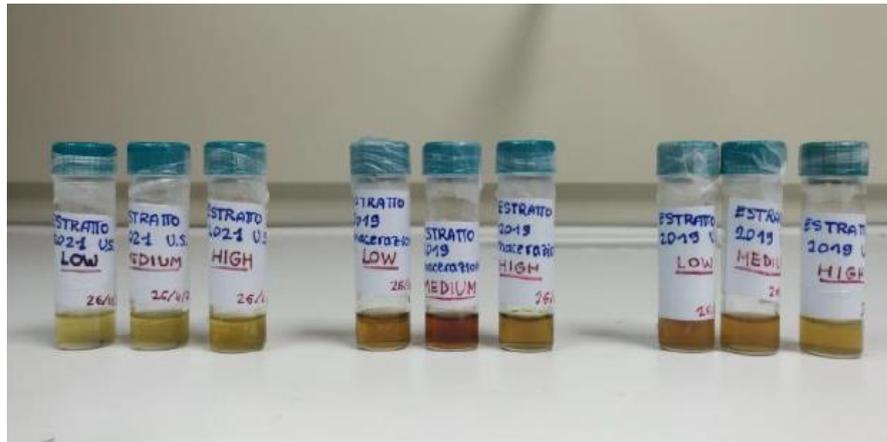


Figura 24: Estratti di gemme di Tilia tomentosa

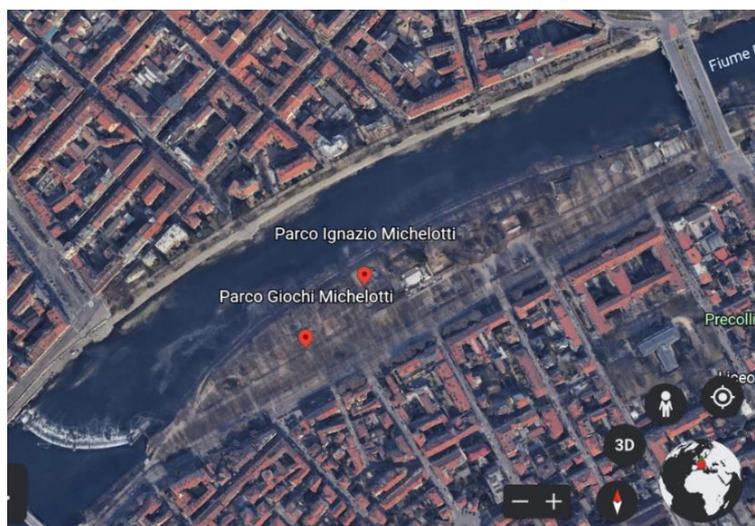
Le zone dell'area torinese, in Figura 25, sono:

- 1) A basso inquinamento: area antistante alla Basilica di Superga (posta su una collina torinese) [29]
- 2) A medio inquinamento: parco Ignazio Michelotti (un parco cittadino)
- 3) Ad alto inquinamento: corso Massimo d'Azeglio (viale ad alto scorrimento veicolare)

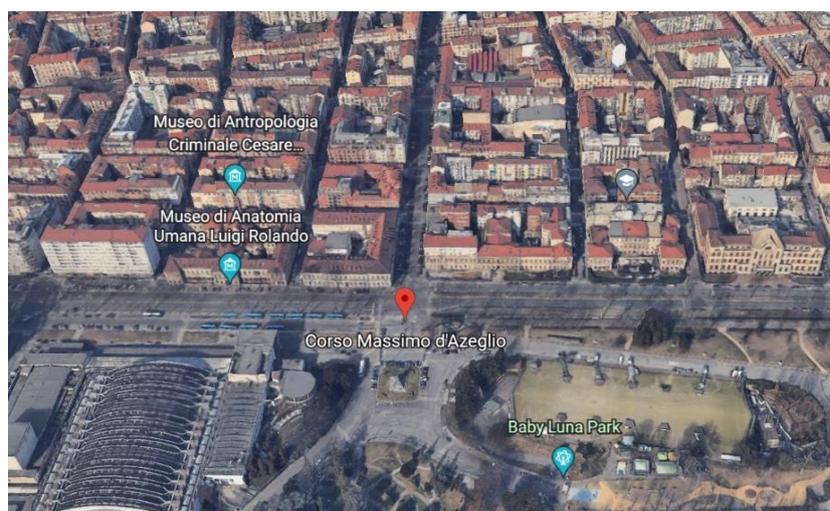
Figura 25: Zone di campionamento nell'area di Torino



- 1) *Basso inquinamento: area antistante alla Basilica di Superga [29]*



2) *Medio inquinamento: parco Ignazio Michelotti*



3) *Alto inquinamento: corso Massimo d'Azeglio*

5.1.1.2 HS-SPME

Nella seconda parte del lavoro di tesi, invece, è stato messo a punto un metodo che impiega la microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME) per la determinazione di IPA in matrici vegetali. Avendo la necessità di ottimizzare le condizioni di estrazione e avendo a disposizione un quantitativo estremamente ridotto di gemme provenienti dalle aree urbane torinesi studiate, si è scelto di adoperare una matrice vegetale simile, prelevata da zone genovesi esposte a traffico veicolare. In particolare, sono state campionate porzioni vegetali di Rosa canina, Enula bacicci e Passiflora ed è stato effettuato un “bianco”, ovvero un’analisi realizzata sul campione vegetale per verificarne il contenuto.

I campioni sono ridotti in piccole porzioni e omogeneizzati utilizzando un mixer, al fine di ottenere un’unica miscela vegetale, impiegata come matrice di base per effettuare tutte le prove di ottimizzazione per lo sviluppo del metodo analitico. Per le prove di ottimizzazione, è stato

necessario ogni volta aggiungere alla miscela vegetale un quantitativo noto (“*spike*”) della soluzione contenente una miscela di IPA a diverse concentrazioni.

5.1.2 Standard interni

Prima di iniziare a processare i campioni, nella matrice viene inserito un quantitativo noto di uno standard interno procedurale, rappresentato da una miscela di cinque IPA completamente deuterati. Questa aggiunta è necessaria per poter applicare il metodo di calibrazione dello standard interno, atto a quantificare in termini di concentrazione gli analiti presenti nei campioni. La sua presenza permette di monitorare tutto ciò che accade agli analiti, in quanto esso subisce gli stessi processi che interessano questi ultimi.

Gli IPA deuterati presenti nella soluzione utilizzata come standard interno e i rispettivi analiti monitorati dai singoli IPA-D sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3: IPA deuterati e rispettivi analiti monitorati

IPA deuterati	IPA monitorati
D-Naftalene	Naftalene (NAPH)
D-Acenaftene	Acenaftilene (ACY), Acenaftene (ACE)
D-Fenantrene	Fluorene (FLU), Fenantrene (PHE), Antracene (ANT)
D-Crisene	Fluorantene (FL), Pirene (PYR), Benzo[a]antracene (BaA), Crisene (CHR)
D-Perilene	Benzo[b]fluorantene (BbF), Benzo[k]fluorantene (BfF), Benzo[a]pirene (BaP), Indeno[1,2,3-c,d]pirene (IND), Benzo[g,h,i]perilene (BghiP), Dibenzo[a,h]antracene (DBA)

5.2 STRUMENTI E METODI

5.2.1 Chemiometria ed Experimental Design

Il termine chemiometria si riferisce a “qualsiasi procedura matematica o statistica utilizzata per analizzare dati chimici”, comprese le tecniche di analisi univariate e multivariate:

- Analisi univariata: è l'analisi statistica di una singola variabile, principalmente per ottenere informazioni preliminari sulla distribuzione dei dati. L'analisi di una variabile alla volta non è idonea a ricavare informazioni utili perché non si tiene conto delle interazioni che ci sono tra le variabili e quindi analizzandole singolarmente perderei questa informazione.
- Analisi multivariata: è l'analisi (statistica) a più di una variabile alla volta, tenendo conto delle possibili interazioni tra di esse, come spesso accade.

La chemiometria permette di ottenere informazioni di alta qualità e accurate nel più breve tempo possibile, migliora la conoscenza di processi già esistenti ed è economica [30].

L'impiego dell'*experimental design* è il campo di applicazione di interesse in questo lavoro di tesi, in particolar modo lo si è scelto per l'ottimizzazione della metodica strumentale di analisi.

Il disegno sperimentale (*Design Of Experiments*, DOE o *Experimental Design*, ED) è una metodologia multivariata, introdotta da Ronald Fisher nel 1935, che permette di:

- ottenere il maggior numero di informazioni con il minor numero di esperimenti
- capire la relazione tra le variabili e le caratteristiche di interesse del sistema
- predire il comportamento del sistema in condizioni non testate

L'obiettivo di un esperimento è quello di ottimizzare una “risposta” (parametro), per mezzo dell'individuazione di “fattori” che influiscono su essa (variabili). La scelta delle variabili è di fondamentale importanza e può essere basata inizialmente su nozioni teoriche o studi già presenti in letteratura; inoltre, esse possono essere modificate all'interno di un “dominio sperimentale”, cioè in intervalli specifici.

Attraverso una serie di esperimenti si ottiene un “modello” che descrive l'andamento della risposta in funzione dei fattori scelti. Questo potrà poi essere utilizzato per prevedere la risposta in un qualsiasi punto del dominio sperimentale con una precisione elevata e consentirà di identificare quali siano le condizioni ottimali in cui svolgere l'esperimento [31].

Le fasi che devono essere compiute quando si esegue un *experimental design* sono riportate nello schema della Figura 26.

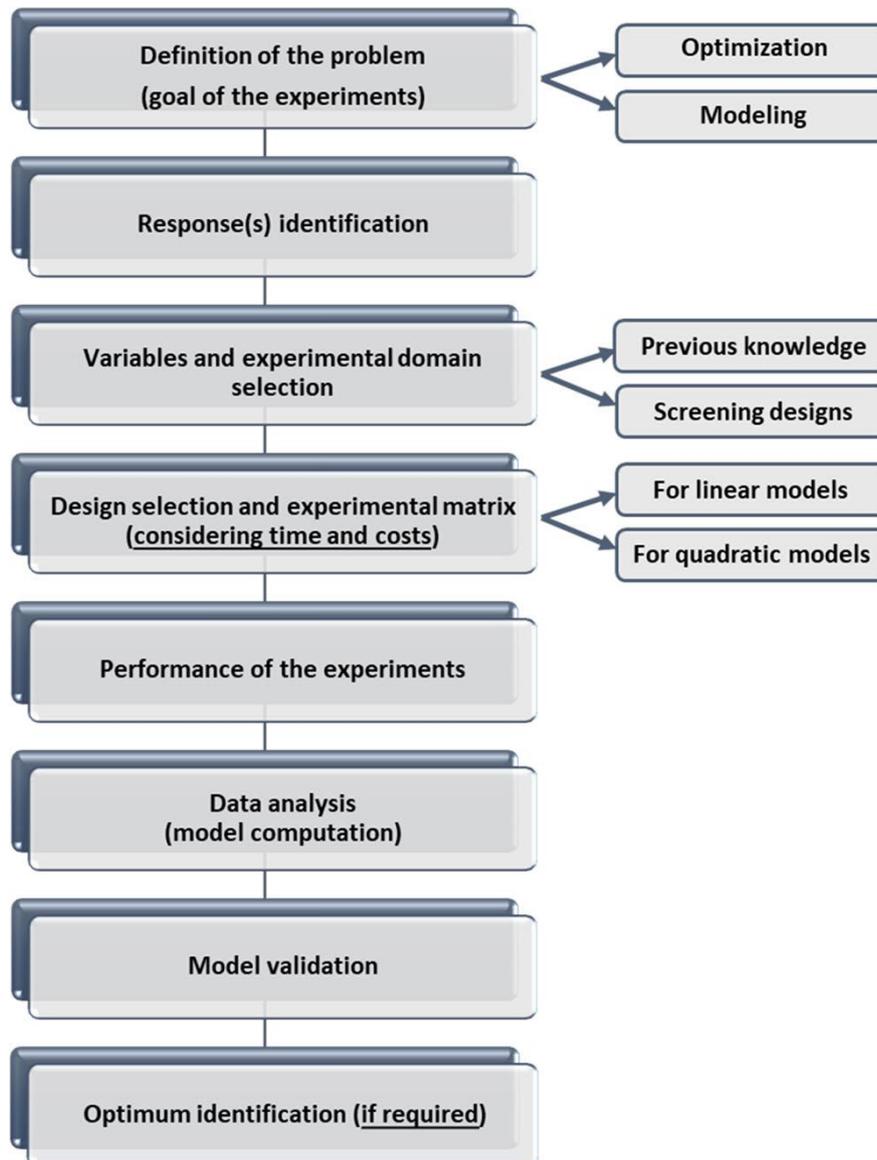


Figura 26: Diagramma di flusso che rappresenta i passaggi fondamentali da eseguire durante un *experimental design* [31]

Nel seguente progetto di tesi, si è sfruttato l'*experimental design* al fine di ottimizzare una procedura per l'analisi di IPA in campioni solidi tramite *Head-Space Solid Phase Microextraction* (HS-SPME), identificando quali fossero le variabili maggiormente influenti sulla risposta, ovvero il segnale strumentale dei vari IPA.

5.2.2 Analisi strumentale

Per tutte le analisi effettuate si è impiegato un gascromatografo *Agilent 7890A* accoppiato a spettrometro di massa con analizzatore quadrupolare *Agilent 5975C MSD*.

Sono stati applicati due differenti metodi, poiché in una prima parte del lavoro sono state effettuate delle analisi di verifica di campioni costituiti da estratti in glicerina/etanolo preparati in un precedente lavoro di tesi, mentre in una seconda parte ci si è focalizzati sull'analisi di campioni solidi mediante HS-SPME.

Seguono i valori di lavoro impostati per ciascuno dei due metodi.

5.2.2.1 Analisi degli estratti di *Tilia tomentosa*

- Condizioni sperimentali fissate per il gascromatografo *Agilent 7890A*:
 - Iniettore in modalità *splitless* posto a 250 °C
 - Volume di campione iniettato: 1 µL
 - Flusso di gas carrier (He): 1,2 mL/min
 - Procedura di lavaggio della siringa: acetone (3 cicli), normalizzazioni col campione (2 volte), iniezione del campione, acetone (3 cicli), esano (3 cicli)
 - Programma termico del forno:
 - 60 °C per 2 min
 - Rampa di 10 °C/min
 - 280 °C per 5 min
 - Rampa di 10 °C/min
 - 300 °C per 5 min
 - Totale corsa: 36 minuti (inizio acquisizione: dopo 4 minuti)

- Condizioni operative fissate per lo spettrometro di massa *Agilent 5975C MSD*:
 - Temperatura della transfer line (che collega il gas cromatografo allo spettrometro di massa): 280 °C
 - Temperatura sorgente ionica: 230 °C
 - Temperatura quadrupolo: 150 °C
 - Finestre temporali e range di masse per l'analisi in TIC/SIM:
 - Range di masse TIC: 50-400 m/z
 - Analisi SIM per campioni senza standard interno deuterato (m/z in Tabella 4)
 - Analisi SIM per campioni contenenti lo standard interno deuterato (m/z in Tabella 4)

IPA deuterato	IPA	m/z
D-naftalene (136)	naftalene	128
D-acenaftene (164)	acenaftilene	152
	acenaftene	154
D-fenantrene (188)	fluorene	166
	fenantrene	178
	antracene	178
D-crisene (240)	fluorantene	202
	pirene	202
	benzo[a]antracene	228
	crisene	228
D-perilene (264)	benzo[b]fluorantene	252
	benzo[k]fluorantene	252
	benzo[a]pirene	252
	indeno[1,2,3-c,d]pirene	276
	benzo[g,h,i]perilene	276
	dibenzo[a,h]antracene	278

5.2.2.2 HS-SPME

Le condizioni sperimentali fissate per il gascromatografo e lo spettrometro di massa sono le medesime impiegate per l'analisi dell'estratto liquido appena descritte.

Sono stati ottimizzati due metodi, che prevedono l'impiego di una fibra con rivestimento in polimetilsilossano (PDMS, spessore: 100 μm), che deve essere condizionata prima di essere impiegata in GC (Tabella 5, [32]).

Tabella 5: Raccomandazioni sulla temperatura e sul condizionamento per l'uso della GC e linee guida sul pH [32]

Stationary Phase	Film Thickness	pH	Maximum Temperature	Recommended Operating Temp.	Conditioning Temperature	Time (Hrs.)
PDMS	100 μm	2-10	280°C	200-280°C	250°C	0.5
	30 μm	2-11	280°C	200-280°C	250°C	0.5
	7 μm	2-11	340°C	220-320°C	320°C	1
PDMS/DVB	65 μm	2-11	270°C	200-270°C	250°C	0.5
Polyacrylate	85 μm	2-11	320°C	220-310°C	300°C	2
CAR/PDMS	75 μm	2-11	320°C	250-310°C	300°C	1-2
CW/DVB	65 μm	2-9	260°C	200-250°C	220°C	0.5
DVB/CAR/PDMS	50/30 μm	2-11	270°C	230-270°C	270°C	1

Nell'ottimizzazione delle variabili dell'HS-SPME, non è stato possibile individuare delle condizioni sperimentali adatte alla determinazione di tutti gli IPA. Infatti, le variabili ottimali individuate dall'experimental design sono diverse per gli IPA leggeri, ovvero quelli con massa fino a 178 Da, e quelli pesanti, con massa maggiore o uguale a 202 Da. Per effettuare analisi con l'HS-SPME che prevedano la massimizzazione della risposta strumentale, quindi, è necessario impostare condizioni diverse per la determinazione degli IPA leggeri e pesanti, in particolare:

IPA leggeri (massa fino a 178 Da)

- T esposizione = 70 °C
- t esposizione = 50 min
- t incubazione = 20 min
- t desorbimento = 3 min

IPA pesanti (massa pari o superiore a 202 Da)

- T esposizione = 100 °C
- t esposizione = 90 min
- t incubazione = 20 min
- t desorbimento = 3 min

Nel paragrafo “6.5 Ottimizzazione del metodo HS-SPME” sarà discussa la trattazione che ha condotto a definire queste come le “condizioni ottimali” per valutare la presenza di IPA leggeri e pesanti in un determinato campione.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 METODO DELLO STANDARD INTERNO

La valutazione della concentrazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici presente nei campioni di origine vegetale richiede la costruzione di una retta di calibrazione per ciascuno degli analiti.

In questo lavoro di tesi si è scelto di impiegare, come metodo di calibrazione, il metodo dello standard interno. Questo prevede l'aggiunta di una quantità costante di standard, denominato "standard interno", a bianco, campioni e soluzioni standard preparate per la retta di calibrazione.

La retta di calibrazione è costruita inserendo sulle ordinate il rapporto dei segnali degli analiti presenti nelle soluzioni rispetto a quello dello standard interno aggiunto e sulle ascisse la concentrazione dell'analita. Effettuare la costruzione di una retta è necessario perché, nel caso di campioni reali, la concentrazione dell'analita non è nota, ma è possibile ricavare i segnali degli analiti e dello standard interno, il cui rapporto viene interpolato nella retta per ottenere la concentrazione (Figura 27).

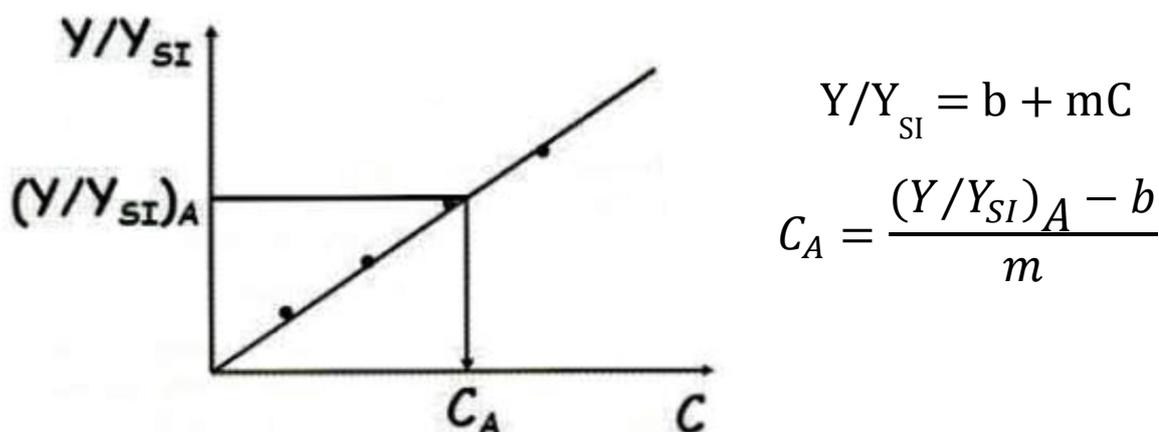


Figura 27: A sinistra: Grafico schematico dell'estrapolazione della concentrazione dell'analita in una retta di calibrazione costruita con il metodo dello standard interno. A destra: in alto, equazione della retta di calibrazione; in basso: formula per estrapolare la concentrazione dell'analita

Come anticipato nel paragrafo "5.1.2 Standard interni", gli standard interni scelti sono costituiti da cinque IPA completamente deuterati. La presenza dello standard interno permette di monitorare tutto ciò che accade agli analiti, in quanto esso, avendo analoghe caratteristiche chimico-fisiche, subisce le medesime interferenze. Gli IPA deuterati (d-IPA), inoltre, sono semplici da valutare poiché, avendo atomi di deuterio a sostituzione degli atomi di idrogeno, hanno masse differenti rispetto all'IPA non deuterato. In aggiunta, graficare un rapporto, quale segnale analita/ segnale

standard interno, aiuta a correggere alcuni errori statistici poiché l'analita e lo standard interno sono caratterizzati dai medesimi errori che si semplificano tra loro.

6.2 LIMITI DI RIVELABILITÀ NEGLI ESTRATTI DELLE GEMME

Il LOD (acronimo di *Limit of Detection*), o “limite di rivelabilità”, corrisponde alla minima concentrazione di analita che può essere rilevata in un campione in determinate condizioni sperimentali. È la concentrazione che corrisponde ad un rapporto Segnale/Rumore uguale a 3; pertanto, è stato calcolato come il valore di concentrazione corrispondente al segnale medio del fondo valutato su tre campioni, moltiplicato per 3. In questo modo, sono state valutate le aree relative ai LOD per ciascun analita e convertite nei valori di concentrazione effettuando un confronto con le aree di un picco di cui la concentrazione era conosciuta.

Il LOQ (acronimo di *Limit of Quantification*), o “limite di quantificazione”, è il valore minimo di concentrazione che è possibile quantificare con la metodica strumentale scelta, attraverso l'impiego della retta di calibrazione. È la concentrazione che corrisponde ad un rapporto Segnale/Rumore uguale a 10, perciò, è stato calcolato come il valore medio del fondo valutato su tre campioni, moltiplicato per 10. Si è proceduto alla valutazione delle aree e alla stima delle concentrazioni di ciascun IPA allo stesso modo del LOD.

Nella Tabella 6 sono mostrate le concentrazioni medie calcolate per LOD e LOQ in $\mu\text{g/L}$ di estratto per ciascun IPA.

Tabella 6: Concentrazioni medie calcolate per LOD e LOQ in $\mu\text{g/L}$ di estratto

NOME IPA	LOD ($\mu\text{g/L}$ di estratto)	LOQ ($\mu\text{g/L}$ di estratto)
Naftalene	0,48	1,59
Acenaffilene	0,43	1,44
Acenaftene	1,00	3,33
Fluorene	0,27	0,90
Fenantrene	0,20	0,67
Antracene	0,22	0,73
Fluorantene	0,23	0,77
Pirene	0,22	0,72
Benzo[a]antracene	0,81	2,70
Crisene	0,71	2,36
Benzo[b+k]fluorantene	0,64	2,12
Benzo[a]pirene	1,48	4,92
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	0,71	2,36
Dibenzo[a,h]antracene	0,43	1,43
Benzo[g,h,i]perilene	3,91	13,05

Dopo aver calcolato i valori delle concentrazioni relative a LOD e LOQ, si è proceduto ad un confronto rispetto a quelle trovate per i campioni e si è potuto stabilire se il quantitativo di IPA nei campioni in termini di concentrazione fosse non rilevabile (concentrazione superiore al LOD), rilevabile (concentrazione superiore al LOD, ma inferiore al LOQ) o quantificabile (concentrazione superiore al LOQ).

Per concordanza con i limiti di legge, si è deciso di convertire le unità di misura dei valori di concentrazione di LOD, LOQ in $\mu\text{g/Kg}$ di estratto, considerando la densità degli estratti calcolata in un lavoro di tesi precedente (1,0325 g/mL, pari a 1,0325 Kg/L). Inoltre, sulla base delle operazioni che sono state condotte per giungere all'estratto finale, è necessario tenere conto anche di un fattore di diluizione globale pari a 2.

Di seguito è riportata la Tabella 7 con i valori di LOD e LOQ espressi in $\mu\text{g/Kg}$ di estratto.

Tabella 7: Limiti di rivelabilità e quantificazione dei singoli IPA espressi nell'unità di misura impiegata dal Regolamento ($\mu\text{g/Kg}$ di estratto).

NOME IPA	LOD ($\mu\text{g/Kg}$ di estratto)	LOQ ($\mu\text{g/Kg}$ di estratto)
Naftalene	0,92	3,08
Acenaftilene	0,84	2,79
Acenaftene	1,93	6,44
Fluorene	0,52	1,73
Fenantrene	0,39	1,30
Antracene	0,43	1,42
Fluorantene	0,45	1,49
Pirene	0,42	1,40
Benzo[a]antracene	1,57	5,23
Crisene	1,37	4,58
Benzo[b+k]fluorantene	1,23	4,11
Benzo[a]pirene	2,86	9,54
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	1,37	4,57
Dibenzo[a,h]antracene	0,83	2,78
Benzo[g,h,i]perilene	7,58	25,27

6.3 RISULTATI OTTENUTI

I risultati del lavoro di tesi possono essere suddivisi in due parti, la prima relativa alla verifica del contenuto di IPA negli estratti ricavati dalle gemme di *Tilia tomentosa* e la seconda riguardante lo sviluppo del metodo HS-SPME GC-MS per l'analisi delle gemme.

6.4 ANALISI DEGLI ESTRATTI DELLE GEMME

6.4.1 Rette di calibrazione

La procedura prevede la preparazione di 5 soluzioni standard di IPA disciolte in acetone, rispettivamente a 1, 2, 4, 10, 50 $\mu\text{g/L}$, ad ognuna delle quali è stato aggiunto un quantitativo costante e noto di standard interno (SI), costituito dalla miscela dei 5 IPA deuterati, la cui concentrazione finale risultasse pari a 200 $\mu\text{g/L}$.

Tali soluzioni sono state analizzate per la costruzione delle rette di calibrazione di ciascun IPA ricercato (in totale 16). Nelle Figure 28 e 29 sono riportate le rette di calibrazione rispettivamente del naftalene e del fenantrene. Inoltre, si riportano in Tabella 8 i valori di R^2 (coefficiente di determinazione) che misurano la percentuale della variabilità di Y (variabile dipendente) spiegata dalla variabilità di X (variabile indipendente); nel dettaglio, più R^2 è vicino al valore 1, più soddisfa le condizioni di linearità.

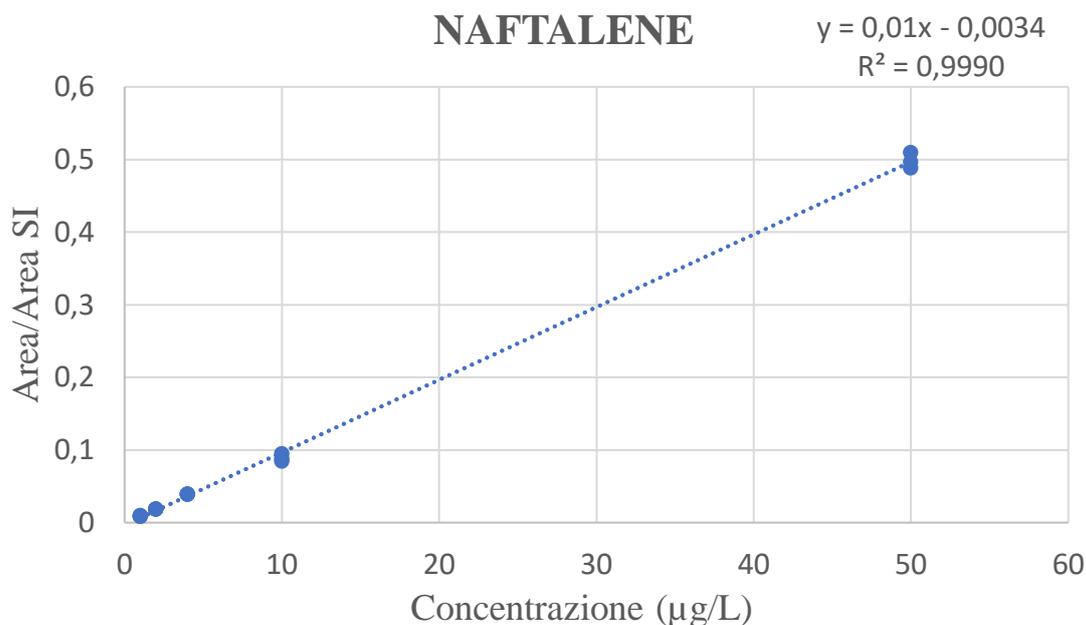


Figura 28: Retta di calibrazione del naftalene con annessi equazione della retta e R^2

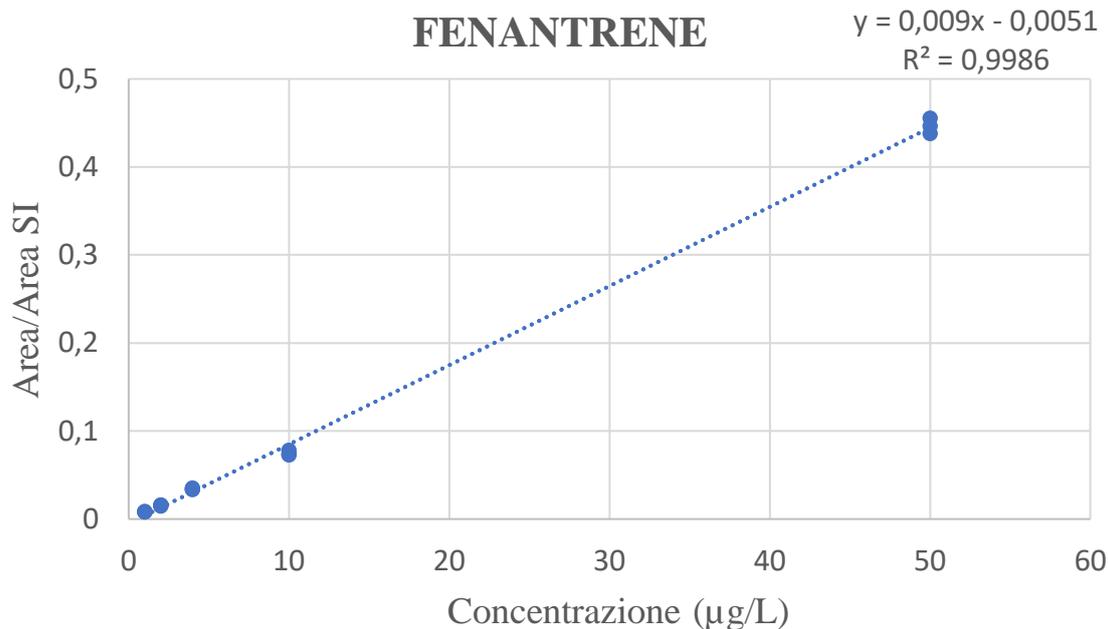


Figura 29: Retta di calibrazione del fenantrene con annessi equazione della retta e R^2

Tabella 8: Equazioni delle rette ottenute con il metodo dello standard interno e rispettivi valori di R^2 per ogni IPA

Nome IPA	Equazione della retta	R^2 della retta di calibrazione
Naftalene	$y = 0,01x - 0,0034$	0,9990
Acenaftilene	$y = 0,0114x - 0,0071$	0,9982
Acenaftene	$y = 0,0103x - 0,0065$	0,9969
Fluorene	$y = 0,0052x - 0,0045$	0,9956
Fenantrene	$y = 0,009x - 0,0051$	0,9986
Antracene	$y = 0,0065x - 0,0029$	0,9951
Fluorantene	$y = 0,0154x - 0,0204$	0,9984
Pirene	$y = 0,0165x - 0,0235$	0,9977
Benzo[a]antracene	$y = 0,0047x - 0,0085$	0,9898
Crisene	$y = 0,0142x - 0,0104$	0,9886
Benzo[b+k]fluorantene	$y = 0,0269x - 0,0362$	0,9947
Benzo[a]pirene	$y = 0,0098x - 0,0284$	0,9862
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	$y = 0,0076x - 0,0088$	0,9972
Dibenzo[a,h]antracene	$y = 0,008x - 0,0061$	0,9972
Benzo[g,h,i]perilene	$y = 0,0055x - 0,015$	0,9961

I picchi cromatografici relativi al benzo[b]fluorantene e al benzo[k]fluorantene sono praticamente coeluiti: per questo motivo i picchi di tali analiti sono sempre integrati insieme, estrapolando un'unica area, e i dati loro relativi vengono indicati con il nome “benzo[b+k]fluorantene”.

Si sono provate a costruire delle nuove rette di calibrazione restringendo ulteriormente il range di linearità a 4, 10, 15, 20 e 25 µg/L con il fine di migliorare il valore di R^2 per alcuni degli analiti (benzo[a]antracene, crisene, benzo[b+k]fluorantene, benzo[a]pirene), ma non è stato ottenuto un miglioramento degno di nota.

Dalle rette di calibrazione sono state calcolate le concentrazioni degli IPA presenti nei campioni. Infatti, dopo aver analizzato i campioni e le soluzioni standard, si sono potuti calcolare i valori del rapporto Area IPA/Area d-IPA e determinare le concentrazioni degli IPA in ciascun campione.

Come anticipato nella sezione “5.1.1.1 Analisi degli estratti di *Tilia tomentosa*”, i campioni analizzati in duplicato sono in totale 9 e sono costituiti da estratti ottenuti con metodi di estrazione differenti e provenienti da zone diverse: a basso (*low*), medio (*medium*) ed alto (*high*) inquinamento. In particolare, R1, R2 e R3 sono stati ottenuti con ultrasuoni nel 2021, R4, R5 e R6 con macerazione nel 2019 e R7, R8 e R9 nuovamente con ultrasuoni ma nel 2019.

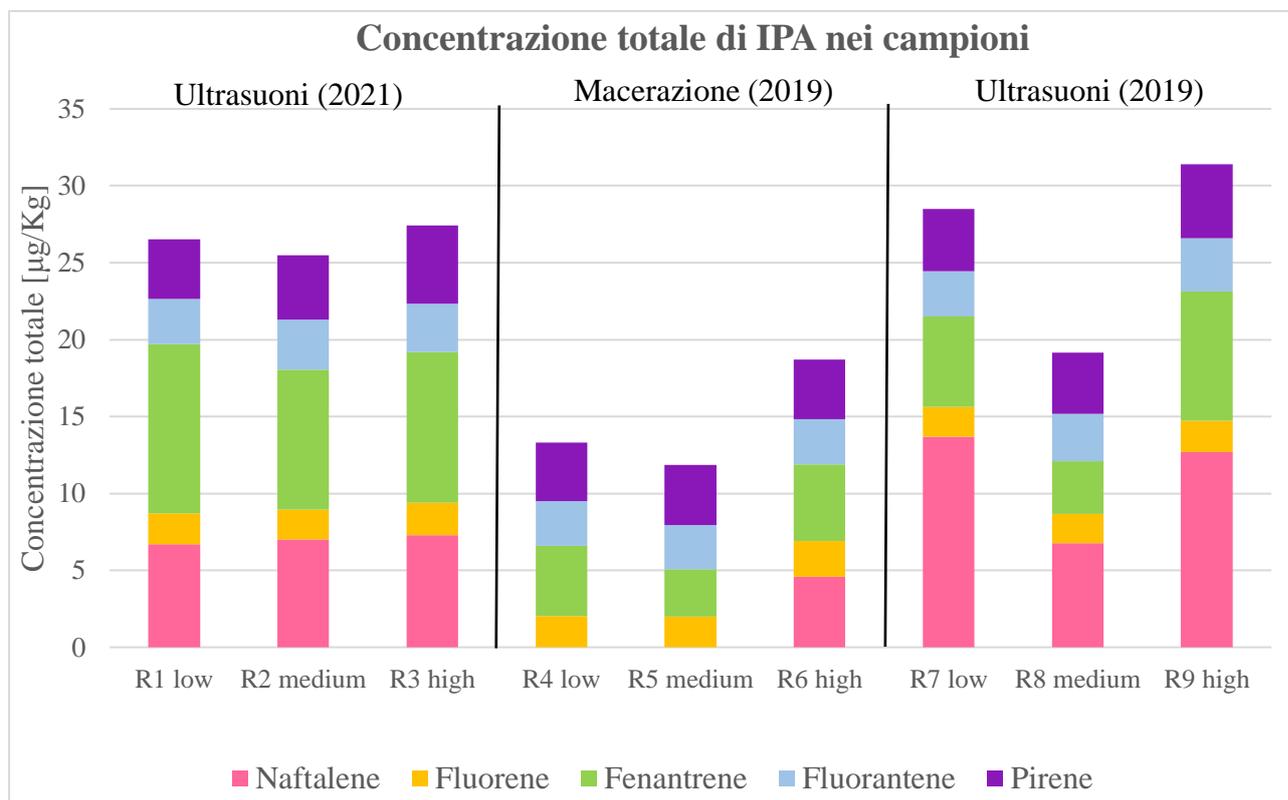
In Tabella 9, i valori sono riferiti alle concentrazioni medie di due repliche con le relative deviazioni standard, espressi in µg/Kg di estratto. I dati indicati con “< LOD” indicano analiti con una concentrazione inferiore al limite di rivelabilità almeno per una delle due repliche, invece, dati con “< LOQ” sono relativi a quegli analiti che hanno concentrazione inferiore al limite di quantificazione.

Tabella 9: Concentrazioni medie e le deviazioni standard strumentali in $\mu\text{g/Kg}$ di estratto ricavate dall'analisi dei campioni ottenuti con i tre metodi estrattivi

IPA	Estrazione con ultrasuoni 2021			Estrazione con macerazione 2019			Estrazione con ultrasuoni 2019		
	R1 Low conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R2 Medium conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R3 High conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R4 Low conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R5 Medium conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R6 High conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R7 Low conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R8 Medium conc [$\mu\text{g/Kg}$]	R9 High conc [$\mu\text{g/Kg}$]
NAPH	$6,7 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,1$	< LOQ	< LOQ	$4,60 \pm 0,07$	$13,7 \pm 0,2$	$6,77 \pm 0,04$	$12,7 \pm 0,2$
ACY	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
ACE	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
FLU	$1,99 \pm 0,04$	$1,95 \pm 0,03$	$2,09 \pm 0,01$	$2,02 \pm 0,01$	$1,99 \pm 0,03$	$2,30 \pm 0,01$	$1,91 \pm 0,05$	$1,89 \pm 0,03$	$2,01 \pm 0,01$
PHE	$11,0 \pm 0,1$	$9,1 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,1$	$4,56 \pm 0,07$	$3,07 \pm 0,02$	$5,0 \pm 0,1$	$5,89 \pm 0,01$	$3,42 \pm 0,01$	$8,42 \pm 0,00$
ANT	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
FL	$2,95 \pm 0,02$	$3,25 \pm 0,01$	$3,16 \pm 0,09$	$2,91 \pm 0,02$	$2,87 \pm 0,03$	$2,92 \pm 0,01$	$2,95 \pm 0,01$	$3,09 \pm 0,01$	$3,46 \pm 0,01$
PYR	$3,87 \pm 0,05$	$4,17 \pm 0,01$	$5,08 \pm 0,01$	$3,81 \pm 0,05$	$3,92 \pm 0,07$	$3,89 \pm 0,01$	$4,04 \pm 0,02$	$4,00 \pm 0,01$	$4,81 \pm 0,02$
BaA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
CHR	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
B[b+k]F	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BaP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
IND	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BghiP	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
DBA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Si è scelto di rappresentare, in Figura 30, un grafico con le concentrazioni totali dei IPA per tutti i campioni e le zone analizzate. Le linee nere verticali separano i tre diversi metodi di estrazione con cui sono stati ottenuti gli estratti.

Figura 30: Concentrazione di IPA nei diversi campioni, espressa in $\mu\text{g}/\text{Kg}$



Nessuno degli IPA quantificati sembrerebbe presentare un aumento della concentrazione direttamente proporzionale all'aumento di inquinamento delle zone, ad eccezione di un lieve incremento del pirene per quanto concerne le prove R2, R2, R3.

Gli IPA a cui viene applicato il limite di legge (benzo[a]antracene, crisene, benzo[b]fluorantene e benzo[a]pirene) presentano una concentrazione non rivelabile, come nel caso del benzo[b+k] fluorantene in R1, o non quantificabile.

Tra tutti gli analiti, i valori di concentrazione maggiori sono presenti per due sostanze a più bassa massa molecolare, in particolare il naftalene nei campioni R7 ed R9, con valori pari a 13,7 e 12,7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ di estratto, rispettivamente, e per il fenantrene nel campione R1. Tra tutti gli IPA, tuttavia, il naftalene risulta il meno tossico, mentre il fenantrene è presente nella "candidate list" dell'ECHA (*European CHEmical Agency*, agenzia europea delle sostanze chimiche), ovvero in una lista di sostanze estremamente preoccupanti (SVHC, *Substances of Very High Concern*, sostanze estremamente preoccupanti), che, in futuro, potrebbero essere inserite nell'elenco delle sostanze soggette ad autorizzazione.

Tra gli IPA con massa molecolare più elevata, nessuno è stato ritrovato in concentrazioni apprezzabili negli estratti provenienti da zone a basso, medio ed elevato inquinamento. L'indeno [1,2,3-c,d] pirene è l'unico ad essere stato rivelato in alcune zone ma in concentrazioni inferiori al limite di quantificazione.

Confrontando i risultati ottenuti per la macerazione e l'estrazione assistita da ultrasuoni dei campioni di gemme del 2019, si può osservare che il contenuto di IPA negli estratti ottenuti per ultrasuoni è più elevato di quello negli estratti ottenuti per macerazione. Questo risultato non sorprende, poiché la tecnica della macerazione è più blanda e quindi meno efficiente per l'estrazione di eventuali IPA presenti nella matrice vegetale. .

Confrontando invece i risultati dei campioni di gemme raccolte nello stesso periodo di anni diversi ed estratte con gli ultrasuoni, si possono osservare livelli di concentrazioni generalmente paragonabili, ad esclusione del campione R8, proveniente dalla zona a medio inquinamento, che presenta un contenuto di IPA totale maggiore per i campioni del 2019, dovuto principalmente alla concentrazione maggiore di fenantrene.

6.4.2 Valutazione della precisione del metodo

I parametri di performance del metodo impiegato sono stati stimati mediante la valutazione della precisione della procedura sia *intraday* (nella stessa giornata) che *interday* (in 3 giorni diversi).

La precisione è la vicinanza dei risultati delle misurazioni replicate sullo stesso "misurando" (es. campione). Dipende da errori casuali e può quindi essere descritta utilizzando statistiche di errore casuale (distribuzione normale, leggi di propagazione dell'errore, ecc).

La precisione può essere ulteriormente differenziata in:

- ripetibilità: ottenuta dallo stesso operatore, utilizzando lo stesso strumento ed entro un periodo di tempo limitato. Nel lavoro di tesi ci si è focalizzati sulla sua verifica.
- riproducibilità: ottenuta da operatori diversi, utilizzando strumenti diversi ed entro un periodo di tempo esteso [30]

La precisione viene espressa come RSD (*Relative Standard Deviation*) % (Equazione 4):

$$\text{RSD}\% = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

Equazione 4

dove: \bar{x} e σ sono rispettivamente la media e la deviazione standard del rapporto $\frac{\text{Area IPA}}{\text{Area d-IPA}}$

In particolare, sono stati calcolati gli RSD% *intraday* tra 6 repliche alle concentrazioni di 4 µg/L e 50 µg/L delle soluzioni standard, riportati in Tabella 10.

Tabella 10: Analiti nei range di RSD % intraday per le due concentrazioni (4 e 50 µg/L)

Concentrazioni	RSD % range intraday	
	0,00 - 3,00 %	3,01 - 6,05 %
4 µg/L	Naftalene, Acenaftilene, Acenaftene, Fluorene, Fluorantene, Pirene	Fenantrene, Antracene, Benzo[a]antracene, Crisene, Benzo[b+k]fluorantene, Benzo[a]pirene, Indeno[1,2,3-c,d]pirene, Dibenzo[a,h]antracene, Benzo[g,h,i]perilene
50 µg/L	Naftalene, Acenaftilene, Acenaftene, Fluorene, Fluorantene, Fenantrene, Antracene, Pirene, Crisene	Benzo[a]antracene, Benzo[b+k]fluorantene, Benzo[a]pirene, Indeno[1,2,3-c,d]pirene, Benzo[g,h,i]perilene, Dibenzo[a,h]antracene

Per quanto riguarda gli RSD% *interday* sono stati valutati alle medesime concentrazioni, riportati in Tabella 11, ma riscontrando dei valori di RSD% mediamente più elevati.

Tabella 11: Analiti nei range di RSD % intraday per le due concentrazioni (4 e 50 µg/L)

Concentrazioni	RSD % range interday		
	0,00 - 3,00 %	3,01 – 7,00 %	7,01-25,00 %
4 µg/L	Naftalene, Acenaftene, Fluorene	Acenaftilene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Crisene, Benzo[b+k]fluorantene	Benzo[a]antracene, Benzo[a]pirene, Indeno[1,2,3-c,d]pirene, Benzo[g,h,i]perilene
50 µg/L	Naftalene, Acenaftilene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Crisene	Antracene, Fluorantene, Pirene, Benzo[b+k]fluorantene, Benzo[a]pirene	Benzo[a]antracene, Indeno[1,2,3-c,d]pirene, Benzo[g,h,i]perilene, Dibenzo[a,h]antracene

Gli RSD% *interday* risultano più elevati, soprattutto per i composti più pesanti, che sono meno adatti all'analisi gascromatografica e che mostrano un picco cromatografico meno efficiente e più slargato di quelli a più basso peso molecolare. Inoltre, la spettrometria di massa è notoriamente una tecnica strumentale poco precisa e che presenta una grande variabilità del segnale strumentale misurato in giorni diversi.

Pertanto, quando viene utilizzata una tecnica cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa, è opportuno costruire la retta di calibrazione ogni volta che si analizzano dei campioni, in modo da ottenere risultati più affidabili.

6.5 OTTIMIZZAZIONE DEL METODO HS-SPME

6.5.1 Scelta del modello

La relazione reale tra le variabili e la risposta è normalmente sconosciuta. Tuttavia, all'interno di un appropriato dominio sperimentale, la relazione matematica può essere approssimata da semplici funzioni polinomiali.

Non sempre i modelli lineari risultano l'ideale per esprimere la risposta in funzione delle variabili. I modelli non lineari più utilizzati, soprattutto nelle ottimizzazioni, sono quelli quadratici, ottenuti dall'indagine di almeno 3 livelli per ciascuna variabile, al fine di individuare la curvatura della superficie di risposta.

La funzione ottenuta dalla modellazione della risposta è la seguente (Equazione 5):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i < j}^k b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2$$

Equazione 5

dove:

- b_0 rappresenta termine costante
- b_i , b_{ij} e b_{ii} sono, rispettivamente, i coefficienti dei termini del primo ordine, delle interazioni e dei termini del secondo ordine
- x_i , x_j indicano le variabili

Per ottenere modelli quadratici è necessario calcolare più coefficienti e avere un certo numero di gradi di libertà per avere una valutazione statistica affidabile dei modelli. A partire da 3 fattori, l'identificazione grafica della risposta ottimale è difficile, perché la superficie di risposta (grafico 3D che rappresenta la risposta) può essere visualizzata solo mantenendo costanti 2 o più fattori [31].

6.5.1.1 Central Composite Design (CCD)

Il *Central Composite Design* è un disegno comunemente utilizzato nel modellare la superficie di risposta. Questo esplora i fattori a 5 livelli, codificati come $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$; ai punti di un disegno fattoriale sono aggiunti un gruppo di punti assiali chiamati “punti stella”, cioè esperimenti che includono uno dei fattori a livello $-\alpha$ o $+\alpha$ tramite i quali è possibile stimare i termini del primo e del secondo ordine [31], [33].

La matrice teorica per un CCD con 4 fattori, sfruttata nel primo ED condotto in questo lavoro di tesi, è riportata nella Tabella 12.

Tabella 12: Matrice teorica di un CCD con 4 fattori e $nc=3$

Nome Esperimento	Fattore 1	Fattore 2	Fattore 3	Fattore 4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	$-\alpha$	0	0	0
18	α	0	0	0
19	0	$-\alpha$	0	0
20	0	α	0	0
21	0	0	$-\alpha$	0
22	0	0	α	0
23	0	0	0	$-\alpha$
24	0	0	0	α
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

6.5.1.1.1 Experimental Design a 4 fattori

La matrice teorica degli esperimenti è mostrata in Tabella 12.

Pertanto, in questo primo *experimental design*, i parametri che sono stati fissati sono i seguenti:

- $m_{\text{campione}} = 0,1000 \text{ g}$
- $v_{\text{agitaz.}} = 300 \text{ rpm}$
- Spike (aggiunta di un quantitativo noto di una soluzione di IPA a $30 \mu\text{g/L}$) = 3 ng
- n_C : n° repliche punto centrale = 3
- $\alpha = 1$

Di seguito, in Tabella 13, sono illustrati i fattori considerati, quindi i parametri variabili, ed i livelli codificati indagati; per ogni fattore sono indicati i livelli “di lavoro”.

Tabella 13: Fattori scelti con i rispettivi valori minimi e massimi

Nomi Fattori	Fattori	Livelli codificati	Valori Livelli
X ₁	T _{esposizione} = T _{incubazione} [°C]	-1	40
		0	55
		1	70
X ₂	t _{incubazione} [min]	-1	20
		0	35
		1	50
X ₃	t _{esposizione fibra} [min]	-1	20
		0	35
		1	50
X ₄	t _{desorbimento} [min]	-1	1
		0	3
		1	5

Quindi la matrice sperimentale è la seguente (Tabella 14):

Tabella 14: Matrice sperimentale di un CCD con 4 fattori e $n_c = 3$

Nome Esperimento	T_{esposizione} [°C]	t_{incubazione} [min]	t_{esposizione} [min]	t_{desorbimento} [min]
1	40	20	20	1
2	70	20	20	1
3	40	50	20	1
4	70	50	20	1
5	40	20	50	1
6	70	20	50	1
7	40	50	50	1
8	70	50	50	1
9	40	20	20	5
10	70	20	20	5
11	40	50	20	5
12	70	50	20	5
13	40	20	50	5
14	70	20	50	5
15	40	50	50	5
16	70	50	50	5
17	40	35	35	3
18	70	35	35	3
19	55	20	35	3
20	55	50	35	3
21	55	35	20	3
22	55	35	50	3
23	55	35	35	1
24	55	35	35	5
25	55	35	35	3
26	55	35	35	3
27	55	35	35	3

Per verificare la variabilità degli esperimenti, è necessario utilizzare delle repliche. Di conseguenza si è scelto di effettuare repliche degli esperimenti: 3, 9 e 14 (n° totale esperimenti = 30). Gli esperimenti non sono stati eseguiti in questo ordine, bensì randomizzati per evitare "effetti temporali".

Sono stati indagati 4 fattori tenendo conto anche delle varie interazioni tra essi; pertanto, la funzione teorica del modello è (Equazione 6):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2$$

Equazione 6

dove:

- b_0 : termine costante (tutti +1 come valore codificato nella matrice)
- b_1, b_2, b_3, b_4 : coefficienti dei termini del primo ordine
- $b_{12}, b_{23}, b_{24}, b_{14}, b_{34}$: coefficienti dei termini delle interazioni
- $b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{44}$: coefficienti dei termini del secondo ordine
- x_1, x_2, x_3, x_4 : variabili considerate (fattori)

È stato sfruttato il software chemiometrico “CAT” per elaborare i dati, poiché permette la computazione dei modelli tramite il caricamento della matrice degli esperimenti con le relative risposte di ogni esperimento.

CAT è stato in grado di restituire i modelli derivanti dai risultati dell'*experimental design*. In particolare, sono state effettuate due diverse valutazioni:

- A. complessiva mediante *Principal Component Analysis* (PCA): per individuare correlazioni e raggruppamenti per capire se si potesse fare un unico modello
- B. sui modelli relativi ai recuperi dei singoli IPA

A. Principal Component Analysis (PCA)

Il software chemiometrico CAT ha permesso di visualizzare la superficie complessiva delle risposte degli IPA. Queste informazioni si ottengono impiegando una tecnica di analisi statistica multivariata nota come PCA (*Principal Component Analysis*, analisi delle componenti principali). Questa tecnica, proposta per la prima volta nel 1901 da Karl Pearson e sviluppata poi da Harold Hotelling nel 1933, è esplorativa e viene usata per ridurre la dimensionalità, ovvero per ridurre il numero di variabili che descrivono un insieme di dati ad un numero inferiore di variabili chiamate “componenti principali”, mantenendo, però, massimo il quantitativo di informazioni ottenibili.

La PCA prevede lo sviluppo di una combinazione lineare delle variabili iniziali, che costituiscono le nuove variabili. Queste massimizzano la varianza e non sono correlate tra loro.

La ricerca di queste nuove variabili, le componenti principali (PC), si riduce alla soluzione di un problema di autovalori/autovettori. Ad ogni PC, infatti, è associata una quantità chiamata “autovalore”, una misura di quanta varianza nel set di dati originale è descritta da quella determinata componente. La “varianza spiegata” di ogni componente è generalmente espressa come percentuale della varianza totale e dipende da quanto sono correlate tra loro le variabili [34].

Per quanto riguarda le componenti principali:

- La prima PC (PC1) spiega la varianza massima nel set di dati, le PCs successive descrivono la parte massima della varianza rimanente
- Le PCs sono ortogonali l'una all'altra
- Possono essere estratte tante PCs quanti sono i più piccoli tra n (oggetti) o p (variabili) → n° più piccolo tra il n° degli oggetti e quello delle variabili

Con l'analisi PCA si possono ottenere diversi tipi di grafici:

- *loading plot*: evidenzia il “peso” che le variabili di partenza hanno sulle varie PCs e le correlazioni tra esse
- *score plot*: visualizza gli oggetti e le correlazioni tra essi
- *biplot*: sovrappone il loading e score plot in modo da evidenziare eventuali correlazioni tra variabili e oggetti [30]

Nel lavoro di tesi si sono valutate le prime due tipologie di grafici (Figura 31), dove le variabili rappresentano i recuperi degli IPA (risposte degli esperimenti), identificati dal nome dell'IPA relativo, mentre gli oggetti sono associati ai diversi esperimenti, indicati dal loro numero.

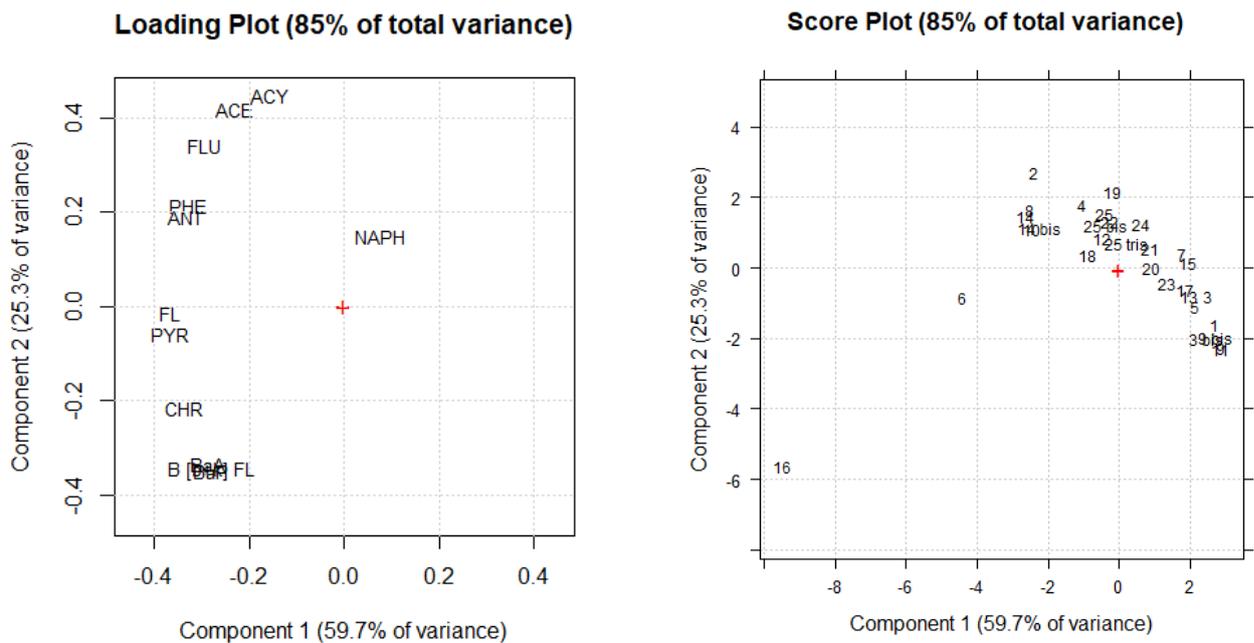


Figura 31: Loading e score plot, dove sono stati inclusi tutti gli analiti di cui è stato possibile valutare il recupero con il metodo

Dal *loading plot* è possibile osservare che i recuperi dei singoli IPA (risposte) risultino “incolonnati” lungo la componente 1 (PC1), che fornisce la maggior informazione perché esprime la maggiore varianza. Per quanto riguarda la componente 2 (PC2), essi risultano ampiamente distribuiti.

Nel dettaglio, osservando la distribuzione delle risposte, si nota che quelli più leggeri, fino a m/z pari a 178 (acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene e antracene), hanno uno *score* maggiore di 0 sulla componente (PC2), mentre gli altri analiti, quelli più pesanti (m/z maggiore o uguale a 202), lo hanno minore di 0. Un'ulteriore eccezione è rappresentata dal naftalene che si discosta da questo andamento e si trova in una zona “isolata” rispetto a tutti gli altri analiti, avendo uno *score* maggiore di 0 sulla PC1.

Tutti gli analiti “incolonnati”, pur avendo uno *score* diverso per quanto riguarda la componente 2, risultano abbastanza correlati siccome hanno un simile *score* sulla PC1, che è la componente che spiega circa il 60% della varianza. In aggiunta, i valori di recupero di: benzo[a]antracene, benzo[b+k]fluorantene e il benzo[a]pirene sono fortemente correlati, ovvero governati nello stesso modo dai medesimi fattori.

Dallo *score plot* è possibile notare come quasi tutti gli esperimenti si distribuiscano allo stesso modo sia lungo PC1 che lungo PC2. Si osserva che due esperimenti (n° 6 e 16) si discostano molto dalla maggioranza degli altri. Questi sono stati condotti nelle medesime condizioni di temperatura e tempo di esposizione della fibra, rispettivamente a 70 °C e 50 min, che corrispondono alle condizioni estreme del dominio sperimentale per quanto riguarda queste variabili. Inoltre, sono stati gli unici esperimenti in cui si sono distinte e valutate le aree degli IPA più pesanti (benzo[a]antracene, crisene, benzo[b+k]fluorantene e il benzo[a]pirene).

Poiché, come anticipato sopra, la PC1 spiegava poco più della metà della varianza totale (circa il 60%), si è deciso di considerare i singoli per comprendere meglio gli effetti delle variabili e i loro valori ottimali. In particolare, si sono valutate le superfici di risposta dei singoli IPA.

B. Modelli relativi ai recuperi dei singoli IPA

Attraverso l'utilizzo del software chemiometrico CAT sono stati determinati anche i modelli dei recuperi dei singoli IPA, attraverso i quali è stato possibile valutare la correlazione tra le variabili scelte e le risposte, come anche la loro significatività statistica. Il parametro designato come *explained variance* (o “varianza spiegata”) descrive proprio la bontà di queste correlazioni.

La varianza è una misura della dispersione dei valori, esprime quanto effettivamente questi valori siano vicini o lontani tra loro e quanto si discostino dalla media aritmetica. La “varianza spiegata” è generalmente espressa come percentuale della varianza totale e stima quanto esattamente il modello spieghi il risultato di un determinato esperimento. La “varianza residua” è, invece, la restante parte della varianza totale [30].

Tabella 15: Varianze spiegate dai singoli modelli relativi al recupero di ciascun IPA

IPA	VARIANZA SPIEGATA [%]
Naftalene	-11,7
Acenaftilene	63,06
Acenaftene	74,85
Fluorene	90,34
Fenantrene	96,21
Antracene	95,41
Fluorantene	77,71
Pirene	70,05
Benzo[a]antracene	17,81
Crisene	33,76
Benzo[b+k]fluorantene	12,21
Benzo[a]pirene	13,07

Nei modelli ottenuti dall'*experimental design*, varianze spiegate con valori maggiori del 70% indicano che il modello è adatto a descrivere l'andamento della risposta in base alle variabili scelte. Si può stabilire che il recupero del naftalene, avendo la varianza minore e addirittura negativa, non viene assolutamente spiegato da questo modello. Una valutazione simile può essere effettuata per gli IPA più pesanti (gli ultimi nella Tabella 15) che non vengono ben spiegati dal modello; infatti, esso ha difficoltà nell'esprimere una correlazione tra i fattori scelti e la risposta.

Il software chemiometrico fornisce un *data sheet* (estratto del foglio di dati) per ciascuna risposta, nel quale è possibile evidenziare diversi parametri, tra cui la percentuale di varianza spiegata e il valore di p-value che permette di comprendere se una variabile o un'interazione tra più variabili è significativa o meno.

I test di significatività sono ampiamente utilizzati nella scienza per valutare una data ipotesi statistica, chiamata “ipotesi nulla”, con una certa probabilità di errore (sia falso positivo che

negativo: accettare in maniera errata un'ipotesi). Definito l'intervallo di confidenza α a priori in base al problema, è possibile visualizzare graficamente il *p-value* (Figura 32):

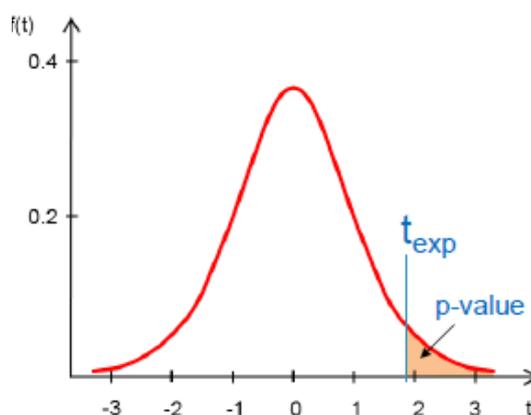


Figura 32: Distribuzione per il parametro *t* di Student [30]

Per stabilire se accettare o rifiutare l'ipotesi nulla possiamo calcolare il *p-value*. Nello specifico, il *p-value* deve essere confrontato con α e se:

- $p < \alpha$, allora si rifiuta l'ipotesi nulla;
- $p \geq \alpha$, allora non si rifiuta l'ipotesi nulla.

Il software chemiometrico lo utilizza per esprimere la significatività dei coefficienti del modello.

Si definisce:

- “statisticamente significativo” se $0,01 \leq p\text{-value} < 0,05$
- “molto significativo” se $0,01 \leq p\text{-value} < 0,01$
- “estremamente significativo” se $p\text{-value} < 0,001$

In generale, più è basso il *p-value*, maggiore è la probabilità che la differenza osservata non sia data dal caso [30].

Nelle Figure 33 e 34 è mostrato il modello, rispettivamente, per il naftalene e per il fenantrene.

Nei *data sheet* delle Figure 33 e 34, ogni riga rappresenta uno dei fattori precedentemente esposti o una combinazione di essi. In particolare, rispetto all'Equazione 6, nella Tabella 16 sono esplicitati i fattori e le loro interazioni.

Tabella 16: Fattori e interazioni esplicitati.

Variabili dell'Equazione	Variabili esplicitate
--------------------------	-----------------------

X1	T _{esp}
X2	t _{incub}
X3	t _{esp}
X4	t _{desorb}
X1X2	T _{esp} t _{incub}
X1X3	T _{esp} t _{esp}
X1X4	T _{esp} t _{desorb}
X2X3	t _{incub} t _{esp}
X2X4	t _{incub} t _{desorb}
X3X4	t _{esp} t _{desorb}
X1 ²	T _{esp} ²
X2 ²	t _{incub} ²
X3 ²	t _{esp} ²
X4 ²	t _{desorb} ²

	Coefficients	Std.dev.	Conf.Int.	p-value
b0	300413.37	106407.60	226802.4	0.0128
T. esp	-69610.48	64251.68	136949.2	0.2957
t. inc	53397.43	64251.68	136949.2	0.4190
t. esp	-16206.31	64251.68	136949.2	0.8043
t. des	-65866.20	64251.68	136949.2	0.3216
T. esp*t. inc	-52443.90	68566.81	146146.7	0.4562
T. esp*t. esp	-84718.16	68177.15	145316.2	0.2331
T. esp*t. des	42692.53	68566.81	146146.7	0.5429
t. inc*t. esp	118409.97	68566.81	146146.7	0.1047
t. inc*t. des	-44344.09	68177.15	145316.2	0.5253
t. esp*t. des	49880.15	68566.81	146146.7	0.4781
T. esp^2	-163859.21	180104.05	383882.7	0.3773
t. inc^2	144032.79	180104.05	383882.7	0.4364
t. esp^2	91190.29	180104.05	383882.7	0.6200
t. des^2	-44047.21	180104.05	383882.7	0.8101

Variance of Y
7.479e+10

Standard deviation of the residuals
289033

% Explained Variance
-11.7

Figura 33: Modello restituito per il naftalene

	Coefficients	Std.dev.	Conf.Int.	p-value
b0	228091.660	13823.129	29463.30	0.0000
T.esp	212604.550	8346.766	17790.71	0.0000
t.inc	-10441.681	8346.766	17790.71	0.2301
t.esp	43071.883	8346.766	17790.71	0.0001
t.des	-8723.652	8346.766	17790.71	0.3125
T.esp*t.inc	-11018.012	8907.332	18985.53	0.2351
T.esp*t.esp	20409.159	8856.712	18877.64	0.0359
T.esp*t.des	-4875.988	8907.332	18985.53	0.5921
t.inc*t.esp	10537.488	8907.332	18985.53	0.2552
t.inc*t.des	-2562.409	8856.712	18877.64	0.7763
t.esp*t.des	2633.512	8907.332	18985.53	0.7715
T.esp^2	53009.010	23396.839	49869.18	0.0387
t.inc^2	4409.010	23396.839	49869.18	0.8531
t.esp^2	22464.010	23396.839	49869.18	0.3522
t.des^2	-38524.990	23396.839	49869.18	0.1204

Variance of Y
3.723e+10

Standard deviation of the residuals
37547

% Explained Variance
96.21

Figura 34: Modello restituito per il fenantrene

Il software ha permesso di visualizzare alcuni dati sotto forma di grafico che risultano più facilmente interpretabili.

In particolare, per quanto riguarda i recuperi degli IPA, si visualizzano gli andamenti dei coefficienti e “la bontà del *fitting*” dei singoli modelli relativi agli esperimenti effettuati.

I grafici che descrivono i primi sono denominati “*Coefficients IPA_{i-esimo}*” e permettono di apprezzare i valori dei coefficienti, sotto forma di barre nell’istogramma, e i relativi intervalli di confidenza, espressi come barre d’errore. È possibile, anche nel grafico, apprezzare la loro significatività che è descritta da asterischi:

- * per esprimere una variabile significativa con una probabilità del 95% ($p\text{-value} < 0,05$)
- ** per esprimere una variabile significativa con una probabilità del 99% ($p\text{-value} < 0,01$)
- *** per esprimere una variabile significativa con una probabilità del 99,9% ($p\text{-value} < 0,001$)

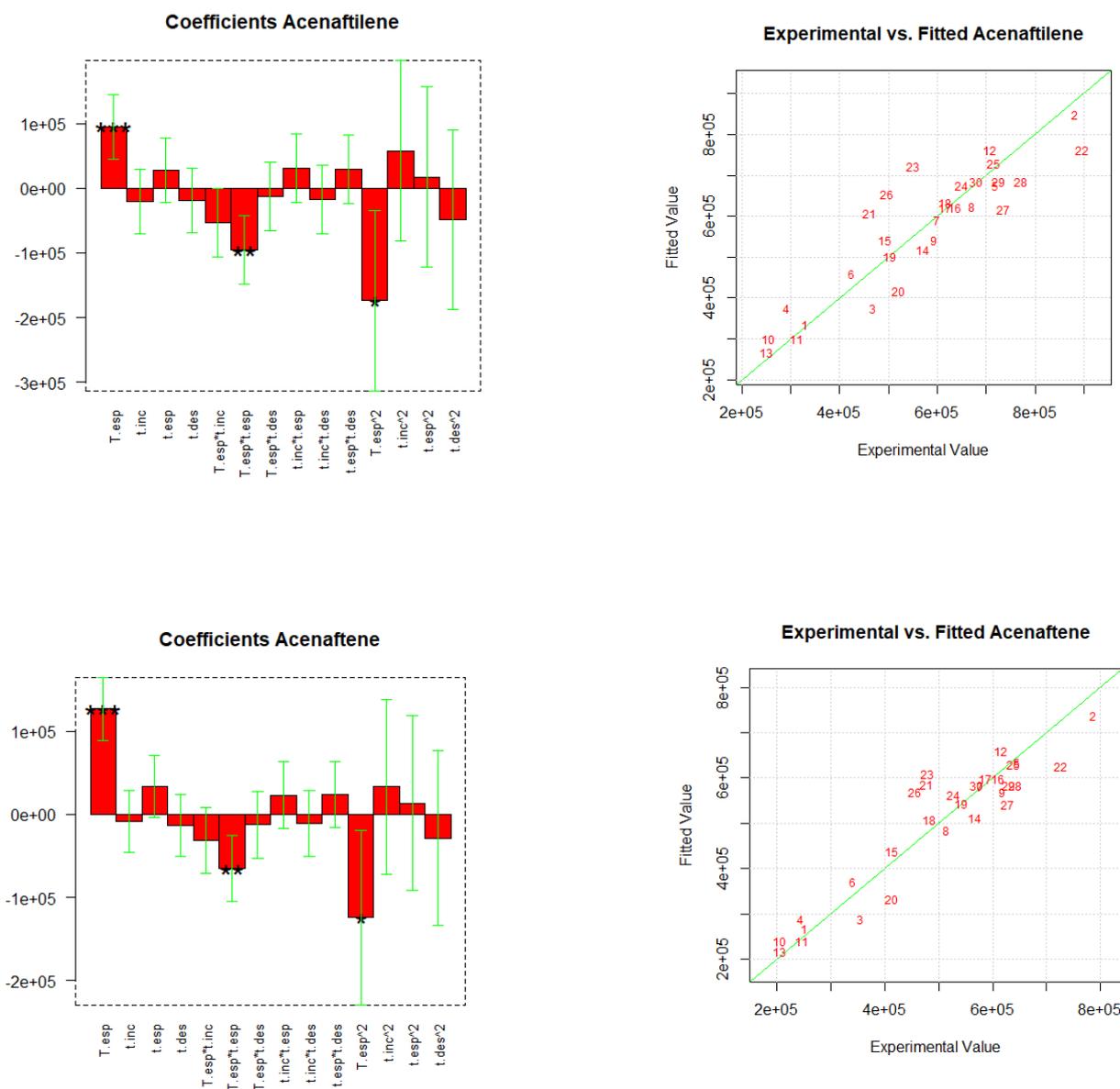
A seconda della posizione della barra nell’istogramma (porzione superiore o inferiore rispetto all’orizzontale posta a 0) è possibile determinare il segno dei coefficienti.

Poiché il fine è quello di massimizzare le risposte, ovvero il recupero degli IPA mediante l’HS-SPME, è possibile affermare che un determinato coefficiente impatta positivamente sulla risposta se è caratterizzato da asterischi e segno positivo e, quindi, andrebbe massimizzato; viceversa, se il coefficiente ha le stesse caratteristiche ma segno negativo, esso impatta in maniera negativa e perciò il suo contributo andrebbe minimizzato il più possibile.

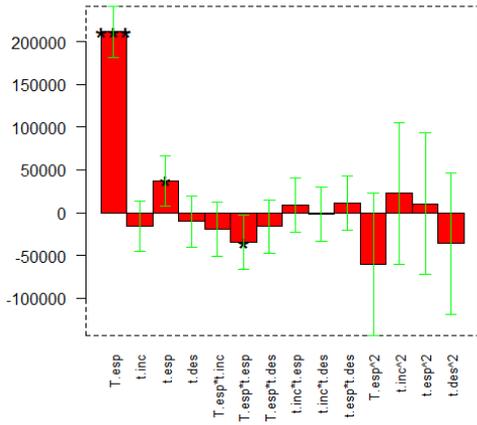
La seconda tipologia di grafici chiamata “*Experimental vs. Fitted IPA_{i-esimo}*” permette di visualizzare l’andamento dei dati sperimentali rispetto ai valori predetti dal modello per ogni singolo IPA.

In Figura 35 sono presentate le due tipologie di grafico per ogni IPA che si è riuscito a valutare con il modello.

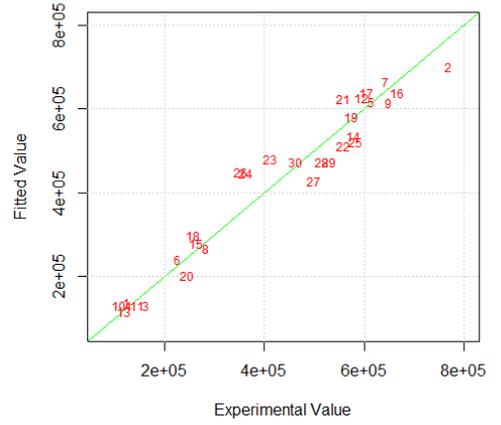
Figura 35: Coefficienti dei modelli e andamento dei dati teorici rispetto al modello predetto. Sono mostrati i grafici relativi ai recuperi di quegli analiti con almeno un coefficiente significativo.



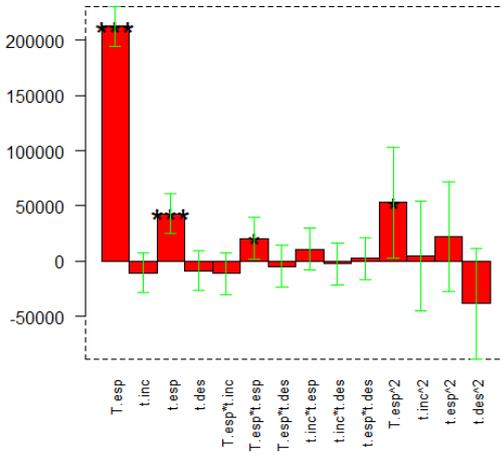
Coefficients Fluorene



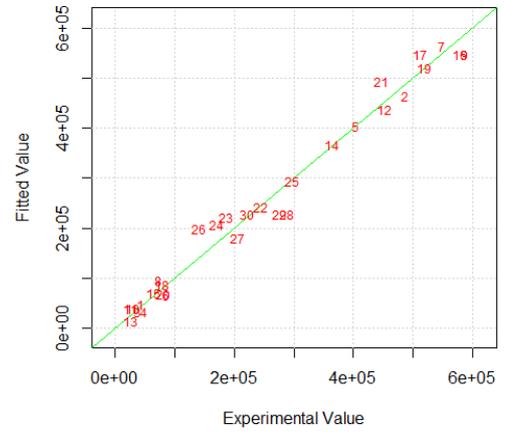
Experimental vs. Fitted Fluorene



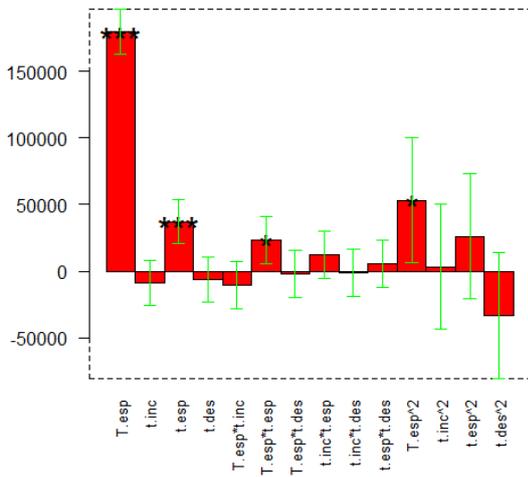
Coefficients Fenantrene



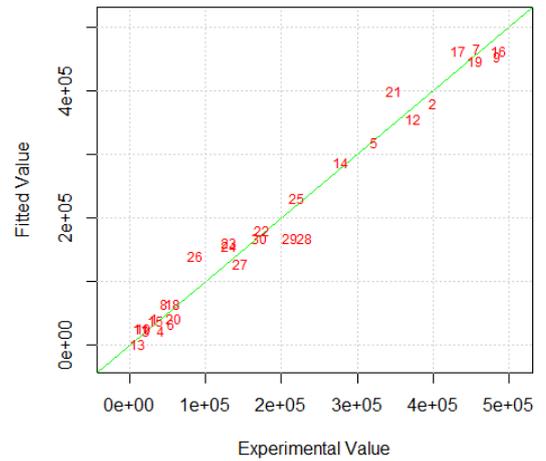
Experimental vs. Fitted Fenantrene



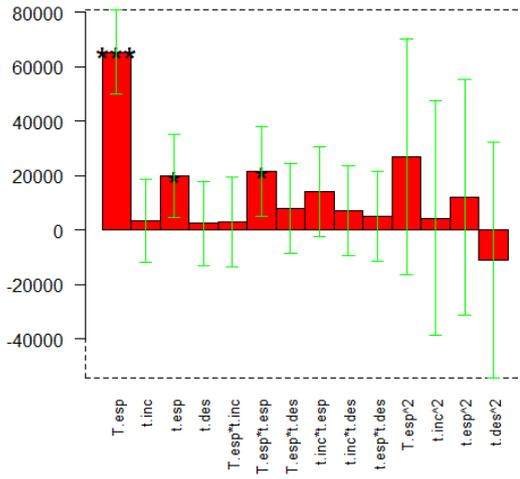
Coefficients Anthracene



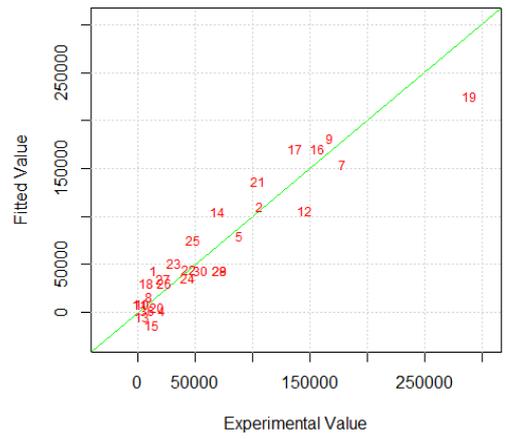
Experimental vs. Fitted Anthracene



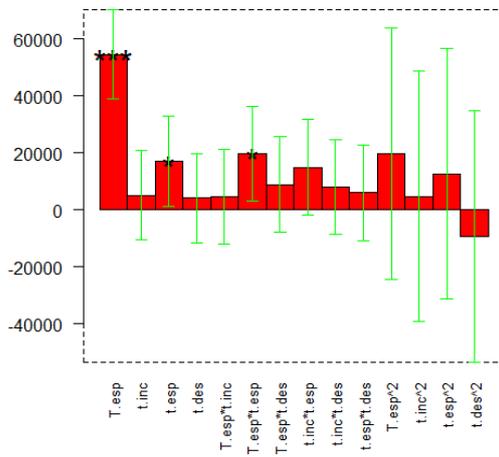
Coefficients Fluorantene



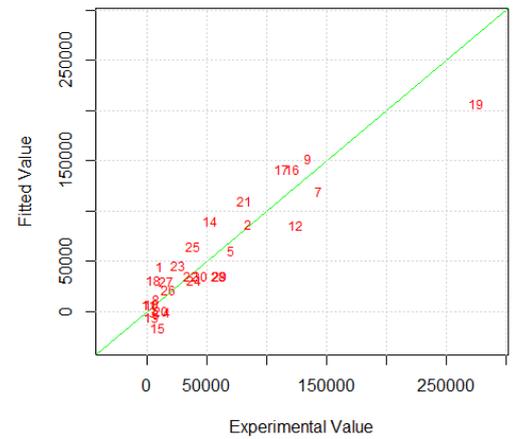
Experimental vs. Fitted Fluorantene



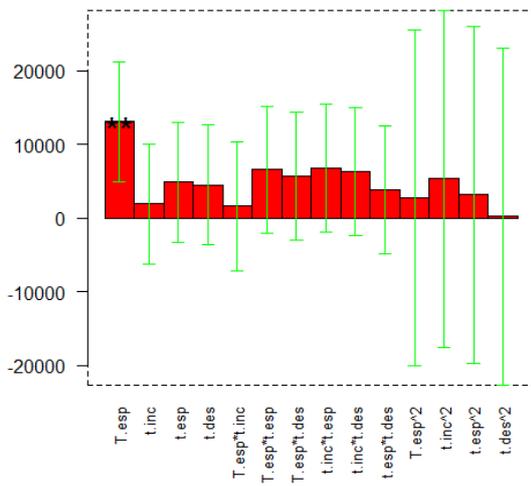
Coefficients Pirene



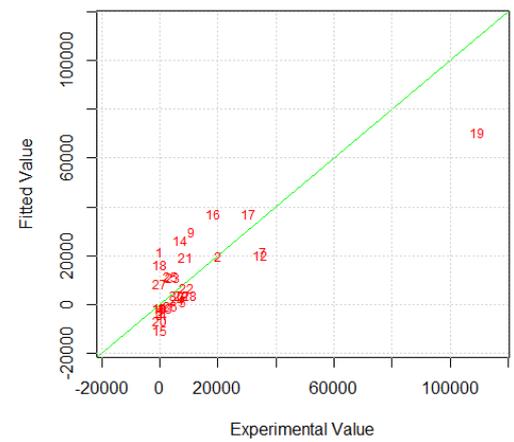
Experimental vs. Fitted Pirene



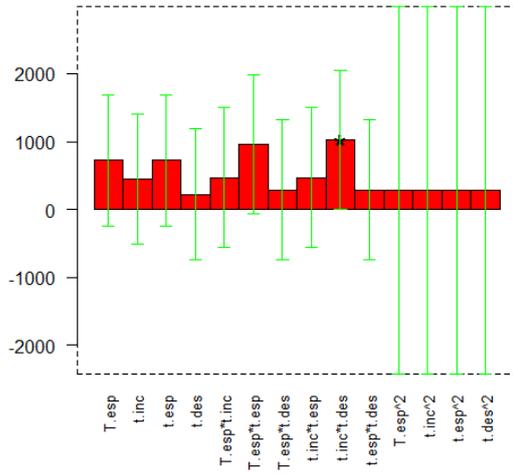
Coefficients Crisene



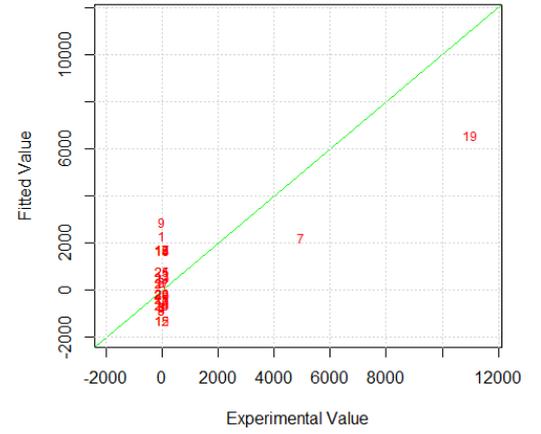
Experimental vs. Fitted Crisene



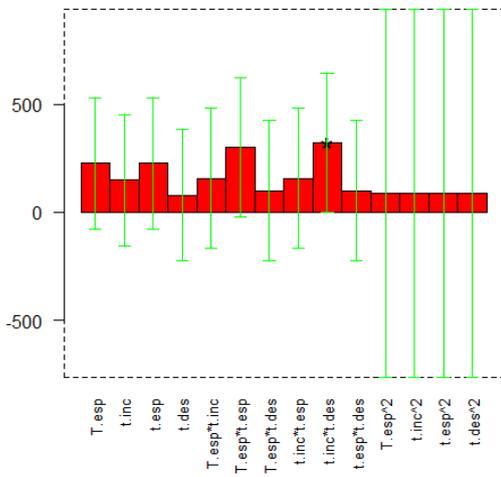
Coefficients Benzo [b+k] fluorantene



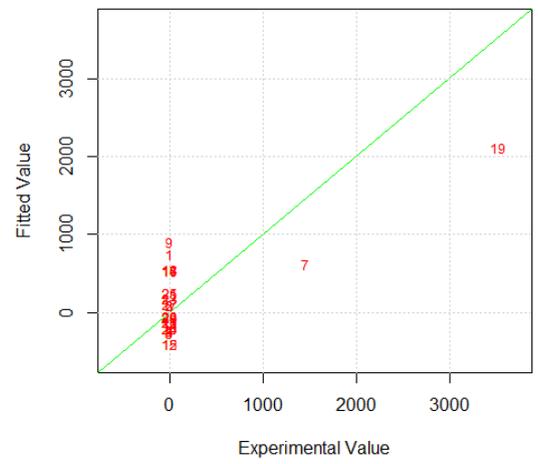
Experimental vs. Fitted Benzo [b+k] fluorantene



Coefficients Benzo [a] pirene



Experimental vs. Fitted Benzo [a] pirene



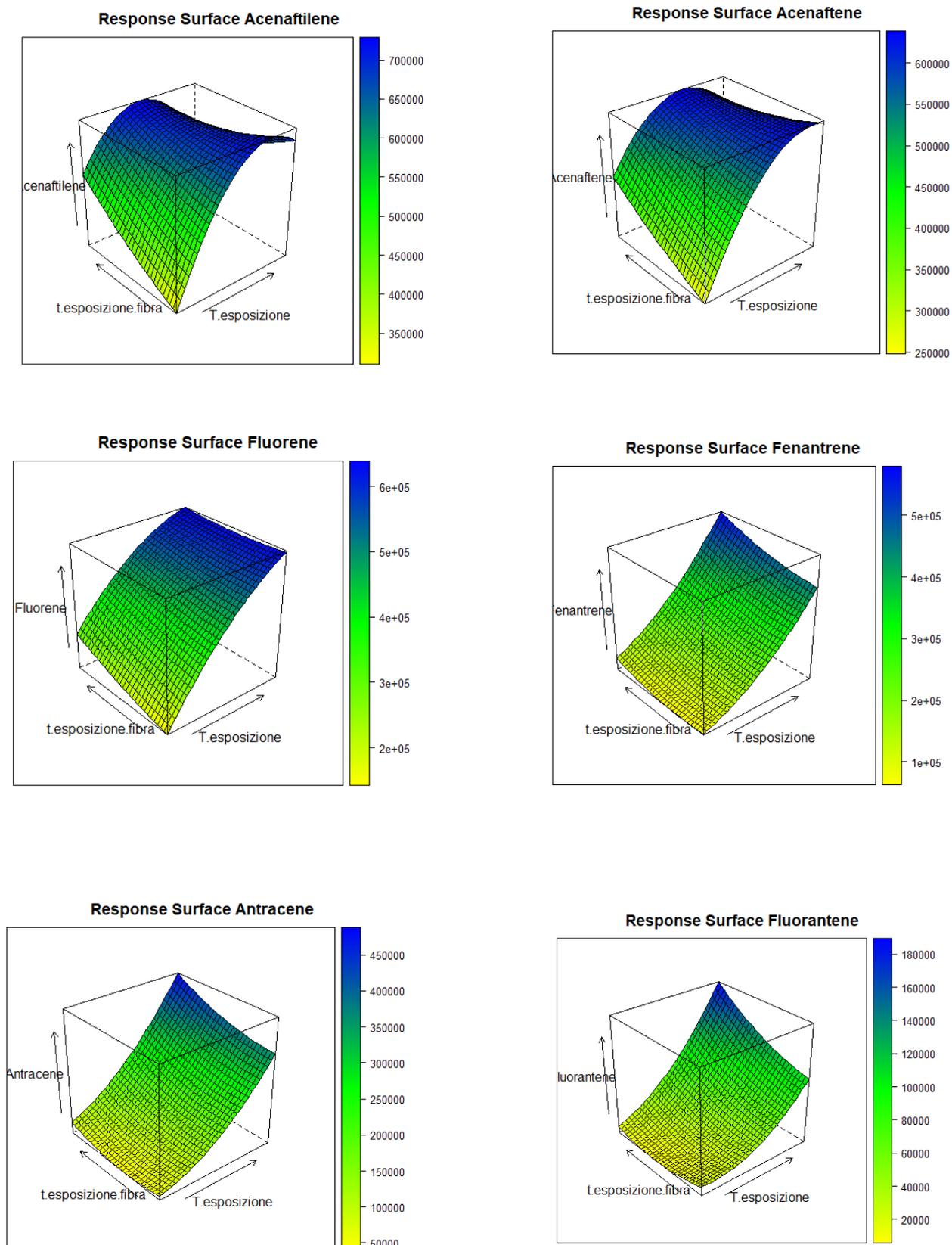
In Tabella 17 sono riportate le sole variabili che hanno mostrato una significatività sulla risposta dei diversi IPA, come anche il livello di probabilità associato (rappresentato dagli asterischi, descritti precedentemente).

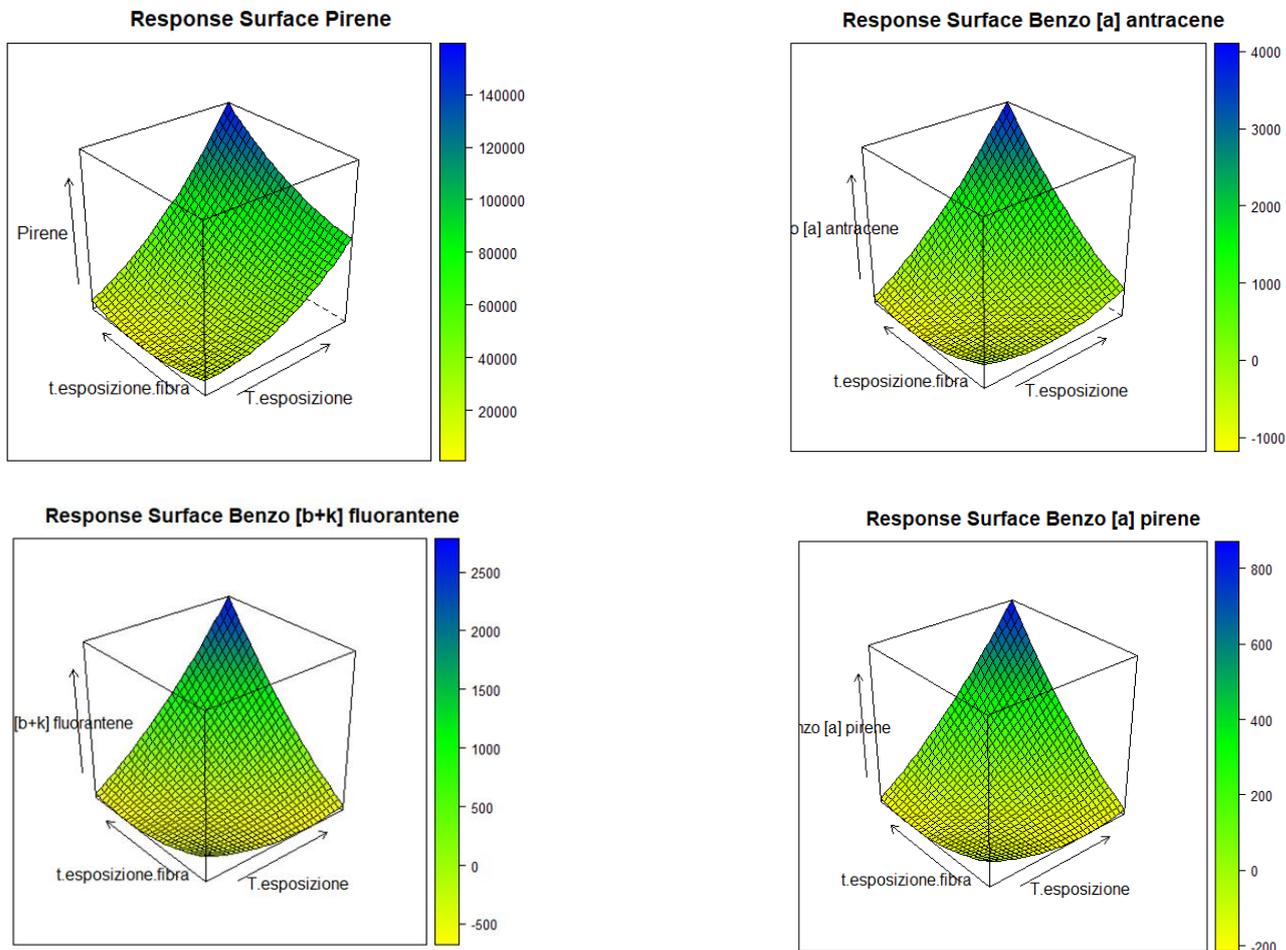
Tabella 17: Significatività dei coefficienti, espressa dal numero di asterischi, relativa alle variabili significative

Analita	T esp	t esp	T esp*t esp	t inc*t des	T esp ²
Naftalene					
Acenaftilene	***		**		*
Acenaftene	***		**		*
Fluorene	***	*	*		
Fenantrene	***	***	*		*
Antracene	***	***	*		*
Fluorantene	***	*	*		
Pirene	***	*	*		
Benzo[a]antracene					
Crisene	**				
Benzo[b+k]fluorantene				*	
Benzo[a]pirene				*	

Attraverso il software CAT sono state stabilite le condizioni ottimali delle due variabili più significative (temperatura e tempo di esposizione) nell'influenzare la risposta dei singoli IPA, attraverso la visualizzazione grafica denominata "Response surface IPA_{i-esimo}". In Figura 36 sono riportati i grafici della superficie di risposta dei differenti IPA, ad eccezione del naftalene la cui varianza spiegata risultava negativa e, perciò, il modello non spiegava i dati sperimentali ad esso correlati.

Figura 36: Superficie di risposta dei recuperi dei differenti IPA. La scala cromatica nell'immagine indica il valore della risposta. Sono mostrati i grafici relativi ai recuperi di quegli analiti con almeno un coefficiente significativo.





Nonostante i modelli spiegassero una varianza molto bassa, si è deciso di visualizzare comunque le superfici di risposta, notando che le superfici di risposta di benzo[a]antracene, benzo[b+k]fluorantene e benzo[a]pirene appaiono praticamente identiche. Questo era già stato indicato dall'analisi multivariata PCA che mostrava una forte correlazione tra questi IPA.

Dall'osservazione dei modelli singoli, si è deciso di valutare nuovamente la PCA, eliminando gli analiti per cui i modelli non erano significativi. Ciò è rappresentato dal nuovo *loading plot* in Figura 37, dei solo IPA i cui modelli erano buoni.

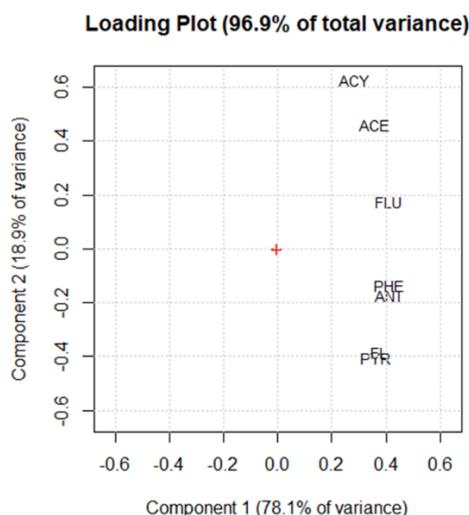


Figura 37: Nuovo loading plot dei recuperi dei soli IPA che hanno mostrato dei modelli singoli buoni

Si nota immediatamente che, confrontandolo con il *loading plot* precedente, sono migliorate la percentuale di varianza totale spiegata e quella relative alla componente 1, che spiega la varianza massima nel set di dati.

Nella seguente Tabella (Tabella 18) sono riportate le condizioni ottimali per ciascun analita valutato.

Tabella 18: Condizioni ottimali di temperatura e tempo di esposizione per il recupero di ciascun IPA

Analita	T esp (°C)	t esp (min)
Acenaftilene	62,5	35
Acenaftene	70	20
Fluorene	70	50
Fenantrene	70	50
Antracene	70	50
Fluorantene	70	50
Pirene	70	50
Benzo[a]antracene	70	50
Crisene	70	50
Benzo[b+k]fluorantene	70	50
Benzo[a]pirene	70	50

Si osserva che i più leggeri tra tutti (acenaftilene e acenaftene) hanno un tempo di esposizione ottimale più basso perché sono i più volatili.

Ciò è confermato anche da uno studio condotto da Yiantzi et al [35], dove il recupero degli IPA più leggeri è migliore a tempi di estrazione minori. Mentre in un altro lavoro di Doong et al [36], si pone l'attenzione sugli IPA più pesanti e si nota che il loro recupero è migliore a tempi di estrazione maggiori rispetto a quelli per gli IPA leggeri.

6.5.1.1.2 Experimental Design a 2 fattori

A causa degli andamenti delle risposte osservati nell'*experimental design* a 4 fattori è stato necessario spostarsi nel dominio sperimentale, ovvero a temperatura e tempo di esposizione maggiori per riuscire a valutare il recupero degli IPA pesanti. Fattori quali tempo di incubazione e desorbimento sono stati mantenuti costanti perché si è verificato nel primo *experimental design* che non risultassero significativi per il recupero degli IPA, ossia non lo influenzassero.

Pertanto, in questo secondo *experimental design*, i parametri che sono stati fissati sono i seguenti:

- $m_{\text{campione}} = 0,1000 \text{ g}$
- $v_{\text{agitaz.}} = 300 \text{ rpm}$
- Spike = 3 ng
- n_C : n° repliche punto centrale = 3
- $\alpha = 1$
- $t_{\text{incubazione}} = 20 \text{ min}$
- $t_{\text{desorbimento}} = 3 \text{ min}$

I parametri variabili (fattori) sono riportati nella Tabella 19:

Tabella 19: Fattori scelti con i rispettivi valori minimi e massimi

Nomi Fattori	Fattori	Livelli	Valori Livelli
X ₁	T _{esposizione} = T _{incubazione} [°C]	-1	80
		0	90
		1	100
X ₂	t _{esposizione} [min]	-1	60
		0	75
		1	90

La matrice teorica degli esperimenti è mostrata in Tabella 20.

Tabella 20: Matrice teorica di un CCD con 2 fattori e $nc = 3$

Nome esperimento	Fattore 1	Fattore 2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1	0
6	1	0
7	0	-1
8	0	1
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Quindi la matrice sperimentale è la seguente (Tabella 21):

Tabella 21: Matrice sperimentale di un CCD con 2 fattori e $nc = 3$

Nome esperimento	T_{esposizione} [°C]	t_{esposizione} [min]
1	80	60
2	100	60
3	80	90
4	100	90
5	80	75
6	100	75
7	90	60
8	90	90
9	90	75
10	90	75
11	90	75

Gli esperimenti non sono stati eseguiti in questo ordine, bensì randomizzati per evitare "effetti temporali".

Sono stati indagati 2 fattori tenendo conto anche delle varie interazioni tra essi; pertanto, la funzione teorica del modello è (Equazione 7):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

Equazione 7

dove:

- b_0 : termine costante (tutti +1 come valore codificato nella matrice)
- b_1, b_2 : coefficienti dei termini del primo ordine
- b_{12} : coefficienti dei termini di interazione
- b_{11}, b_{22} : coefficienti dei termini del secondo ordine
- x_1, x_2 : fattori

Anche in questo *experimental design* sono state effettuate le medesime valutazioni attraverso l'impiego del software chemiometrico CAT.

CAT è stato in grado di restituire i risultati dell'*experimental design* per ogni singolo IPA. In particolare, sono state valutate due diverse valutazioni:

CAT è stato in grado di restituire i modelli derivanti dai risultati dell'*experimental design*. In particolare, sono state effettuate due diverse valutazioni:

- complessiva mediante *Principal Component Analysis* (PCA): per individuare correlazioni e raggruppamenti per capire se si potesse fare un unico modello
- sui modelli relativi ai recuperi dei singoli IPA

A. Principal Component Analysis (PCA)

Analogamente a quanto svolto per l'*experimental design* a 4 fattori, si sono valutati come grafici il *loading* e lo *score plot* (Figura 38).

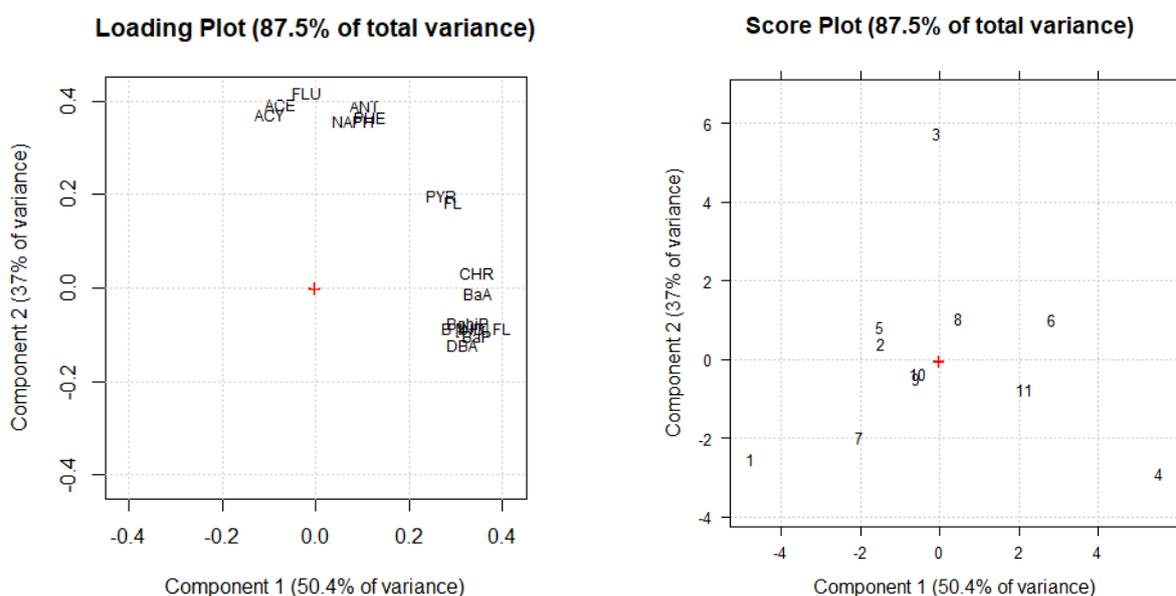


Figura 38: Grafici di loading e score plot restituiti da CAT, dove sono stati inclusi tutti gli analiti che è stato possibile valutare con il metodo

Dal *loading plot* è possibile osservare che i recuperi dei singoli IPA risultino in questo caso ampiamente distribuiti lungo entrambi le componenti (PC1 e PC2).

Nel dettaglio, osservando la distribuzione dei recuperi dei singoli IPA, si nota che quelli più leggeri, fino a m/z pari a 178 (naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene e antracene) si trovano raggruppati nella porzione superiore del grafico. Il pirene e il fluorantene, aventi entrambi m/z pari a 202, risultano infatti molto correlati. Gli IPA più pesanti con m/z maggiore o uguale a 228 formano un raggruppamento e, perciò, si può affermare che siano correlati tra loro. In particolare, i valori di recupero di: benzo[b+k]fluorantene, benzo[a]pirene, indeno[1,2,3-c,d]fluorantene, benzo[g,h,i]perilene e dibenzo[a,h]antracene sono fortemente correlati, ovvero governati nello stesso modo dai medesimi fattori.

Dallo *score plot* è possibile notare come gli esperimenti si distribuiscano in modo quasi casuale sia lungo PC1 che lungo PC2. Ciò implica che i risultati dei singoli esperimenti non siano tra loro molto correlati e, avendo una distribuzione molto ampia, variano al variare dei valori dei fattori. Questo è indice del fatto che, in effetti, le variabili nell'intervallo scelto influenzino molto le risposte.

Dopo aver effettuato un'analisi multivariata, si è deciso di valutare le superfici di risposta dei singoli IPA per comprendere meglio gli effetti delle variabili e i loro valori ottimali.

B. Modelli relativi ai recuperi dei singoli IPA

Attraverso l'utilizzo del software chemiometrico CAT sono stati determinati anche i modelli relativi ai recuperi dei singoli IPA, attraverso i quali è stato possibile valutare le correlazioni tra i fattori scelti e le risposte. La "varianza spiegata" descrive proprio la bontà di queste correlazioni, descritte in Tabella 22.

Tabella 22: Varianze spiegate dai singoli modelli relativi al recupero di ciascuno IPA

IPA	VARIANZA SPIEGATA [%]
Naftalene	65,78
Acenaftilene	85,03
Acenaftene	75,03
Fluorene	75,01
Fenantrene	92,98
Antracene	90,16
Fluorantene	85,45
Pirene	70,52
Benzo[a]antracene	85,85
Crisene	68,87
Benzo[b+k]fluorantene	60,63
Benzo[a]pirene	74,44
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	47,02
Benzo[g,h,i]perilene	28,27
Dibenzo[a,h]antracene	62,21

Si nota che gli IPA più pesanti (indeno[1,2,3-c,d]pirene, benzo[g,h,i]perilene) non vengono ben spiegati dal modello; infatti, esso ha difficoltà nell'esprimere una correlazione tra i fattori scelti e la risposta.

Spostando il dominio sperimentale a temperatura e tempo di esposizione maggiori per riuscire a valutare il recupero degli IPA pesanti, si sono ottenuti anche dei miglioramenti dei modelli dei recuperi di alcuni IPA leggeri.

Anche in questo caso vengono valutati i *p-value* riportati nel *data sheet* restituito dal software: più è basso il *p-value*, maggiore è la significatività statistica della differenza osservata [30].

Nelle Figure 39 e 40 è mostrato il modello restituito da CAT rispettivamente per il naftalene e per il fenantrene.

In particolare, rispetto all'Equazione 7, nella Tabella 23 sono esplicitati i fattori e le loro interazioni.

Tabella 23: Fattori e interazioni esplicitati.

Variabili dell'Equazione	Variabili esplicitate
X_1	T_{esp}
X_2	t_{esp}
X_1X_2	$T_{\text{esp}} t_{\text{esp}}$
X_1^2	T_{esp}^2
X_2^2	t_{esp}^2

```

Coefficients Std.dev. Conf.Int. p-value
b0           197437.89 29922.76  76918.91  0.0012
T.esp       -49360.83 23813.20  61213.79  0.0929
t.esp        83904.83 23813.20  61213.79  0.0169
T.esp*t.esp -63514.75 29165.10  74971.28  0.0813
T.esp^2      54459.76 36647.75  94206.04  0.1974
t.esp^2     -40967.24 36647.75  94206.04  0.3144

Variance of Y
9.943e+09

Standard deviation of the residuals
58330

% Explained Variance
65.78

```

Figura 39: Modello restituito da CAT per il naftalene

```

Coefficients Std.dev. Conf.Int. p-value
b0           547494.6316 7319.566  18815.54  0.0000
T.esp        11362.1667 5825.075  14973.83  0.1086
t.esp        34793.8333 5825.075  14973.83  0.0019
T.esp*t.esp -65192.0000 7134.231  18339.12  0.0003
T.esp^2      32719.9211 8964.602  23044.24  0.0147
t.esp^2       374.9211 8964.602  23044.24  0.9683

Variance of Y
2.899e+09

Standard deviation of the residuals
14268

% Explained Variance
92.98

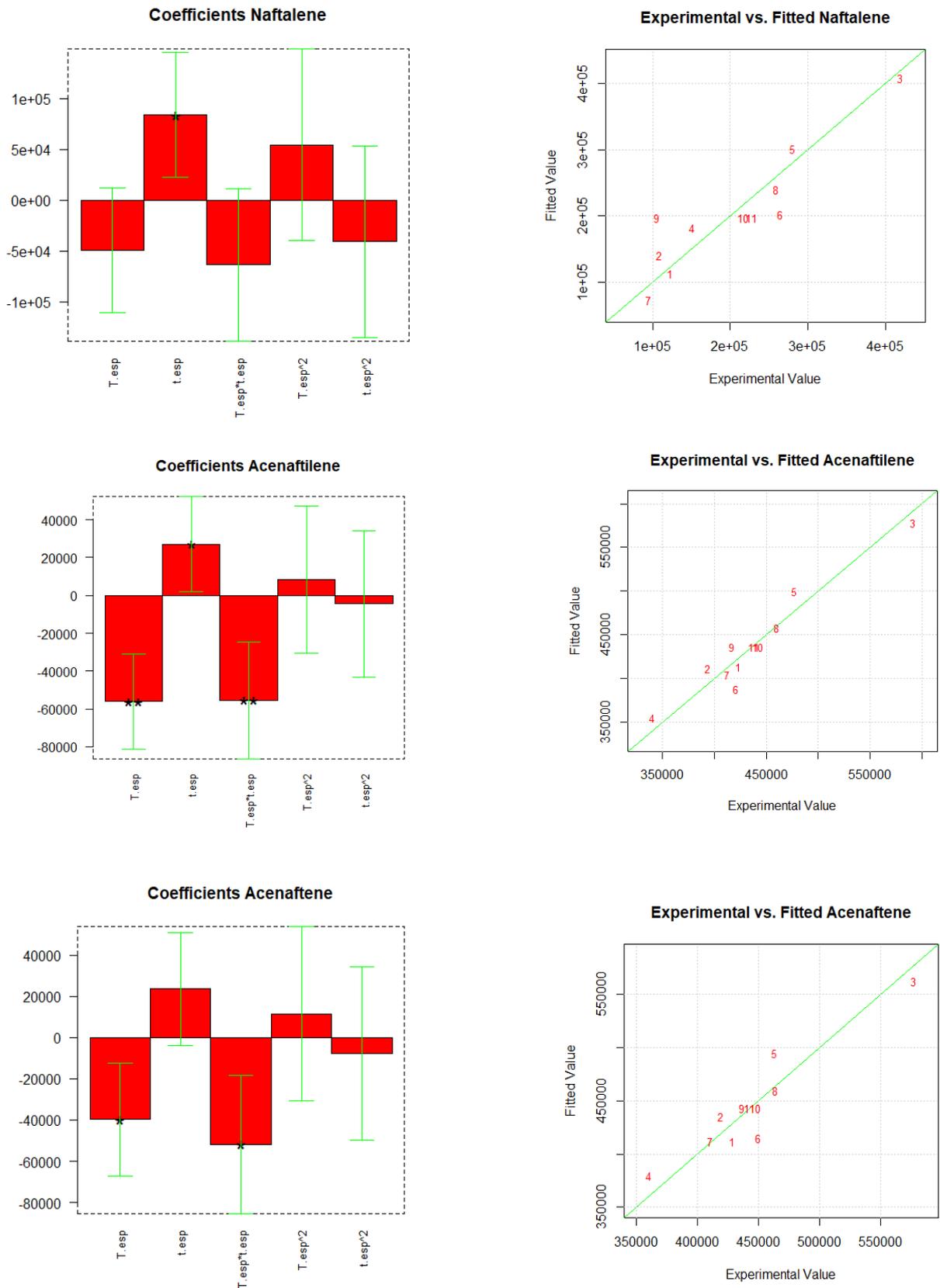
```

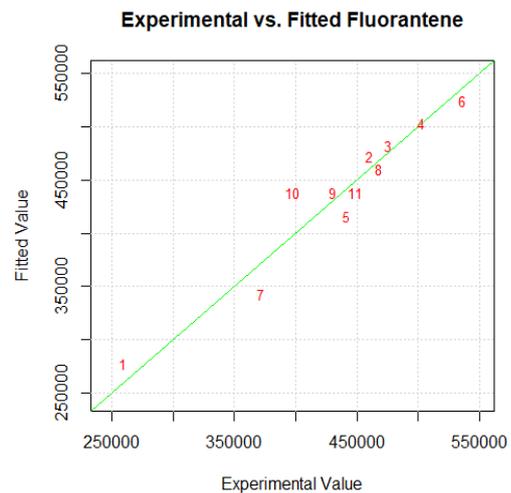
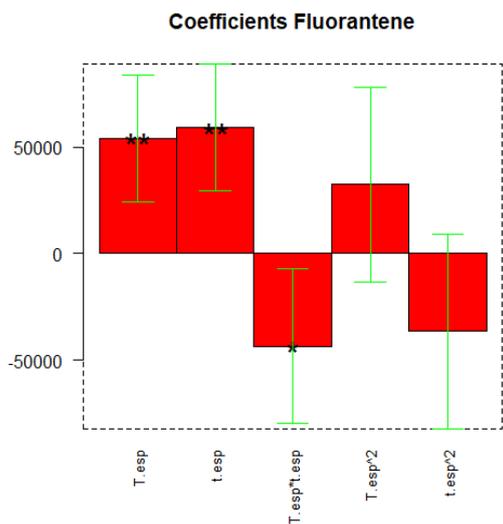
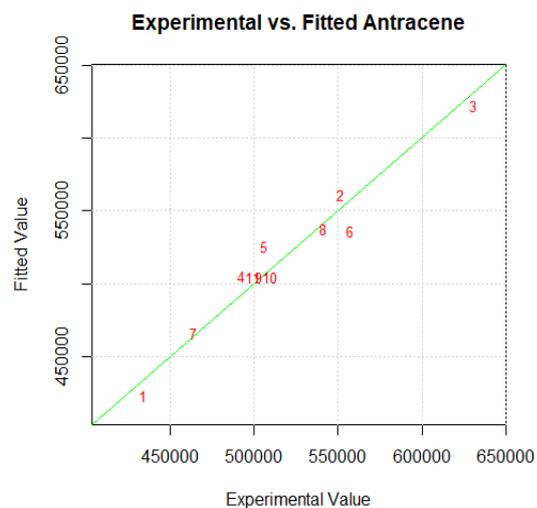
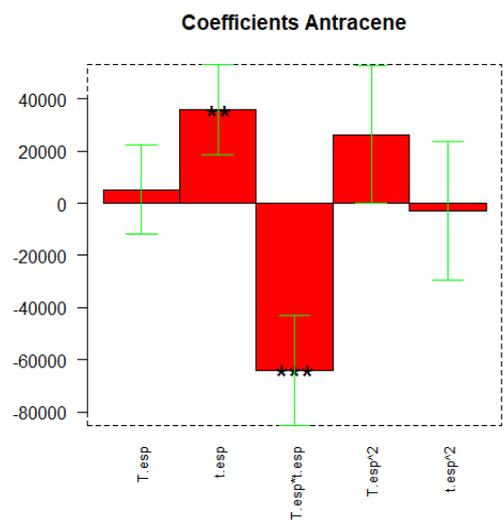
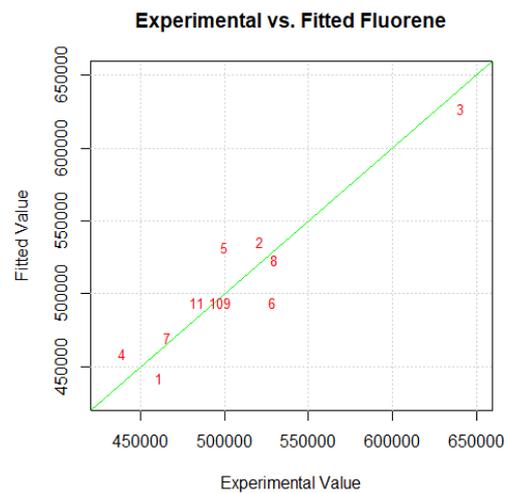
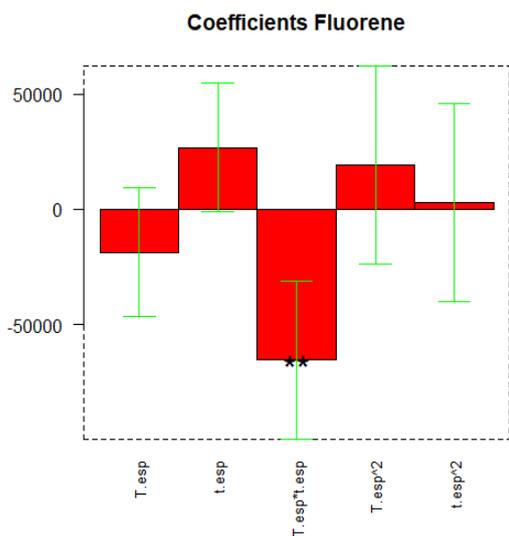
Figura 40: Modello restituito da CAT per il fenantrene

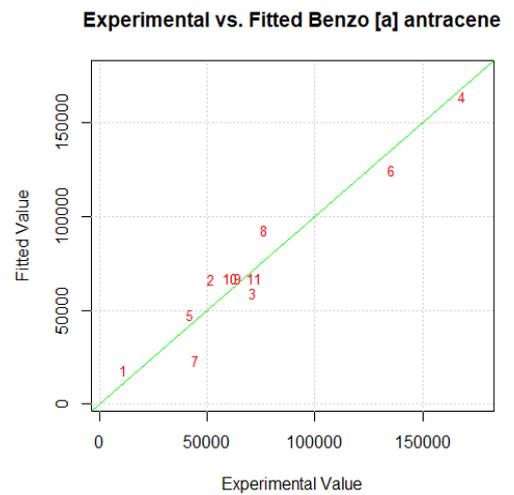
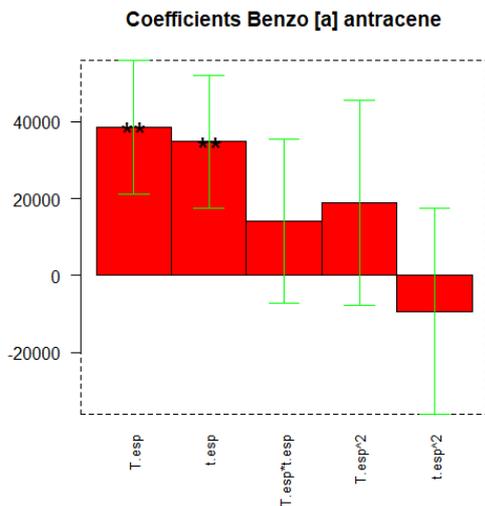
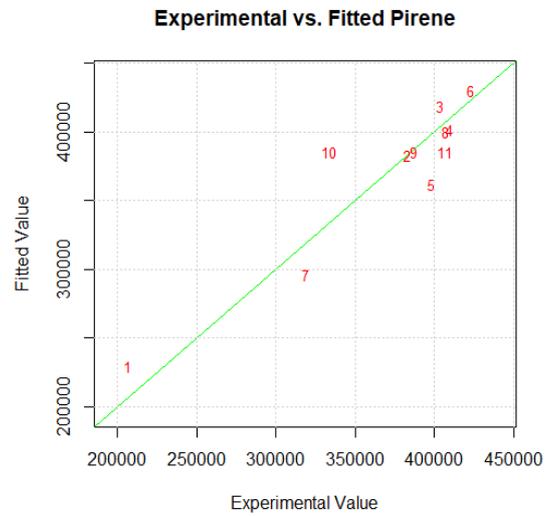
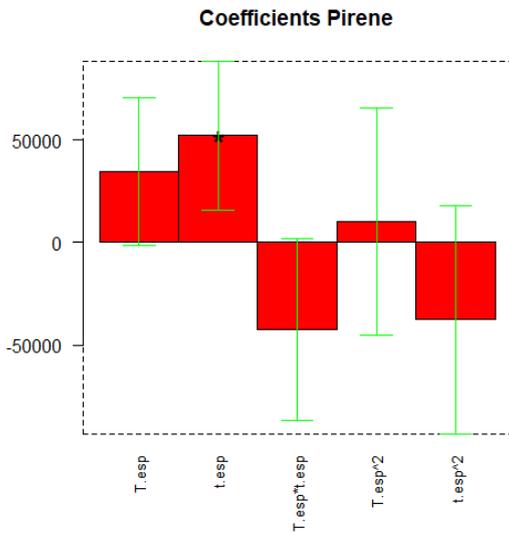
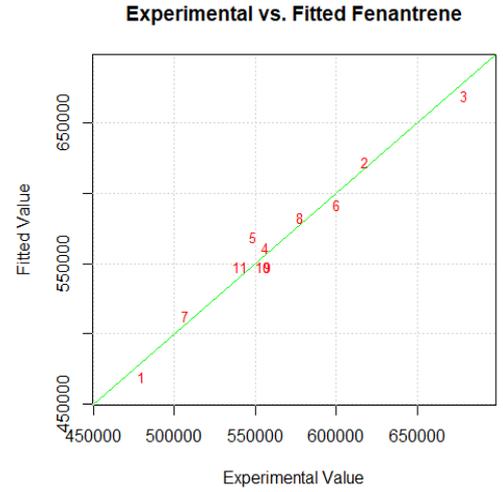
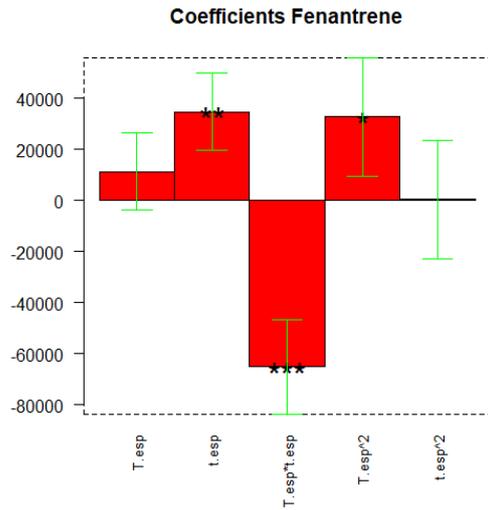
Come in precedenza, per valutare i modelli computati si visualizzano gli andamenti dei coefficienti (“Coefficients $IPA_{i-esimo}$ ”) e “la bontà del fitting” dei singoli modelli relativi agli esperimenti effettuati (“Experimental vs. Fitted $IPA_{i-esimo}$ ”).

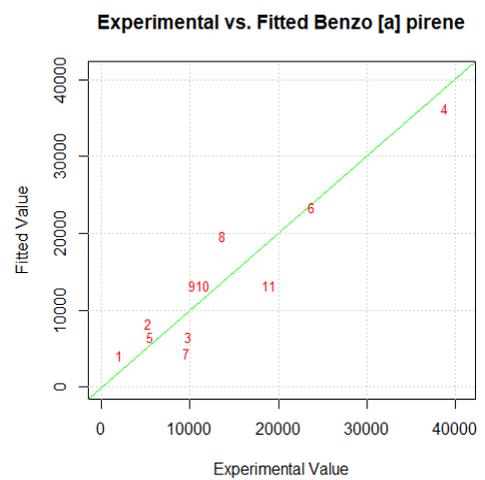
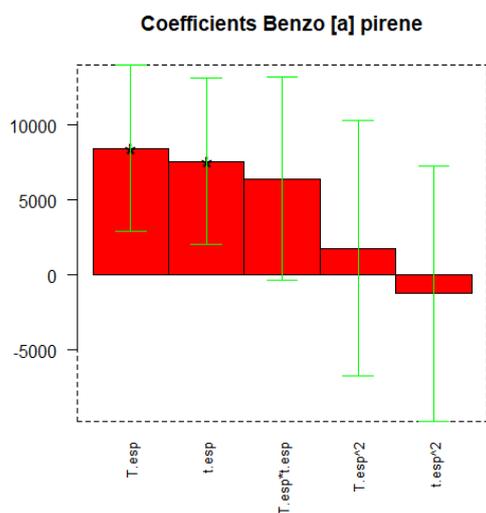
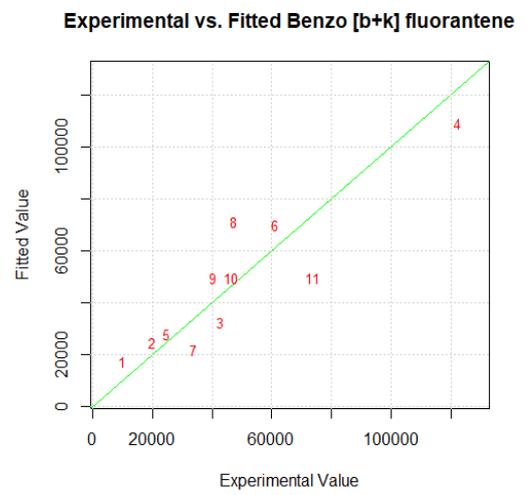
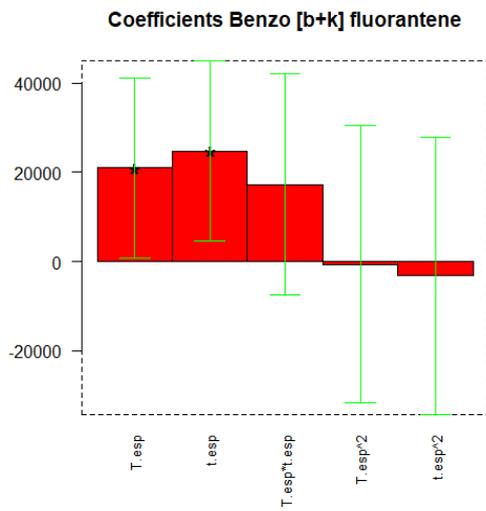
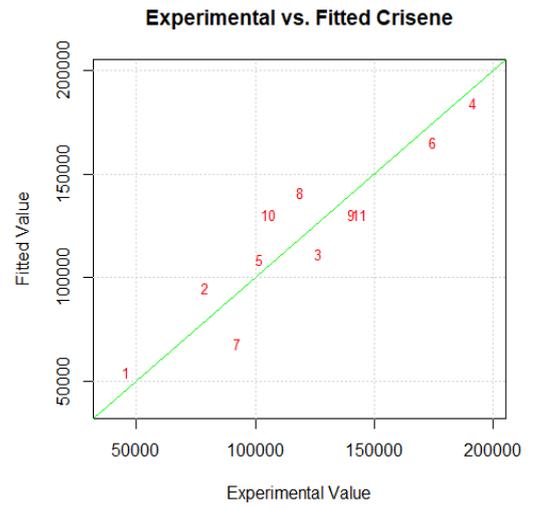
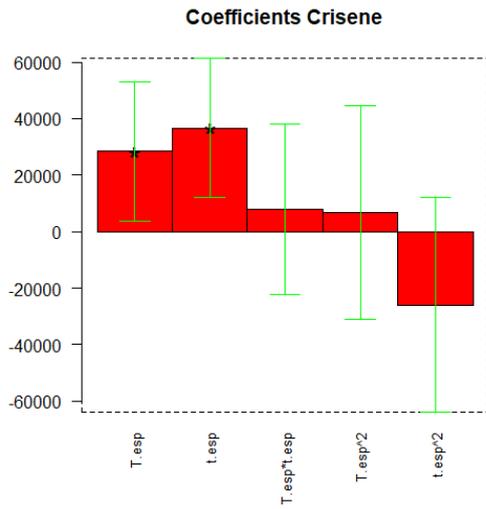
In Figura 41 sono presentate le due tipologie di grafico dei recuperi per ogni IPA valutato.

Figura 41: Coefficienti dei modelli e andamento dei dati teorici rispetto al modello predetto. Sono mostrati i grafici relativi ai recuperi di quegli analiti con almeno un coefficiente significativo.

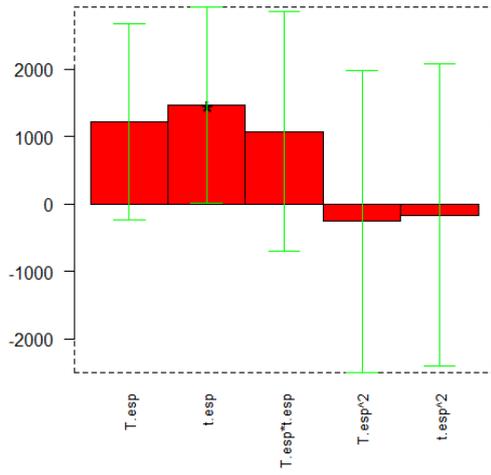




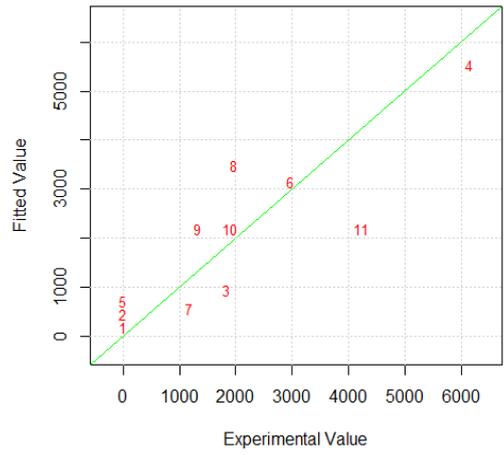




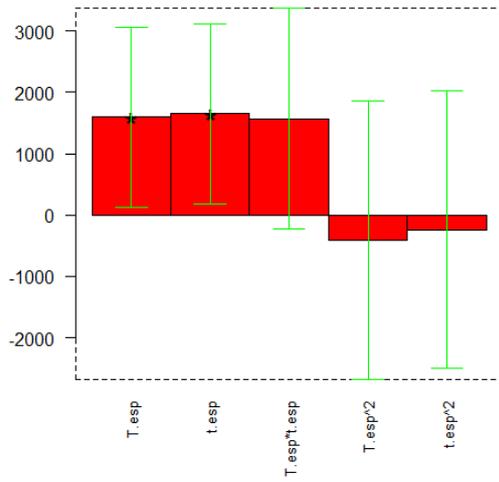
Coefficients Indeno[1,2,3-c,d]pirene



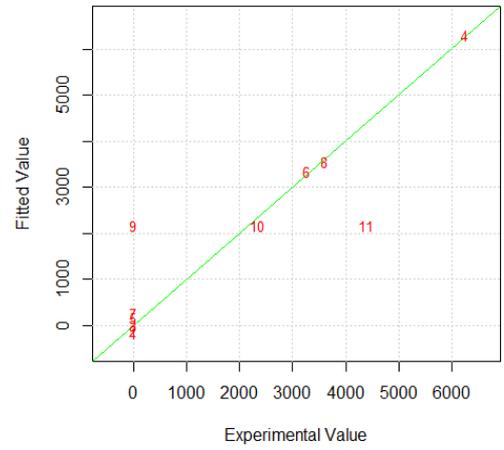
Experimental vs. Fitted Indeno[1,2,3-c,d]pirene



Coefficients Dibenzo[a,h]antracene



Experimental vs. Fitted Dibenzo[a,h]antracene



In Tabella 24 è possibile visualizzare quali variabili risultano effettivamente significative sulla risposta dei diversi IPA.

Tabella 24: Significatività dei coefficienti, espressa dal numero di asterischi, relativa alle variabili significative

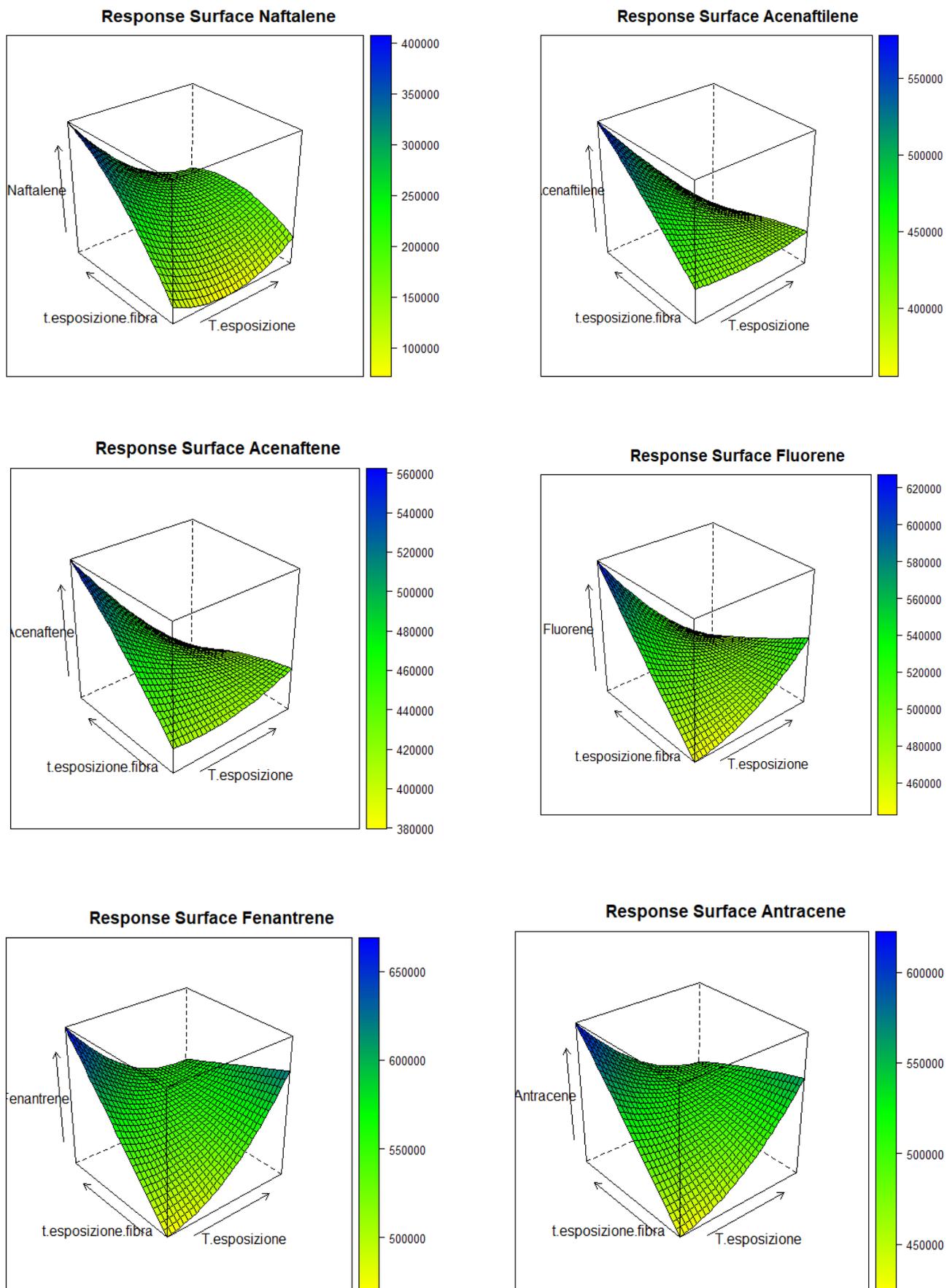
Analita	T esp	t esp	T esp*t esp	T esp ²
Naftalene		*		
Acenaftilene	**	*	**	
Acenaftene	*		*	
Fluorene			**	
Fenantrene		**	***	*
Antracene		**	***	
Fluorantene	**	**	*	
Pirene		*		
Benzo[a]antracene	**	**		
Crisene	*	*		
Benzo[b+k]fluorantene	*	*		
Benzo[a]pirene	*	*		
Indeno[1,2,3-c,d]pirene		*		
Benzo[g,h,i]perilene				
Dibenzo[a,h]antracene	*	*		

Dalla Tabella 24 è possibile osservare che per quanto riguarda i recuperi degli IPA più leggeri, essi presentano una evidente correlazione tra le due variabili. Questa, esaminando i grafici dei coefficienti dei modelli, risulta negativa, ovvero all'aumentare della temperatura di esposizione, la miglior risposta si ha a tempi minori e viceversa.

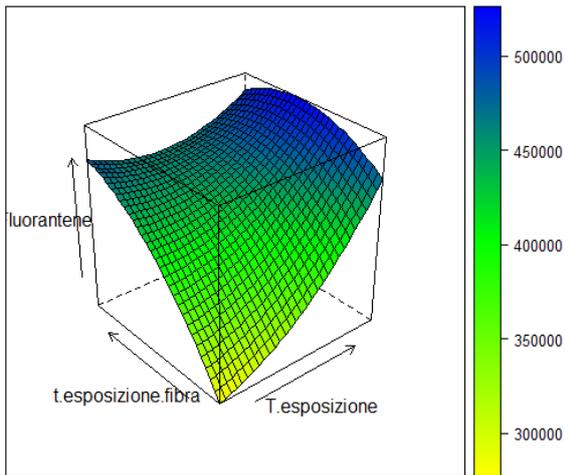
Le condizioni ottimali delle due variabili più significative (temperatura e tempo di esposizione) per valutare la risposta dei singoli IPA, sono state valutate attraverso la visualizzazione grafica “*Response surface IPA_{i-esimo}*”.

In Figura 42 sono riportati i grafici della superficie di risposta dei differenti IPA.

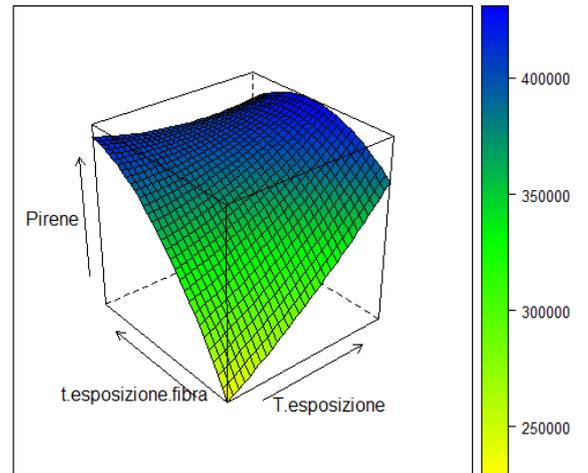
Figura 42: Superficie di risposta dei recuperi dei differenti IPA. La scala cromatica nell'immagine indica il valore della risposta. Sono mostrati i grafici relativi ai recuperi di quegli analiti con almeno un coefficiente significativo.



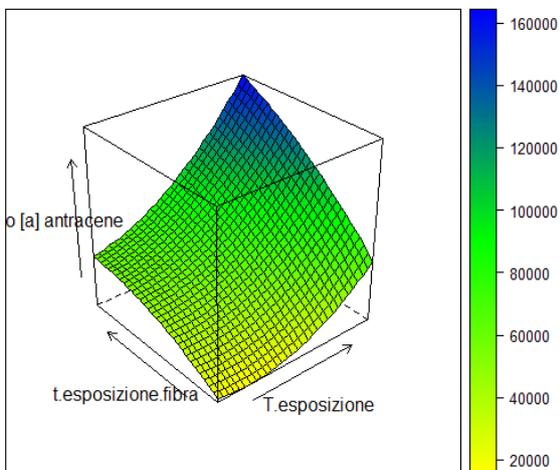
Response Surface Fluorantene



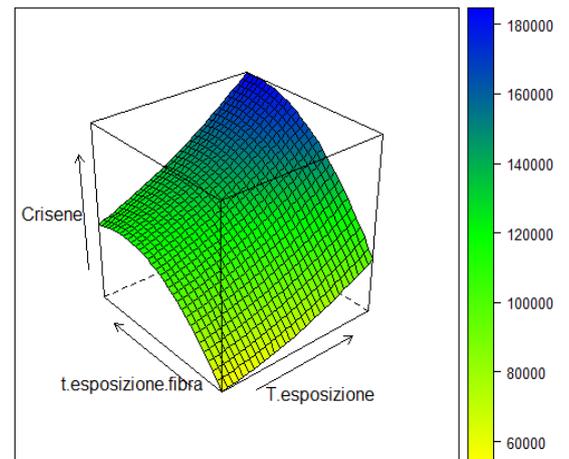
Response Surface Pirene



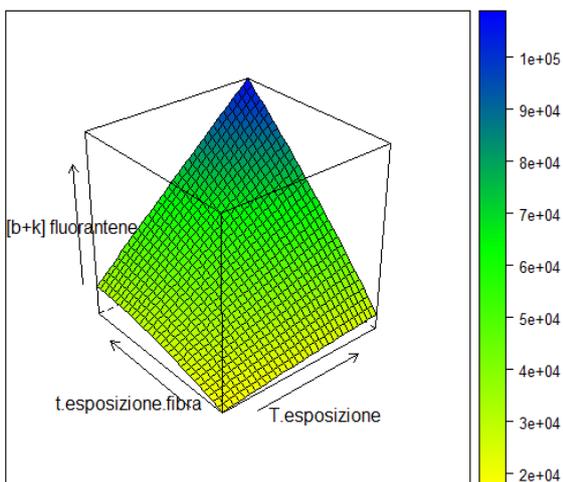
Response Surface Benzo [a] antracene



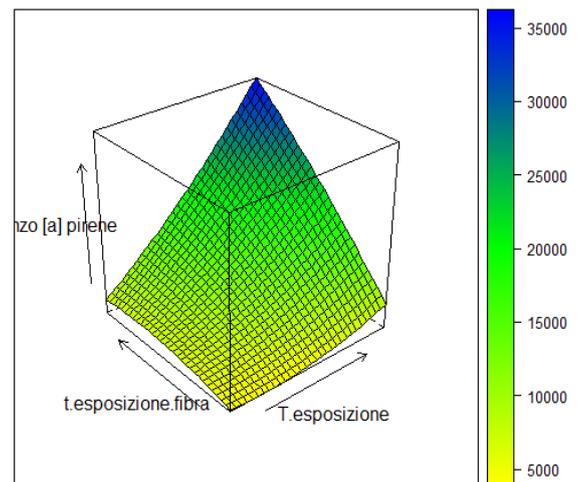
Response Surface Crisene

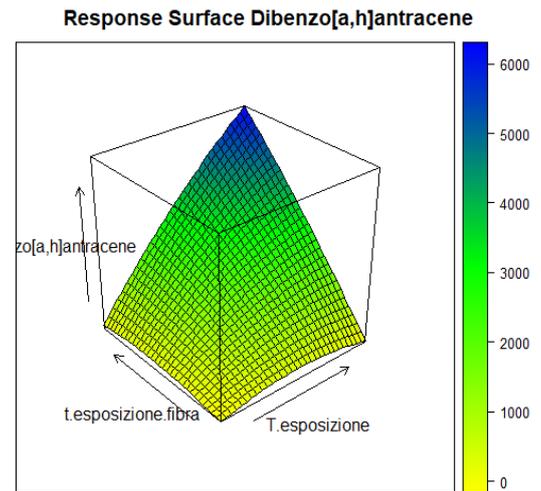
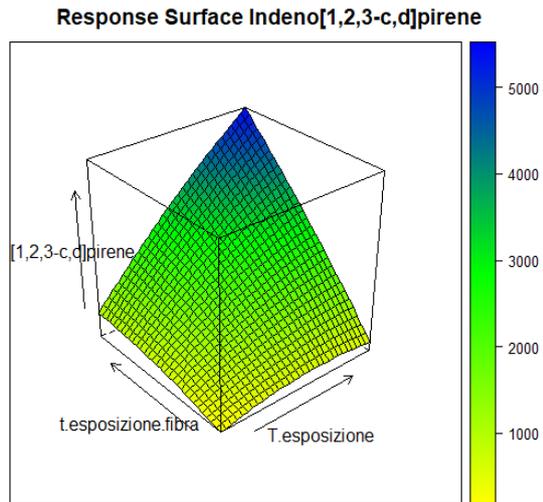


Response Surface Benzo [b+k] fluorantene



Response Surface Benzo [a] pirene





Si è notato che le superfici di risposta che appaiono praticamente identiche sono individuabili da set di analiti, quali:

- acenaftene e acenaftilene
- fenantrene e antracene
- fluorantene e pirene
- benzo[a]antracene e crisene
- benzo[b+k]fluorantene, benzo[a]pirene e indeno[1,2,3-c,d]pirene

Questo era già stato indicato dall'analisi multivariata PCA che mostrava una forte correlazione tra questi IPA, suggerendo che essi diano un recupero ottimale alle medesime condizioni.

Nella Tabella 25 sono riportate le condizioni ottimali per ciascun analita valutato.

Tabella 25: Condizioni ottimali di temperatura e tempo di esposizione per il recupero di ciascun IPA

Analita	T esp (°C)	t esp (min)
Naftalene	80	90
Acenaftilene	80	90
Acenaftene	80	90
Fluorene	80	90
Fenantrene	80	90
Antracene	80	90
Fluorantene	100	82,5
Pirene	100	82,5
Benzo[a]antracene	100	90
Crisene	100	90
Benzo[b+k]fluorantene	100	90
Benzo[a]pirene	100	90
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	100	90
Benzo[g,h,i]perilene	100	88,5
Dibenzo[a,h]antracene	100	90

6.5.1.1.3 Metodi ottimali per IPA leggeri e pesanti

Si è osservato che, a seconda del tempo di esposizione, la temperatura influenza più o meno la risposta dell'analita. In particolare, a tempi minori, l'influenza della temperatura è minima, mentre a tempi maggiori, la temperatura ha influenza significativa.

La temperatura e il tempo di esposizione della fibra hanno una forte interazione per quanto riguarda i recuperi degli IPA leggeri e, perciò, per riuscire ad esprimere al meglio la loro risposta, in termini di area, dovendo impostare la temperatura ad un valore fisso, è conveniente lavorare a tempi che siano abbastanza bassi ma in grado di fornire un grado di informazione che sia sufficientemente elevato.

Questo discorso, come mostrato dai grafici e dal *data sheet* dell'*experimental design* a 2 fattori, non può essere applicato agli IPA pesanti, i cui modelli mostrano delle interazioni che non sono significative.

Le condizioni ottimali scelte per la valutazione dei recuperi degli IPA leggeri e pesanti sono riportate nelle Tabelle 26 e 27 che seguono.

Tabella 26: Condizioni impostate per gli IPA leggeri

Variabile	Valore
t esposizione	50 min
T esposizione	70 °C
t incubazione	20 min
t desorbimento	3 min

Tabella 27: Condizioni impostate per gli IPA pesanti

Variabile	Valore
t esposizione	90 min
T esposizione	100 °C
t incubazione	20 min
t desorbimento	3 min

Come anticipato precedentemente, il tempo di incubazione e di desorbimento sono stati impostati, rispettivamente, a 20 e 3 min perché, non influenzando la risposta degli IPA, ci si pone a valori che siano il più convenienti possibili.

6.5.1.1.4 Costruzione della retta di calibrazione

Dopo aver ottimizzato i metodi per gli IPA leggeri e pesanti, si è passati ad una costruzione delle rette di calibrazione per ciascun IPA, verificandone la linearità.

Si è scelto di aggiungere ad ogni campione di matrice vegetale un quantitativo noto della soluzione contenente gli IPA a concentrazioni decrescenti. In particolare, la procedura prevedeva la preparazione di 4 soluzioni standard di IPA disciolte in acetone, rispettivamente a 5, 10, 20, 30 µg/L. Ad ogni campione di matrice vegetale (0,1000 g) è stata aggiunta una delle soluzioni standard in un volume pari a 100 µL e un quantitativo pari a 100 µL di una soluzione contenente una soluzione a 100 µg/L dei 5 IPA deuterati.

Si è cercato di costruire le rette mediante il metodo di calibrazione dello standard interno, ma si è notato che i valori dei segnali dello standard interno alla stessa concentrazione mostravano una forte variabilità. Quindi si sono costruite le rette utilizzando il metodo della calibrazione esterna.

In Figura 43 si riportano gli esempi delle rette costruite per il fluorene e per il fluorantene, che sono stati analizzati rispettivamente nelle condizioni ottimali relative agli IPA leggeri e in quelle relative agli IPA pesanti.

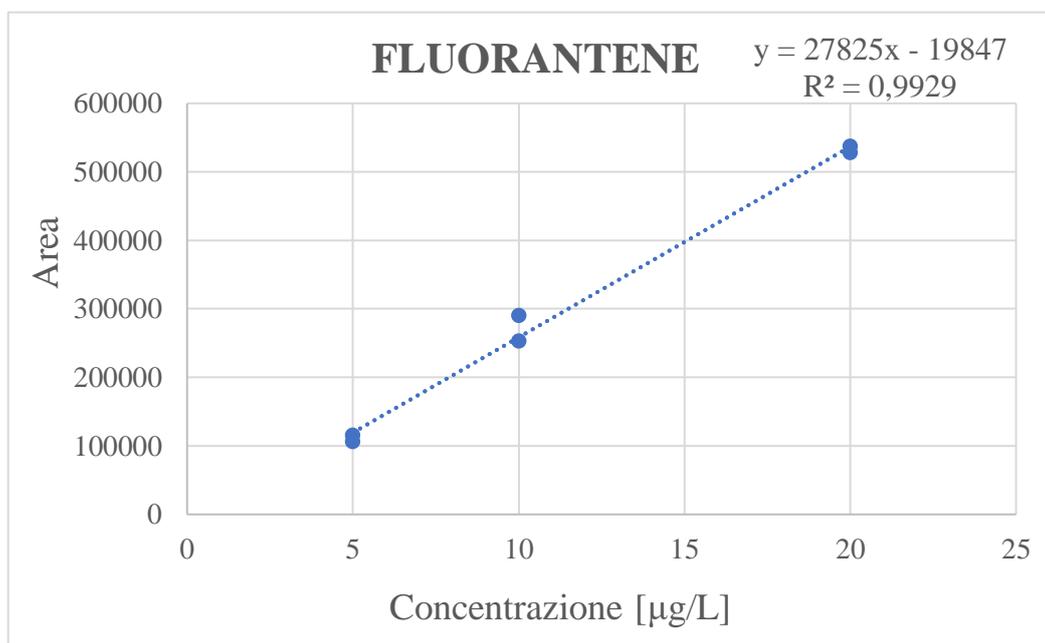
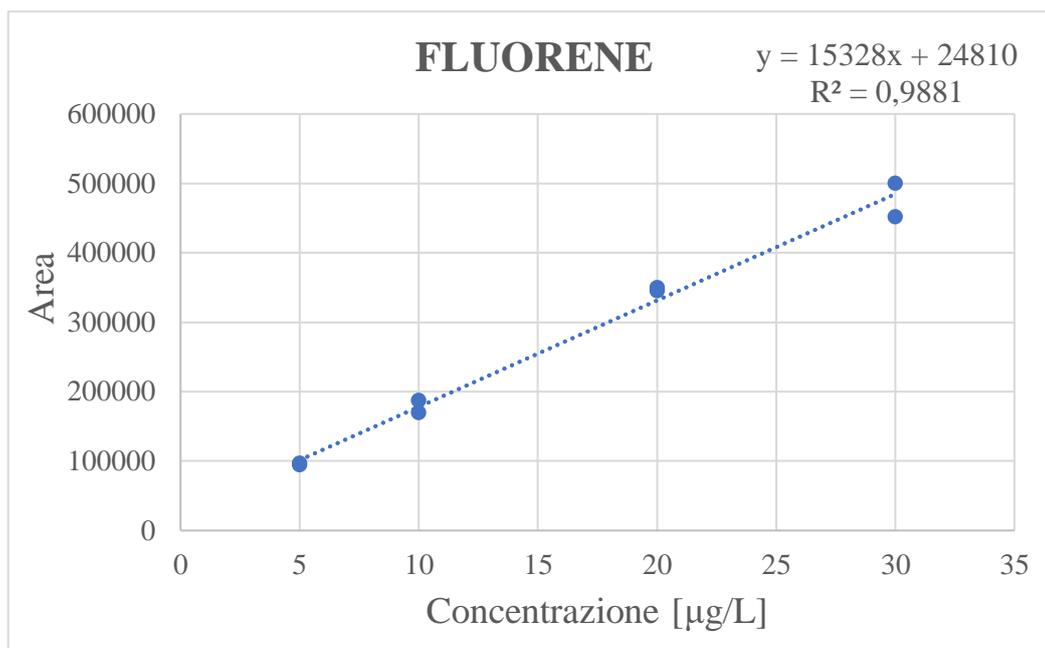


Figura 43: Rette relative a fluorene e fluorantene analizzati con le due differenti condizioni sperimentali che caratterizzano i due metodi

In entrambi i casi, è stato possibile rivelare l'analita alla concentrazione più bassa, ovvero 5 $\mu\text{g/L}$. Ciò si è dimostrato coerente per tutti gli analiti analizzati.

Si è, quindi, abbassato ulteriormente il valore di concentrazione a 2,5 µg/L per verificare se gli analiti fossero rivelabili anche a questo valore.

In Figura 44 è riportata la nuova retta relativa al fluorantene, prendendo in considerazione il nuovo valore di concentrazione più basso (2,5 µg/L).

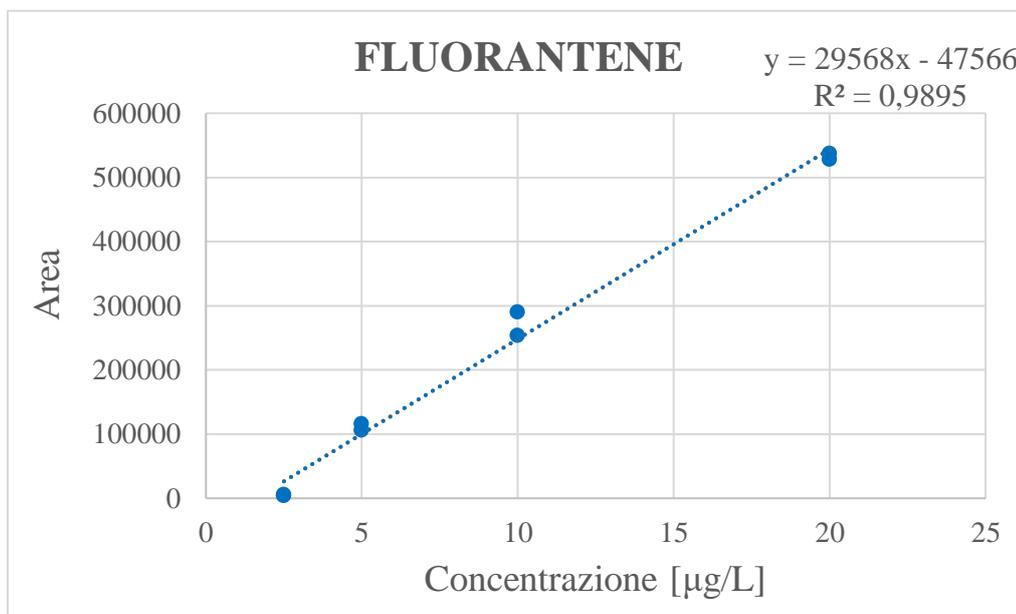


Figura 44: Nuova retta relativa al fluorantene

A titolo d'esempio sopra è riportato il grafico relativo al fluorantene, analizzato con il metodo ottimizzato per gli IPA più pesanti. Per tutti gli IPA così valutati è stato possibile costruire le rette di calibrazione escludendo il punto a 30 µg/L, dal momento che il segnale ottenuto a tale concentrazione era molto basso. Si può supporre che questo sia dovuto o ad un problema correlato alla preparazione dello standard a 30 µg/L oppure a un problema di sensibilità strumentale.

È stato comunque possibile rivelare le aree di ogni singolo IPA anche a concentrazione pari a 2,5 µg/L. Questa valutazione è stata effettuata su tutti gli analiti ma con il metodo ottimizzato per gli IPA pesanti; nonostante, siano stati distinti due metodi ottimali a seconda dell'IPA in esame, si sono riusciti a determinare anche i leggeri con una sensibilità apprezzabile.

7. CONCLUSIONI

Il principale scopo del progetto di tesi riguardava lo sviluppo di un metodo innovativo atto a valutare il contenuto di IPA in campioni solidi costituiti da una matrice vegetale. Avendo a disposizione un quantitativo estremamente ridotto di gemme, si è ottimizzato il metodo su una matrice vegetale, costituita da una miscela di specie diverse, scelta in modo che imitasse i campioni di gemme di *Tilia tomentosa*. In particolare, si è utilizzata come tecnica di estrazione la HS-SPME (microestrazione in fase solida in spazio di testa) cercando di ottimizzare le condizioni di estrazione degli IPA da questa matrice.

È stata sfruttata la tecnica chemiometrica dell'*experimental design*, in particolare il CCD (*Central Composite Design*), per ottenere queste informazioni. Essa ha permesso un'ottimizzazione efficiente delle condizioni sperimentali del metodo HS-SPME, che sono risultate distinte per gli IPA leggeri e pesanti.

È stato valutato il range di linearità degli IPA con il metodo di calibrazione esterna, perché non è stato possibile applicare quello dello standard interno a causa di una forte variabilità tra i segnali dello standard interno. Ogni analita è stato apprezzato fino ad una concentrazione pari a 2,5 µg/L, mediante l'applicazione delle condizioni ottimizzate per gli analiti più pesanti, che, comunque, hanno permesso di apprezzare anche i più leggeri con una sensibilità accettabile.

Le possibili prospettive future potrebbero essere indirizzate a comprendere il motivo della variabilità dei segnali dello standard interno e ad una valutazione del limite di rivelabilità (LOD) per ciascun analita mediante il metodo dello standard interno (eventualmente impiegandone uno nuovo). Inoltre, si potrebbero applicare i due metodi ottimizzati in questo lavoro di tesi per la valutazione degli IPA leggeri e pesanti nelle gemme di *Tilia tomentosa* provenienti dalle tre zone a basso, medio e alto inquinamento.

Si è anche verificata la quantificazione degli idrocarburi policiclici aromatici su estratti di gemme di *Tilia tomentosa* raccolte in tre differenti zone a diverso inquinamento nel contesto torinese. Questi estratti sono stati ottenuti attraverso tre diverse tecniche di estrazione (ultrasuoni nel 2021, macerazione nel 2019, ultrasuoni nel 2019) e il fine ultimo è costituito dal loro futuro impiego per la produzione di integratori alimentari, considerabili ad elevato valore aggiunto se ottenuti proprio da scarti. Gli integratori sono sottoposti ad una normativa che prevede che determinati IPA, eventualmente presenti, stiano al di sotto di un determinato valore.

Nessuno dei 4 IPA normati è stato riscontrato nei campioni. L'unico IPA che è stato trovato in concentrazioni fino a circa 14 µg/Kg di estratto è il naftalene, che però è considerato il meno tossico tra i 16 IPA prioritari. Il fatto che il quantitativo di IPA ritrovato sia generalmente basso (il totale di IPA non supera il valore di 35 µg/Kg di estratto) potrebbe essere dovuto al fatto che le gemme vengano raccolte durante il "periodo balsamico", ovvero restano esposte all'aria, e quindi all'inquinamento, per un periodo di tempo relativamente basso; perciò, la permanenza

nell'ambiente è talmente piccola da non lasciare il tempo alle gemme di interagire in modo significativo con gli IPA atmosferici.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Integratori Alimentari (EFSA), (n.d.). <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/food-supplements> (accessed February 20, 2023).
- [2] Linee di indirizzo sugli strumenti per concorrere a ridurre gli errori in terapia farmacologica nell'ambito dei servizi assistenziali erogati dalle Farmacie di comunità, n.d. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2189_allegato.pdf (accessed February 25, 2023).
- [3] E. Campanini, Dizionario di fitoterapia e piante medicinali, Tecniche Nuove, 2022.
- [4] D. Donno, F. Turrini, R. Boggia, M. Guido, G. Gamba, M.G. Mellano, I. Riionato, G.L. Beccaro, Sustainable Extraction and Use of Natural Bioactive Compounds from the Waste Management Process of *Castanea* spp. Bud-Derivatives: The FINNOVER Project, Sustainability. 12 (2020) 10640. <https://doi.org/10.3390/su122410640>.
- [5] P. Anastas, N. Eghbali, Green Chemistry: Principles and Practice, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>.
- [6] F. Chemat, M.A. Vian, G. Cravotto, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, IJMS. 13 (2012) 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>.
- [7] S. Mukhopadhyay, R. Dutta, P. Das, A critical review on plant biomonitors for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in air through solvent extraction techniques, Chemosphere. 251 (2020) 126441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126441>.
- [8] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, Egyptian Journal of Petroleum. 25 (2016) 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- [9] H.K. Bojes, P.G. Pope, Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas, Regulatory Toxicology and Pharmacology. 47 (2007) 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.11.007>.
- [10] Benzopirene (Ministero della Salute), (n.d.). <https://www.salute.gov.it/portale/temi/documenti/acquepotabili/parametri/BENZOPIRENE.pdf> (accessed March 7, 2023).
- [11] REGOLAMENTO (UE) 2015/ 1933 DELLA COMMISSIONE - del 27 ottobre 2015 - che modifica il regolamento (CE) n. 1881/ 2006 per quanto riguarda i tenori massimi di idrocarburi policiclici aromatici nella fibra di cacao, nelle chips di banana, negli integratori alimentari, nelle erbe aromatiche essiccate e nelle spezie essiccate, (n.d.).
- [12] Skoog, Holler, Crouch, Chimica Analitica Strumentale, II, 2009.
- [13] P.J. Barroso, J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Evaluation of the airborne pollution by emerging contaminants using bitter orange (*Citrus aurantium*) tree leaves as biosamplers, Science of The Total Environment. 677 (2019) 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.391>.

- [14] F. Baroudi, J. Al-Alam, S. Chimjarn, O. Delhomme, Z. Fajloun, M. Millet, Conifers as environmental biomonitors: A multi-residue method for the concomitant quantification of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls by LC-MS/MS and GC-MS/MS, *Microchemical Journal*. 154 (2020) 104593. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104593>.
- [15] J. Klingberg, B. Strandberg, H. Sjöman, M. Taube, G. Wallin, H. Pleijel, Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in *Quercus palustris* and *Pinus nigra* in the urban landscape of Gothenburg, Sweden, *Science of The Total Environment*. 805 (2022) 150163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150163>.
- [16] C. Fan, X. Cao, T. Han, H. Pei, G. Hu, W. Wang, C. Qian, Selective microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using a hydrophobic deep eutectic solvent composed with an iron oxide-based nanoferrofluid, *Microchim Acta*. 186 (2019) 560. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3651-y>.
- [17] Y. Dai, E. Rozema, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents, *Journal of Chromatography A*. 1434 (2016) 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>.
- [18] *Comprehensive Sampling and Sample Preparation Analytical Techniques for Scientists*, Janusz Pawliszyn, 2012.
- [19] N. Ratola, P. Herbert, A. Alves, Microwave-assisted headspace solid-phase microextraction to quantify polycyclic aromatic hydrocarbons in pine trees, *Anal Bioanal Chem*. 403 (2012) 1761–1769. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5962-2>.
- [20] F.-F. Lei, J.-Y. Huang, X.-N. Zhang, X.-J. Liu, X.-J. Li, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vegetables by Headspace SPME-GC, *Chromatographia*. 74 (2011) 99–107. <https://doi.org/10.1007/s10337-011-2024-4>.
- [21] Calix[6]arene, (n.d.). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calix_6_arene#section=2D-Structure (accessed February 26, 2023).
- [22] R.R. dos Santos, L.D. Vidotti Leal, Z. de Lourdes Cardeal, H.C. Menezes, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated and oxygenated derivatives in coffee brews using an efficient cold fiber-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry method, *Journal of Chromatography A*. 1584 (2019) 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.046>.
- [23] M. Moreira, L. André, Z. Cardeal, Analysis of Phthalate Migration to Food Simulants in Plastic Containers during Microwave Operations, *IJERPH*. 11 (2013) 507–526. <https://doi.org/10.3390/ijerph110100507>.
- [24] C. Maes, M. te Molder, W. Luyten, G. Herremans, N. Winckelmans, R. Peeters, R. Carleer, M. Buntinx, Determination of the nitrogen gas transmission rate (N₂GTR) of ethylene vinyl alcohol copolymer, using a newly developed permeation measurement system, *Polymer Testing*. 93 (2021) 106979. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106979>.

- [25] Colonne Rxi-5Sil MS (silice fusa), (n.d.). <https://www.restek.com/it/prodotti/colonne/colonne-GC/colonne-capillari-in-silice-fusa/7718/> (accessed February 26, 2023).
- [26] M. Grotti, *Metodi spettroscopici per l'analisi elementare*, Aracne, 2012.
- [27] GC-MS instrument, n.d. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gc-ms-principle-instrument-and-analyses-and-gc-msms-362513> (accessed February 23, 2023).
- [28] R. Leardi, C. Melzi, G. Polotti, CAT (Chemometric Agile Tool), (2023). <http://gruppochemiometria.it/index.php/software>.
- [29] Basilica di Superga (Torino), (n.d.). <https://caiframe.com/realizzazione/basilica-di-superga-torino/> (accessed February 26, 2023).
- [30] D. Livingston, *A Practical Guide to Scientific Data Analysis*, Wiley, n.d.
- [31] B. Benedetti, V. Caponigro, F. Ardini, *Experimental Design Step by Step: A Practical Guide for Beginners*, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 52 (2022) 1015–1028. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1848517>.
- [32] SPME fiber coating, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/561/886/t794123.pdf> (accessed February 26, 2023).
- [33] S. Bhattacharya, *Central Composite Design for Response Surface Methodology and Its Application in Pharmacy*, in: P. Kayaroganam (Ed.), *Response Surface Methodology in Engineering Science*, IntechOpen, 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95835>.
- [34] I.T. Jolliffe, J. Cadima, *Principal component analysis: a review and recent developments*, *Phil. Trans. R. Soc. A*. 374 (2016) 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>.
- [35] E. Yiantzi, N. Kalogerakis, E. Psillakis, *Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid samples*, *Analytica Chimica Acta*. 890 (2015) 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.047>.
- [36] R. -a. Doong, S. -m. Chang, Y. -c. Sun, *Solid-Phase Microextraction and Headspace Solid-Phase Microextraction for the Determination of High Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Soil Samples*, *Journal of Chromatographic Science*. 38 (2000) 528–534. <https://doi.org/10.1093/chromsci/38.12.528>.

9. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Marina Di Carro e la Dott.ssa Barbara Benedetti per avermi, in primis, permesso di svolgere il mio lavoro all'interno del vostro gruppo di ricerca, per avermi donato una parte delle vostre conoscenze al fine di farle mie, per avermi compreso in alcuni particolari momenti di questo percorso.

Ringrazio Matteo per la disponibilità repentina nel rispondere alle mie domande e ai miei dubbi esistenziali, a partire da quelli accademici fino ad arrivare a quelli riguardanti la mia persona.

Grazie Chiara perché, con le tue parole, sei riuscita a tranquillizzarmi più di una volta. Hai colto la turbolenza anche dietro ai miei sorrisi. Penso tu sia una persona davvero speciale.

Grazie ad Henry per i momenti di spensieratezza nelle pause pranzo e non solo. Il tuo umorismo ti contraddistingue e coinvolge le persone intorno a te.

Un ringraziamento speciale è per te Francesca. In questi due anni sei stata il mio sostegno, la persona che è stata capace di comprendermi e di ascoltarmi. Ho imparato molto di te e sono contenta che tu sia riuscita a sentirti libera con me. Il mio percorso in questi due anni è stato contraddistinto da alti e bassi, ma è stato fondamentale sapere di avere vicino una persona come te, pronta a non lasciarmi andare e a tenermi con i piedi per terra.

Ringrazio te Smile per essere sempre pronta ad ascoltare. Sei stata accanto a me spesso, ed un particolare momento non lo dimenticherò mai. Sii sempre te stessa, metti la tua persona al primo piano più spesso perché sei una bella persona. Se avessi bisogno di una spalla o di una persona con cui confidarti, ricordati di me.

Sara, che dire di te, posso solo essere contenta della persona che sei e stai diventando, inseguendo finalmente i tuoi sogni. Non ci siamo perse e questo per me è tanto importante. Il nostro rapporto è rimasto immutato nonostante la vita ci abbia portato a percorrere strade differenti. Con te, però, mi sento sempre me stessa, libera e spensierata e so che tu ci sarai sempre per me, perché sei e rimarrai il mio punto fermo.

Ringrazio te Dennis perché la nostra vita sta andando avanti, insieme. In questo anno di convivenza sei stato un supporto psicologico e non solo. Mi hai sopportato e ti sei preso cura di me quando non ne avevo la forza. Grazie per essere il mio "pungiball", la mia valvola di sfogo. Grazie per farmi sentire al sicuro, in qualsiasi occasione.

Grazie nonna Claudia e zio Leo, siete lontani ma vicini. So che questo mio traguardo vi rende molto fieri di me e questo mi fa gioire. Il vostro sostegno si fa sentire anche a 600 km. So che il giorno della mia laurea sarete lì con me a sostenermi, anche solo dedicandomi un pensiero. Vi voglio bene, immensamente.

Infine, un ultimo ringraziamento, ma non per importanza, va a voi Mamma e Papà. Il bene che vi voglio è immisurabile. Grazie per avermi insegnato cosa vuol dire il termine “Amore”. L’amore che vi mostrate e dichiarate ogni giorno con i sorrisi, le parole e le attenzioni. Ma anche l’amore nei miei confronti, mi avete donato tutto di voi stessi dal momento in cui sono nata fino ad oggi. So che sarete sempre al mio fianco, sempre pronti ad accogliermi e che non mi lascerete mai sola. La nostra vita, negli ultimi anni, è stata stravolta ma insieme siamo e stiamo riuscendo ad affrontare tutto, a piccoli passi, ma sempre insieme.