

Università Ca'Foscari di Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e tecnologie sostenibili

LM-54 (Scienze chimiche)



Tesi di Laurea Magistrale

**DETERMINAZIONE DI COMPOSTI IDROSOLUBILI
NELLE DIVERSE FRAZIONI DELL'AEROSOL
ATMOSFERICO CON PARTICOLARE ATTENZIONE
ALLE PARTICELLE ULTRAFINI**

Relatore

Prof. Andrea Gambaro

Laureando

Matteo Feltracco - 816906

Correlatrice

Dott.ssa Elena Barbaro

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

Indice

Scopo della tesi	5
Capitolo 1 L'aerosol atmosferico	7
1.1 Definizione e caratteristiche	7
1.2 Aerosol organico	11
1.3 Processi in atmosfera dell'aerosol	13
1.4 Effetti su clima, ecosistemi, materiali e salute umana	14
Capitolo 2 Gli analiti	17
2.1 Prodotti di degradazione dell' α -pinene	17
2.2 Amminoacidi	25
2.3 Metossifenoli	29
Capitolo 3 Lo strumento	35
3.1 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> - HPLC	35
3.1.1 Cromatografia a fase inversa	38
3.1.2 Separazione cromatografica enantioselettiva	39
3.2 Spettrometro di massa	40
3.2.1 Interfaccia LC/MS e sorgente	40
3.2.2 Analizzatore	43
Capitolo 4 Aspetti teorici del metodo analitico	47
4.1 Metodo strumentale	47
4.2 Metodo cromatografico	48
4.3 Preanalitica	48

4.4	Validazione del metodo	49
Capitolo 5	Campionamento	51
5.1	Sito di campionamento	51
5.2	Campionatore	52
Capitolo 6	Messa a punto del metodo	57
6.1	Standard e materiali	57
6.2	Metodologia analitica HPLC-ESI-MS/MS	60
6.2.1	Sviluppo del metodo MRM	61
6.2.2	Sviluppo del metodo cromatografico	65
6.2.3	Ottimizzazione della sorgente ESI	69
6.3	Metodo per amminoacidi e metossifenoli	70
6.4	Risposta strumentale	71
6.4.1	Linearità	71
6.4.2	Limiti di rilevabilità e quantificazione strumentali	71
6.5	Trattamento del campione	72
6.6	Validazione procedurale	73
Capitolo 7	Risultati e discussione	77
7.1	Analisi dimensionale	77
7.2	Andamenti di acido cis-pinonico e pinico	82
7.3	Andamenti di L e D-amminoacidi	90
7.4	Andamenti dei metossifenoli	100
Conclusioni		109
Appendice A		113
Appendice B		115
Appendice C		119
Appendice D		121

Scopo della tesi

Lo scopo del presente lavoro di tesi consiste nella messa a punto di una metodologia analitica per la determinazione di composti organici derivanti dall'ossidazione dell' α -pinene, una molecola semivolatile emessa da latifoglie e conifere, in campioni di aerosol atmosferico. Acido cis-pinonico ed acido pinico sono i prodotti principali di fotoossidazione e derivano da numerose reazioni che vedono partecipati come partner reattivi O_3 , O_2 , $OH\cdot$, NO_x e perossidi.

È stata sviluppata inoltre una procedura preanalitica univoca per la determinazione di acido cis-pinonico e pinico, amminoacidi (molecole organiche che nella struttura recano sia il gruppo funzionale carbossilico sia quello amminico) e metossifenoli (composti organici che derivano principalmente dalla combustione della lignina).

L'impattore MOUDI II impiegato per il campionamento ha reso possibile la separazione dimensionale delle particelle in 12 stadi, da 54 nm a 18 μm . È stato dunque sviluppato un metodo strumentale ad alta sensibilità mediante HPLC-MS/MS per la determinazione di acido cis-pinonico ed acido pinico. Il campionamento di aerosol è stato condotto presso il Campus Scientifico di Ca' Foscari (Mestre-Venezia) da marzo a maggio 2016. La procedura preanalitica è stata validata mediante la stima dei valori di bianco procedurale, limiti di rilevabilità procedurali, ripetibilità e accuratezza del metodo per ogni analita.

Capitolo 1

L'aerosol atmosferico

1.1 Definizione e caratteristiche

L'aerosol può essere definito come la dispersione di particelle fini, solide o liquide, in un mezzo gassoso ^[1]. Esse variano nel diametro per più di quattro ordini di grandezza, da alcuni nanometri (nm) a decine o centinaia di micrometri (μm) ^[2]. I diversi meccanismi di formazione influenzano sia la distribuzione dimensionale che le forme generalmente irregolari. In atmosfera le particelle¹ variano in diametro (polidispersione) e raramente sono presenti come monodisperse, cioè con stesso diametro. Inoltre, a seconda della forma, le particelle possono essere divise in isometriche, cioè quelle che hanno forma sferica, discoidali e fibre, cioè simile ad aghi. Sulla base di questi ragionamenti, la distribuzione granulometrica viene ottenuta usando come parametro di riferimento il diametro aerodinamico D_a : esso viene definito come il diametro di una particella sferica di densità 1 gcm^{-3} avente la stessa velocità di sedimentazione di una particella reale, nelle stesse condizioni di temperatura, pressione e umidità relativa. E' convenzione suddividere il particolato atmosferico nelle seguenti frazioni:

- **frazione ultrafine**: chiamate anche nanoparticelle, possiedono un diametro massimo di $0.1\ \mu m$
- **frazione fine**: frazione detta sottile, avente diametro compreso tra 0.1 e $2.5\ \mu m$

¹Sovente le diciture materiale particellato, particolato e particellato vengono usate come sinonimi di "aerosol". Questa terminologia non è corretta poiché ne esclude la componente liquida

- **frazione grossolana:** ha diametro fino ai $100 \mu m$. A differenza della frazione fine ed ultrafine, tendono a sedimentare in tempi di decine di minuti

La dimensione delle particelle costituisce uno dei parametri più importanti per monitorare il loro comportamento in atmosfera, descriverne le tipologie di sorgenti e stimare la permanenza in atmosfera. Solfati, ammonio, carbonio organico ed elementare ed alcuni metalli di transizione si trovano prevalentemente nelle particelle fini ed ultrafini, mentre magnesio, calcio, silicio, alluminio, ferro (che costituiscono il materiale crostale) e le particelle come pollini, spore e frammenti di piante (che definiscono il materiale organico biogenico) solitamente sono presenti nella frazione grossolana. L'unica eccezione va fatta per i nitrati che si trovano distribuiti in maniera più o meno omogenea nelle varie frazioni [3].

Come si vede in Figura 1.1, la distribuzione delle dimensioni dell'aerosol atmosferico viene descritta da varie mode² che cambia a seconda se si considera il numero delle particelle o il loro volume.

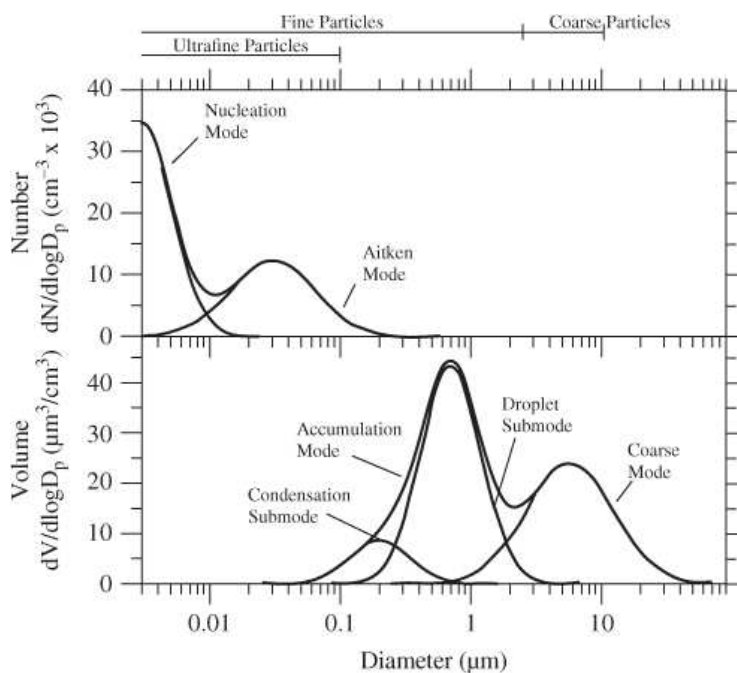


Figura 1.1: Distribuzione numerica (sopra) e volumetrica (sotto) dell'aerosol

²Con il termine moda si intende il valore numerico misurato il maggior numero di volte in una distribuzione di misure

Se si considera il numero di particelle rispetto alla variazione del diametro delle stesse, l'andamento mostra due tipologie di mode: l'accumulazione, in cui sono presenti particelle che arrivano fino a 10 nm, e i nuclei di Aitken, con diametro che varia tra i 10 e i 100 nm. Il vantaggio di considerare la distribuzione numerica è quello di ottenere informazioni aggiuntive rispettivamente alla distribuzione di massa (minimo contributo alla totalità dell'aerosol delle particelle con diametro inferiore ai $0.1 \mu m$). Infatti, numerosi studi ^[4] confermano che il maggior numero di particelle ha dimensioni inferiori ai $0.1 \mu m$, ma la maggior parte del volume dell'aerosol è caratterizzato da particelle con diametro maggiore di $0.1 \mu m$.

Nella seconda parte della Figura 1.1 viene riportata la distribuzione della massa (o del volume) rispetto al diametro. L'andamento è dominato dalla moda di accumulazione (da 0.1 a circa $2 \mu m$) e dalla moda grossolana (da 2 a $50 \mu m$). La moda di accumulazione deriva dall'aerosol primario, dalla condensazione di gas (principalmente formati da composti organici, solfati e nitrati) e dalla coagulazione di piccole particelle. Inoltre, l'andamento mostra due sub-mode: la condensazione, cioè il prodotto di emissioni primarie o la crescita di particelle per condensazione/coagulazione di vapore, e il gocciolamento, che viene a formarsi dalla moda di accumulazione. La moda grossolana è caratterizzata da processi meccanici come erosione, frantumazione di particelle di maggiori dimensioni o immissione di spray marino in atmosfera.

In generale, è possibile riassumere la distribuzione dimensionale ed i principali meccanismi di formazione dell'aerosol come mostrato in Figura 1.2. La distribuzione dimensionale può dunque essere semplificata rappresentandola attraverso un modello trimodale. La moda di nucleazione è quella più piccola, ed è caratterizzata da aerosol ad elevata densità e, per questo, soggetto a facile coagulazione e condensazione entrando così nella moda di accumulazione. Quest'ultima moda presenta particelle coinvolte in trasporti a lungo raggio a causa del loro tempo di vita di qualche settimana. Infine, la moda grossolana, presenta polveri trasportate dal vento caratterizzate da veloce sedimentazione.

Un'altra importante classificazione, anch'essa direttamente collegata alle dimensioni delle particelle, va a distinguere due tipi di particelle: primarie e secondarie. L'aerosol primario viene emesso direttamente dalla sorgente in atmosfera da processi che possono

essere sia naturali che antropici. Le sorgenti di tipo naturale che generano il particolato di tipo primario principalmente sono dovute a processi di erosione, frantumazione di particelle di maggiori dimensioni ed immissione di spray marino. Le sorgenti antropiche possono essere identificate, ad esempio, da attività industriali o inquinamento urbano. Al contrario, l'aerosol secondario viene formato da processi di condensazione di gas presenti in atmosfera (il processo avviene quando i gas sono in condizioni di sovrasaturazione) o a causa di reazioni chimiche tra particelle primarie. Come già detto, la genesi di aerosol secondario avviene grazie alla presenza di gas precursori, quali NO_x , SO_x , agenti ossidanti come O_3 , OH^\cdot , NH_3 , composti organici volatili (VOCs) e idrocarburi [6].

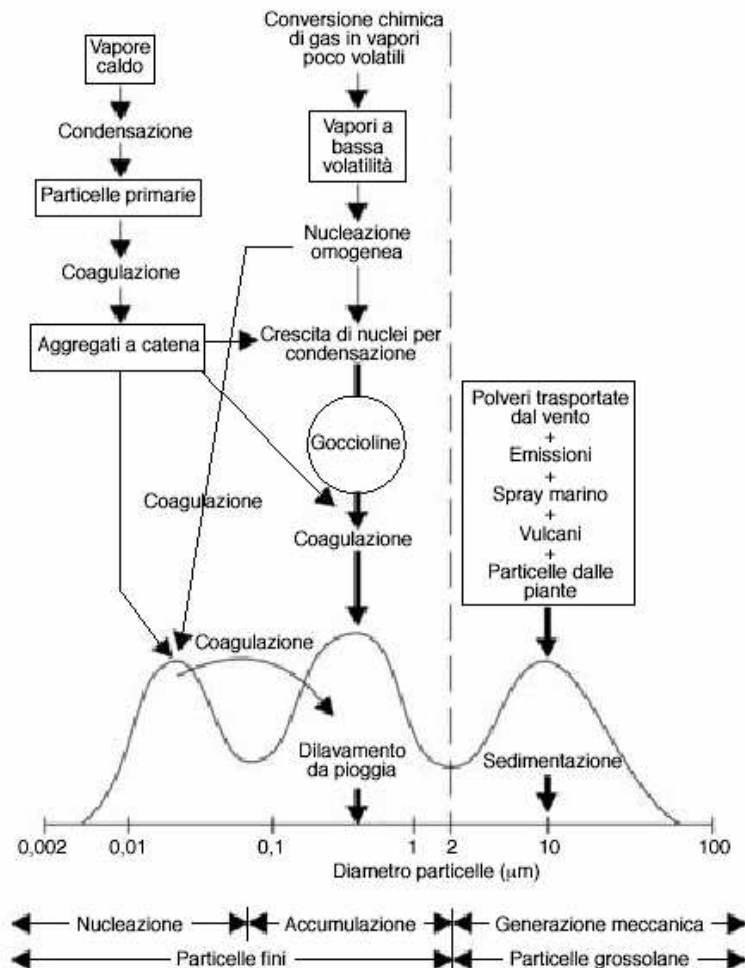


Figura 1.2: Distribuzione dimensionale, origine e reazioni chimico-fisiche delle particelle aerodisperse [5]

E' noto che il particolato atmosferico è costituito in maniera predominante da nitrati, ammonio, solfati, materiale cristallo, acqua, carbonio elementare e una grande varietà di composti organici, ma la loro concentrazione relativa in atmosfera dipende anche dal sito di analisi.

Dalla Figura 1.3 infatti si nota come la composizione del particolato dipenda dall'area di provenienza. La figura riporta la composizione del particolato totale in una generica area urbana e in un'area rurale italiana. Si presentano caratteristiche abbastanza simili, tranne che per il contenuto di solfati, carbonio elementare e composti organici [8].

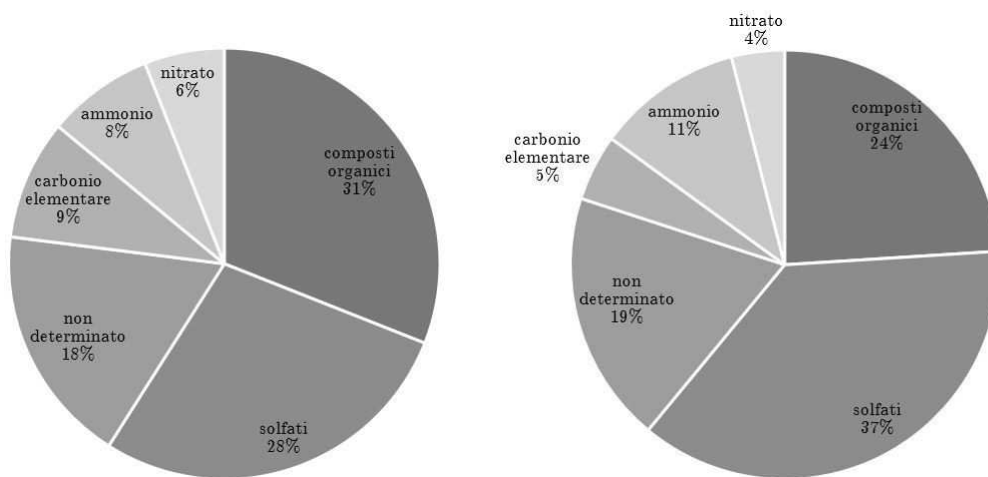


Figura 1.3: Composizione dell'aerosol atmosferico totale urbano (sinistra) e rurale (destra)

1.2 Aerosol organico

I composti organici esercitano un notevole e significativo impatto sulle proprietà delle particelle, essendo uno dei componenti più presenti in atmosfera. La frazione organica è formata da migliaia di composti organici di cui solo una porzione minima è stata caratterizzata. La composizione organica non è tutt'ora ben nota soprattutto perché l'interesse della ricerca scientifica si è concentrato sullo studio di inquinanti organici, importanti per la loro pericolosità, che però costituiscono una frazione minoritaria.

In generale, il particolato carbonioso presente in atmosfera è formato da una frazione organica (CO) ed una frazione che resiste all'ambiente ossidante fino ad una temperatura

di 400 °C, che prende il nome di carbonio elementare (CE). Tuttavia, se vengono prese in considerazione le proprietà ottiche la seconda frazione è chiamata *carbon black*, CB. Si possono comunque approssimare CE e CB racchiudendoli nella classe del carbonio elementare. Il CE strutturalmente è simile alla grafite (dunque di colore nero), è insolubile ed è emesso in particelle durante la combustione.

Al contrario del carbonio elementare, che costituisce gran parte dell'aerosol organico di origine primaria, il carbonio organico ha un'origine sia primaria che secondaria. L'aerosol organico di origine primaria è associato a composti quali alcani, acidi carbossilici e idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Generalmente può essere prodotto da processi di combustione sia antropici, come combustione di legname, emissioni da autoveicoli o da cotture alimentari, sia naturali, come incendi non dolosi. Di notevole importanza per l'identificazione dei processi di formazione dell'aerosol sono i cosiddetti "traccianti". Sono molecole organiche a basse concentrazioni in atmosfera, ma capaci di individuare l'origine del composto in esame. A titolo di esempio, per tracciare le emissioni degli autoveicoli si usano acidi dicarbossilici alifatici. L'aerosol organico secondario (SOA) invece è formato dall'ossidazione di composti organici volatili (VOCs) di derivazione antropica. Sebbene la ricerca scientifica si sia molto prodigata nello studio del ruolo dei precursori di origine antropica, negli ultimi due decenni numerosi studi ^[9] hanno approfondito la formazione di aerosol organici secondari dalla fotoossidazione di VOCs di origine naturale (Capitolo 2). Oltre alle identificazioni già elencate, è utile distinguere l'aerosol organico idrosolubile ed idrofobico. Quest'ultimo comprende il CE e la maggioranza dei composti organici ad alto peso molecolare, tra cui alcani, IPA o policlorobifenili (PCB). L'aerosol organico idrosolubile, studiato in questo lavoro di tesi, comprende composti di origine prevalentemente secondaria. Sono composti ossigenati, ossidrilati, carbossilati e carbonilati. Come si nota in Figura 1.4 (un esempio di specazione del particolato con diametro inferiore a 1 μm campionato nella valle del Po ^[10]) la composizione si presenta complessa: si può notare comunque come i componenti organici solubili e insolubili in acqua abbiano una notevole importanza, arrivando a coprire quasi il 25% dell'aerosol totale.

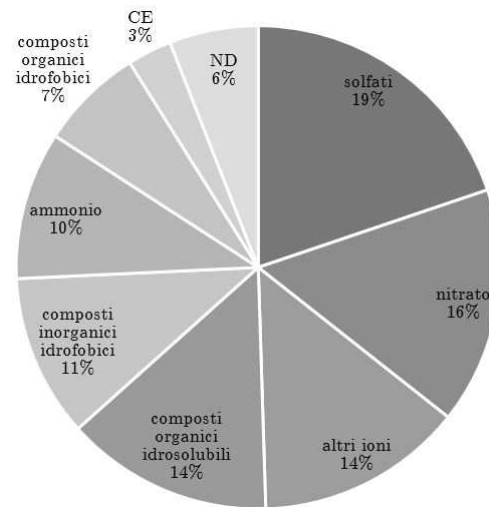


Figura 1.4: Bilancio chimico sugli elementi costituenti della massa dell'aerosol nella valle del Po

1.3 Processi in atmosfera dell'aerosol

L'aerosol diffonde nell'atmosfera in maniera diversificata a seconda delle proprie dimensioni, caratteristiche e delle condizioni meteorologiche. Le particelle sono trasportate principalmente dall'azione del vento (sia orizzontalmente che verticalmente), attraverso i processi di avvezione e convezione. Con il termine avvezione viene solitamente indicato il trasporto di aria da una zona ad un'altra, che può avvenire sia in superficie che in alte quote. La convezione è il movimento di aria calda verso l'alto, dove il tempo di permanenza delle particelle è elevato a causa del gradiente barico e dell'assenza di processi di rimozione.

Un fattore importante per i campionamenti a terra dell'aerosol consiste nella sedimentazione. Essa può essere secca, che trasferisce il particolato al suolo senza intervento dell'acqua presente in atmosfera, o umida, causata dall'intervento dell'acqua. Particelle fini ed ultrafini sono in grado di percorrere migliaia di Km e spesso ricadono al suolo per deposizione umida incorporandosi nelle goccioline d'acqua delle precipitazioni. Al contrario, l'aerosol grossolano difficilmente percorre grandi distanze, soprattutto a causa della massa delle particelle, depositandosi per gravità dopo poco tempo dall'emissione.

1.4 Effetti su clima, ecosistemi, materiali e salute umana

Il particolato atmosferico è in grado di assorbire o riflettere la radiazione solare in funzione della lunghezza d'onda: attraverso la formazione di nebbia, foschia e nubi a causa della presenza di particolato idrosolubile, la trasmissione della radiazione ultravioletta subisce una notevole attenuazione. Ad oggi, la ricerca scientifica non è ancora in grado di quantificare come il particolato atmosferico vada ad influire le condizioni climatiche globali o locali, soprattutto perchè la trasmissione della radiazione può variare nelle stesse aree geografiche, a seconda della stagione. Oltre agli effetti diretti appena descritti, l'aerosol può condizionare il clima in modo indiretto. Le particelle possono infatti costituire nuclei di condensazione per le nuvole, aumentandone la probabilità di formazione.

Come visto prima, il particolato è suscettibile a processi di deposizione secca o umida sul suolo o sulla vegetazione: questo è causa di interazione con gli ecosistemi. Ad esempio, la deposizione di nitrati sul suolo può avere ripercussioni anche nei sistemi acquatici: l'aumento incontrollato di NO_x può causare diminuzione della quantità di ossigeno generando eutrofizzazione.

La deposizione delle particelle può interessare inoltre la superficie fogliare della vegetazione ostacolando la luce solare ed interferendo così con la fotosintesi. Il processo di deposizione fogliare può inoltre sviluppare composti acidi e ossidanti, causando il danneggiamento dei tessuti vegetali. Questi processi risultano comunque difficilmente quantificabili.

L'effetto dell'aerosol che riguarda i materiali è largamente noto e riconosciuto: uno dei principali fattori inquinanti riguarda la deposizione secca di biossido di zolfo (un inquinante di origine antropica), in grado di esercitare azione corrosiva su calcare, marmo e cemento, convertendo la calcite (carbonato di calcio) in gesso (solfato di calcio diidrato). L'attività è legata alla concentrazione di SO_2 e dal contenuto acquoso del materiale interessato. Oltre ai processi corrosivi la deposizione di particelle inferiori ai $10 \mu\text{m}$ su materiali genera l'annerimento di tutte le superfici esposte, determinando danni al patrimonio artistico e architettonico.

L'effetto del particolato sulla salute è stato confermato da diversi studi epidemiologici i quali provano come l'esposizione all'aerosol atmosferico sia responsabile di conseguenze

negative sulla salute, come aumenti del tasso di malattie respiratorie e cardiovascolari, a seconda della durata dell'esposizione ^[11]. Le particelle di dimensioni inferiori a $10 \mu m$, chiamate anche particelle inalabili, hanno la capacità di depositarsi nell'apparato respiratorio, principalmente nel primo tratto delle vie aeree. Studi dimostrano ^[12] che le particelle ultrafini sono più tossiche rispetto alle grossolane: esse, infatti, avendo una grande area superficiale (fino a 3 ordini di grandezza maggiore rispetto a particelle grossolane) vanno ad incidere sulla tossicità relativa delle particelle sui sistemi respiratori acquisendo un'elevata efficienza di deposizione alveolare ^[13]. La tossicità dell'aerosol infine non dipende esclusivamente dalla distribuzione dimensionale, ma anche dalle caratteristiche chimiche, come la presenza di solfati, nitrati, sostanze ad elevata acidità e metalli pesanti in tracce.

Capitolo 2

Gli analiti

2.1 Prodotti di degradazione dell' α -pinene

Negli ultimi decenni la decomposizione di aerosol organico dovuto alla fotoossidazione in atmosfera ha assunto una notevole importanza ^[14]. La formazione di SOA viene tuttora studiata in maniera approfondita in numerosi studi sul campo e in laboratorio ed esiste un'ampia banca dati bibliografica sui principali prodotti di aerosol secondario organico. Recenti studi ^[15] dimostrano inoltre che, oltre a considerare gli ossidanti classici, vi è la necessità di studiare diverse nuove classi di composti, come esteri, perossidi o organosolfati. Questo al fine di comprendere in maniera dettagliata i processi chimici che portano alla formazione di SOA, nonché per prevedere i carichi di massa dell'aerosol.

Molti composti naturali organici volatili, come isoprene, monoterpeni e composti aromatici VOCs, sono precursori SOA: al seguito della loro emissione in atmosfera queste specie reagiscono con ossidanti atmosferici quali ozono, radicali ossidrilici e nitrati, formando prodotti volatili che subiscono la conversione gas-particella. I monoterpeni sono ritenuti contributori molto importanti per la produzione di SOA in quanto possiedono un alto potenziale di formazione di aerosol e sono emessi a livello globale in enormi quantità, soprattutto da foreste di tipo temperato, boreale e tropicale ^[16] ^[17]. Non è ancora chiaro invece se, come nel caso delle reazioni di VOCs in atmosfera, la degradazione dei monoterpeni sia influenzata dall'attività umana che induce cambiamenti nella composizione dell'atmosfera, in quanto, per i VOCs, un aumento dei livelli ossidanti aumenta la

produzione di SOA [18]. L'identificazione e la conseguente quantificazione dei prodotti di ossidazione di monoterpeni in atmosfera negli ultimi due decenni sta ricevendo una grande attenzione da parte della comunità scientifica: questo perchè sono i più abbondanti idrocarburi biogenici negli strati più bassi della troposfera. La degradazione atmosferica procede attraverso un meccanismo molto complesso che non è ancora completamente caratterizzato e che porta alla formazione di una vasta gamma di prodotti di reazione.

Nel 1987 negli USA fu sviluppato un inventario nazionale [19] delle emissioni degli idrocarburi biogenici combinando i dati di tassi di emissione di vari studi sul campo, algoritmi di emissioni sviluppati in laboratorio, densità di biomassa e temperatura. Si concluse che le emissioni sono distribuite maggiormente tra la vegetazione di latifoglie e conifere, con le colture agricole responsabili in modo marginale. Le emissioni totali da parte delle conifere sono state calcolate a 21.7 Ton/anno, mentre per le latifoglie a 8 Ton/anno. Nella totalità delle emissioni, l' α -pinene arriva a 6.6 Ton/anno, mentre le rimanenti sono dovute a vari monoterpeni, tra cui i più importanti sono l'isoprene e il β -pinene. In Figura 2.1 sono riportati gli isomeri dell' α -pinene, del β -pinene e l'isoprene.

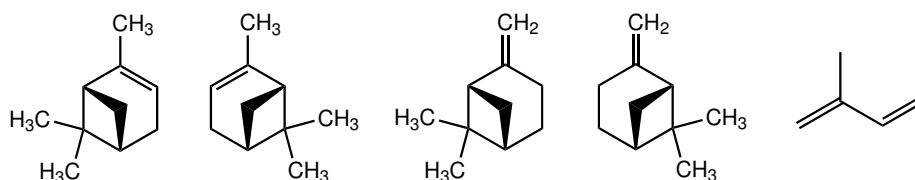


Figura 2.1: 1S-(-)- α -pinene, 1R-(+)- α -pinene, 1S-(-)- β -pinene, 1R-(+)- β -pinene ed isoprene

Lo studio delle proprietà degli isomeri non ha importanza in ambito ambientale: tuttavia la reattività di questi composti è profondamente studiata in ambito cosmetico ed alimentare, per la realizzazione del canfene, una molecola utilizzata in oli essenziali, profumi e come additivo negli alimenti.

Lamb et al. [19] riporta un confronto tra la reattività di α -pinene e β -pinene con NO ed NO₂, due ossidanti atmosferici molto comuni. Lo studio è stato condotto in una camera di reazione (*smog chamber*) in teflon, con un volume di 60 m³. La camera, riempita dapprima con una miscela di aria purificata, è divisa in due scomparti nei quali

vengono introdotti i gas reagenti, a concentrazione naturale, formando una miscela gassosa a concentrazione nota. Infine, l' α -pinene e il β -pinene sono iniettati tramite microsiringa in camere diverse, così da poter comparare le dinamiche di reazioni caratterizzate da identiche condizioni reattive. La camera successivamente viene esposta alla luce del sole. Come si nota in Figura 2.2, la degradazione fotoossidativa dell' α -pinene è evidente, mentre la concentrazione del β -pinene cala in maniera molto lieve. Si nota inoltre un innalzamento della concentrazione di NO_2 per entrambi i monoterpeni: questo perché la fotoossidazione implica l'espulsione del sottoprodotto NO_2 . A 120 minuti la concentrazione di NO_2 nella camera in cui vi è l' α -pinene comincia a diminuire quando si esaurisce l' NO : questo perché il biossido comincia a reagire con l' α -pinene.

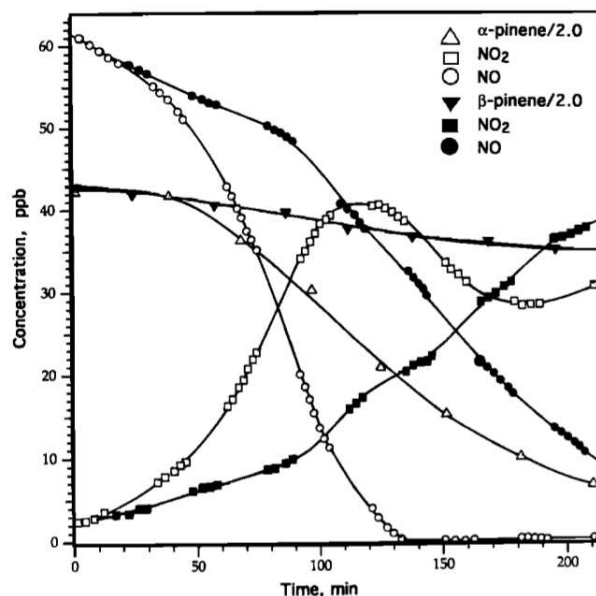


Figura 2.2: Processo di degradazione dell' α -pinene e del β -pinene in presenza di NO_x

E' noto che oltre agli NO_x esistano numerosi composti ossidanti capaci di interagire con i monoterpeni, quali, tra i più importanti, ozono e radicali $\text{OH}\cdot$. E' stato dimostrato che l'ozono va ad reagire in maniera molto più efficace con l' α -pinene, con una costante di velocità superiore di circa 5 volte rispetto al β -pinene. Al contrario, i radicali $\text{OH}\cdot$ reagiscono preferenzialmente con il β -pinene rispetto all' α -pinene, il quale possiede una costante di velocità inferiore circa del 30%. In definitiva, il tasso di fotoossidazione dell' α -pinene è sei

volte superiore rispetto al suo isomero alle stesse condizioni. L' α -pinene assume dunque un'importanza globale non trascurabile, soprattutto perchè ne viene stimata l'emissione globale in 125 Tg/anno [20]. Sebbene la fotoossidazione di isoprene con stesse condizioni sopracitate non produca SOA, la coesistenza con l' α -pinene aumenta la resa del 10% di aerosol organico rispetto alla sua assenza (Figura 2.3).

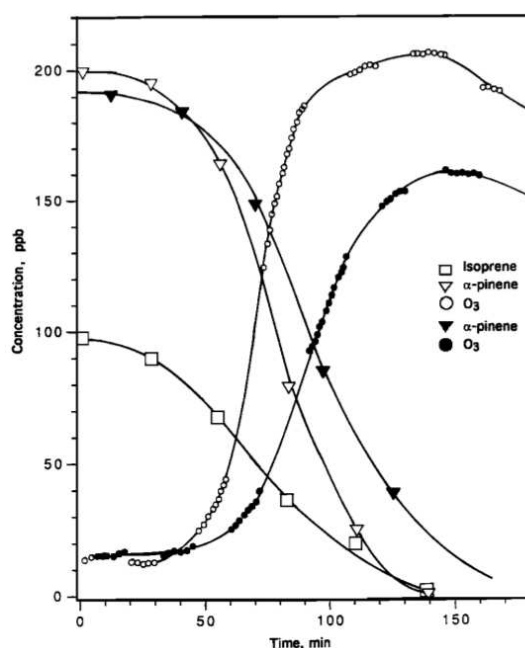


Figura 2.3: Effetti dell'isoprene per la fotoossidazione dell' α -pinene

Come precedentemente anticipato, il processo di degradazione dell' α -pinene non è completamente conosciuto, ma alcuni studi [21] identificano come prodotti principali di fotoossidazione (idrosolubili) l'acido pinico, l'acido pinonico, l'acido norpinico, l'acido norpinonico e pinonaldeide.

Un meccanismo semplificato di fotoossidazione da parte di O_3 in presenza di NO_x è stato proposto dallo studio di Lamb et al. [19], descritto in Figura 2.4. Esso prevede come prodotto finale la pinonaldeide, che vedremo essere un intermedio di reazione per altri meccanismi proposti.

Un altro meccanismo dettagliato [22] [23] consiste nella fotoossidazione da parte di radicali $OH\cdot$, in presenza di O_2 , NO_x , radicali perossidi e acqua. La reazione ha inizio

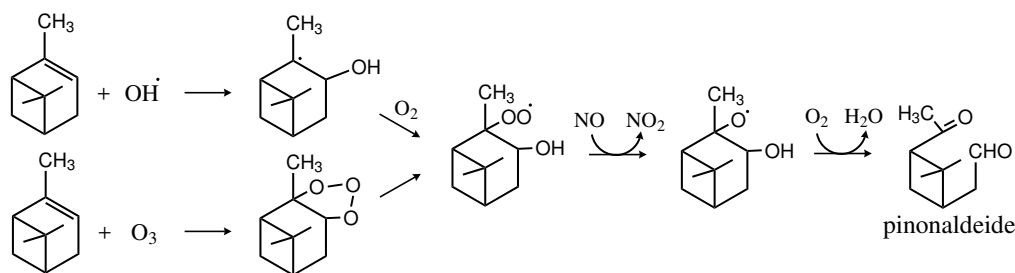
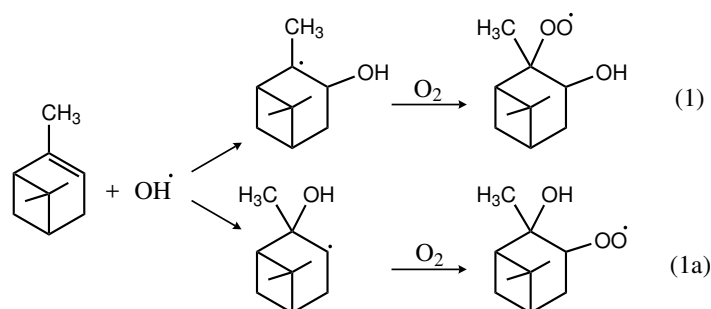
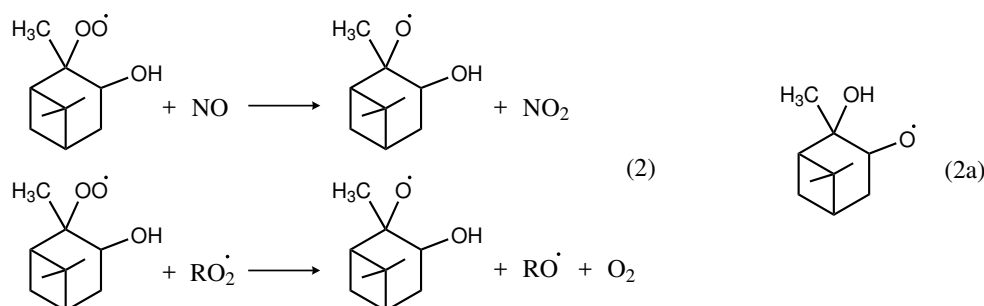


Figura 2.4: Meccanismo semplificato di fotoossidazione da parte di O_3 in presenza di NO_x

attraverso l'addizione al doppio legame del radicale $\text{OH}\cdot$, che provoca la formazione di due differenti β -idrossi alchil radicali che reagiscono rapidamente con l'ossigeno per formare due β -idrossi alchilperossi radicali (1) e (1a).

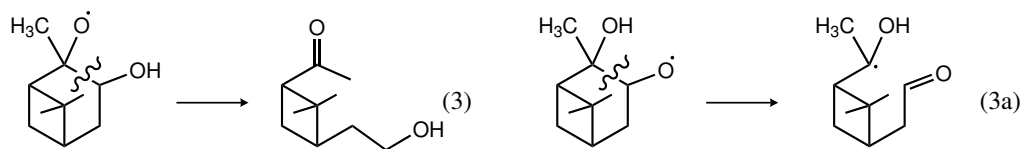


In presenza di NO o di elevate quantità di radicali alchilperossidi, i prodotti della reazione (1) e (1a) reagiscono velocemente producendo il β -idrossi alcossi radicale (2) e (2a). Per questo tipo di molecole ci possono essere tre possibili reazioni: decomposizione, isomerizzazione e reazione con ossigeno molecolare.

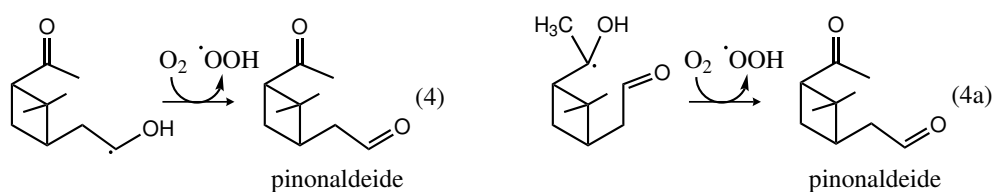


La reazione preferenziale è quella dell'apertura dell'anello, con conseguente formazione

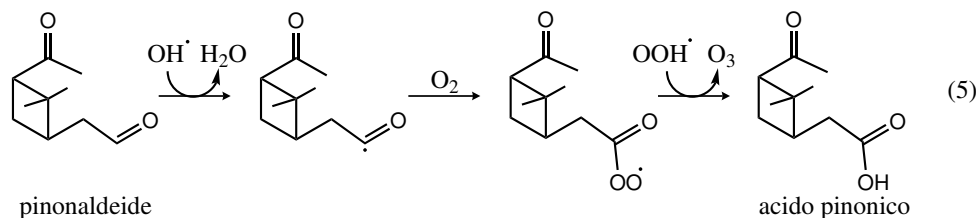
dell' α -idrossi alcossi radicale (3) e (3a).



A questo punto, per reazione con ossigeno molecolare, viene formata pinonaldeide (4) e (4a), considerato il principale intermedio stabile in fase gassosa.



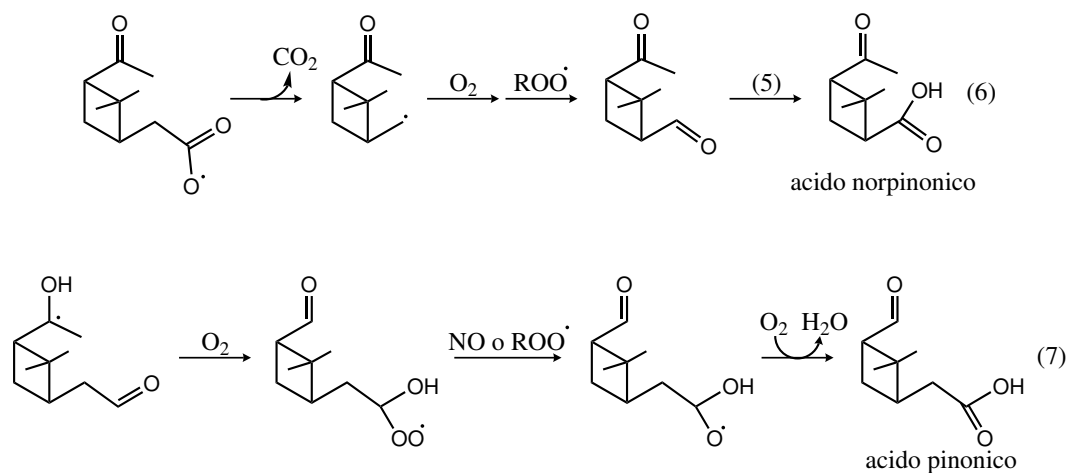
Il percorso reattivo può procedere portando alla formazione di acido pinonico, norpinonico e pinico, attraverso un primo step che prevede l'estrazione di un atomo di idrogeno dalla pinonaldeide. La reazione decorre attraverso la formazione di un radicale perossido per poi formare l'acido pinonico (5).



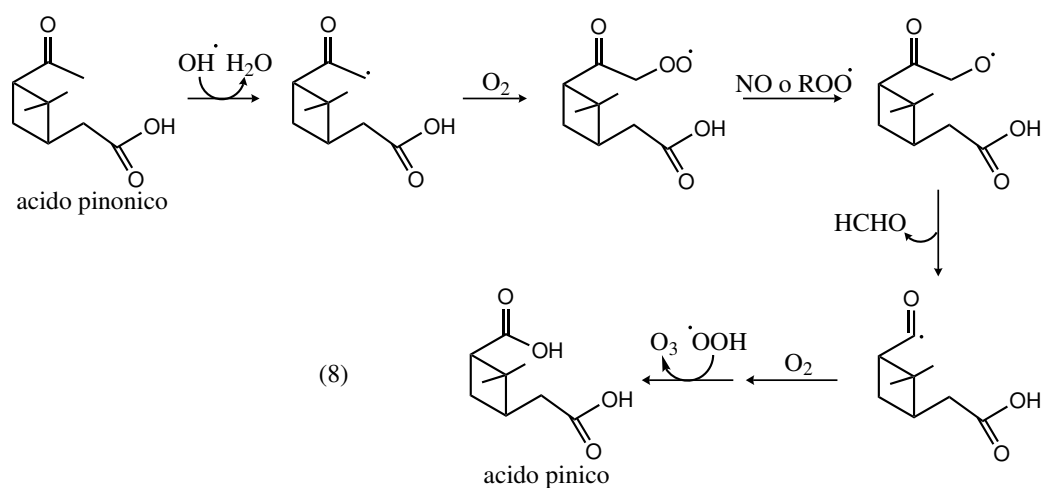
In alternativa, il terzo intermedio radicale della Reazione 5, l'acil perossi radicale, può essere ridotto nel corrispondente acilossi radicale, decarbossilato e trasformato nell'acido norpinonico (6) con meccanismo simile visto nella Reazione 5.

Può sussistere un meccanismo alternativo per la formazione di acido pinonico che interessa il prodotto della Reazione 3a, il quale decorre a radicale perossido, che subisce una doppia riduzione (7).

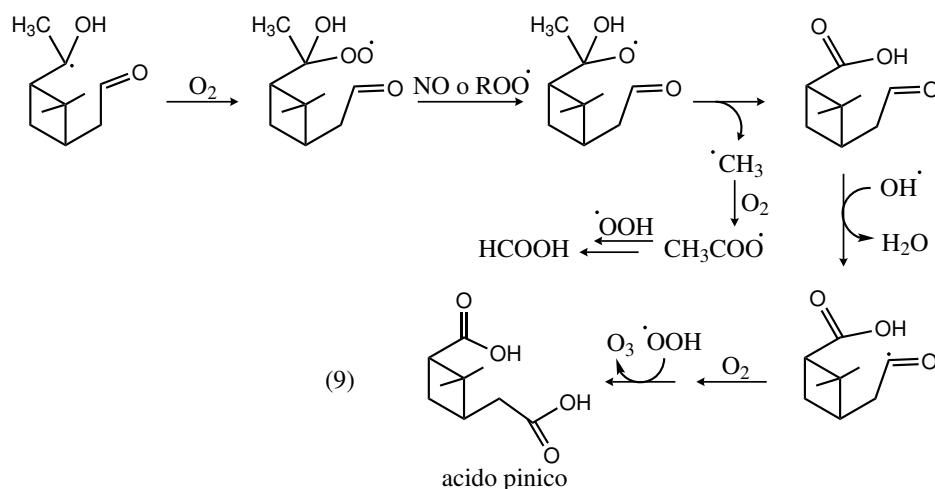
L'acido pinonico può inoltre procedere con la fotoossidazione (8) attraverso l'allontanamento di un atomo di idrogeno, seguito da l'addizione di ossigeno molecolare. Il risultante



α -carbonilperossi radicale, oltre a subire una serie di reazioni radicaliche formando una vasta gamma di sottoprodotti, può essere ridotto da riducenti atmosferici, formando il l'oro-radical. Esso decompone eliminando formaldeide decorrendo in processi reattivi simili alla Reazione 6.



Tuttavia, è stato proposto un altro percorso reattivo per la formazione di acido pinico (9). Infatti, l' α -idrossi alcossi radicale, prodotto della Reazione 3a, può decorrere a α -idrossi oxo radicale, che elimina un radicale metile. Attraverso processi redox si arriva al prodotto finale.



I radicali metili espulsi reagiscono rapidamente con l'ossigeno molecolare per formare il metilperossi radicale e successivamente la formaldeide. Le reazioni appena descritte non spiegano però la presenza di acido norpinico (Figura 2.5) nel SOA: la molecola deriva probabilmente da meccanismi fotoossidativi derivanti dall'acido norpinico.

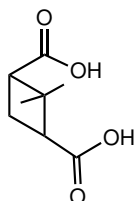
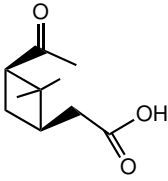
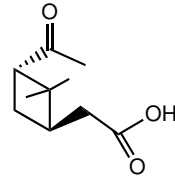
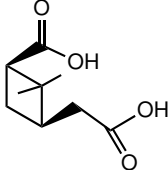
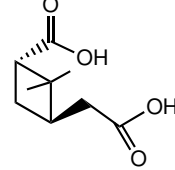


Figura 2.5: Acido norpinico

A causa della non reperibilità in commercio degli acidi norpinonico, norpinico e della pinonaldeide, nel presente lavoro di tesi sono stati usati come *markers* dell' α -pinene l'acido pinico come racemo (Santa Cruz Biotechnology[®]) e l'acido cis-pinonico (Sigma Aldrich[®]) (Tabella 2.1).

Oltre ai composti ossidati appena descritti, esistono una molteplicità di prodotti sia gassosi che in fase aerosol derivanti dalla degradazione di α -pinene: essi assumono un'importanza trascurabile, in quanto contribuiscono in maniera marginale alla totalità di aerosol organico secondario.

Tabella 2.1: Composto, peso molecolare, formula bruta e isomeri dei *markers* in esame

Composto	PM	Formula bruta	Isomero cis	Isomero trans
Acido pinonico	184,23	C ₁₀ H ₁₆ O ₃		
Acido pinico	186,21	C ₉ H ₁₄ O ₄		

2.2 Amminoacidi

Gli amminoacidi sono molecole organiche che nella struttura recano sia il gruppo funzionale carbossilico (-COOH) sia quello amminico (-NH₂). Hanno nomi comuni, in alcuni casi derivati dalla fonte da cui sono stati isolati per la prima volta. Ad esempio, l'asparagina fu trovata per la prima volta negli asparagi, il glutammato nel glutine del grano e la tirosina fu isolata dal formaggio (il suo nome deriva dal greco *tyròs*, formaggio). Gli amminoacidi più comuni sono 20 e sono presenti nelle proteine: essi differiscono l'uno dall'altro per la catena laterale R, dove essa stessa si differenzia per struttura, dimensioni e carica. Essendo l'atomo di carbonio un centro chirale, i quattro gruppi sostituenti possono disporsi nello spazio in due modi diversi, formando quindi due differenti enantiomeri.

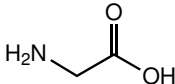
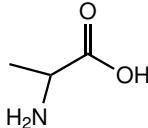
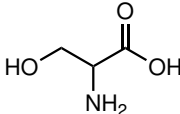
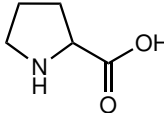
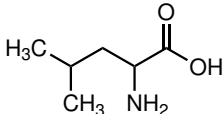
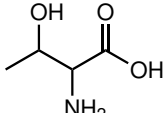
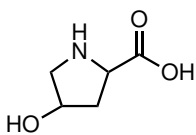
La configurazione assoluta di zuccheri ed amminoacidi semplici viene definita con il sistema D e L, una convenzione proposta da Emil Fischer, basata sulla configurazione assoluta della gliceraldeide, uno zucchero a tre atomi di carbonio. E' noto che gli amminoacidi nelle molecole proteiche sono tutti stereoisomeri L, con gli amminoacidi D presenti in pochi peptidi, compresi alcuni della parete cellulare di batteri e in qualche peptide con funzione di antibiotico [24].

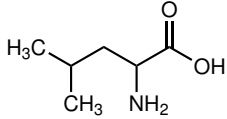
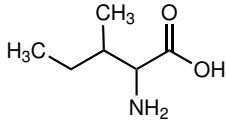
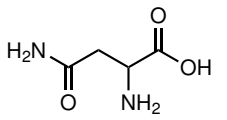
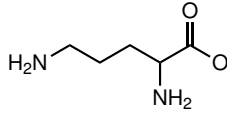
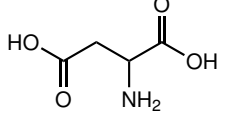
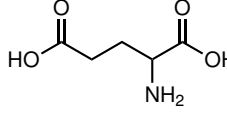
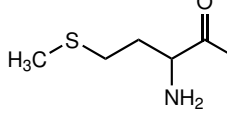
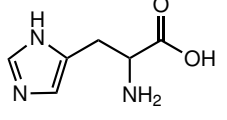
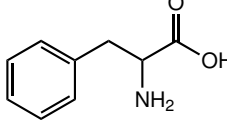
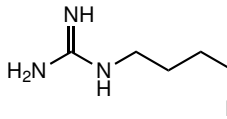
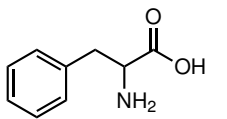
In natura, tuttavia, sono stati scoperti più di 500 amminoacidi che non fanno parte dei peptidi ed inoltre svolgono ruoli diversi. Essendo macromolecole costituenti gli organismi viventi ed avendo una bassa tensione di vapore, sono uno dei più significativi composti azotati organici presenti in atmosfera. Questo è confermato da recenti studi [25] che han-

no dimostrato che l'azoto organico varia dal 20% all'80% dell'azoto totale presente nelle particelle di aerosol e viene rilevato anche nelle deposizioni secche e nelle precipitazioni.

In Tabella 2.2 sono riportati gli amminoacidi analizzati nel presente lavoro di tesi.

Tabella 2.2: Composto, simbolo, peso molecolare e struttura degli amminoacidi in esame

Composto	Simbolo	PM	Struttura
Glicina	Gly	75,07	
Alanina	Ala	89,09	
Serina	Ser	105,09	
Prolina	Pro	115,13	
Valina	Val	117,15	
Treonina	Thr	119,12	
<i>t</i> -4-Idrossiprolina	4-Hyp	131,13	

Composto	Simbolo	PM	Struttura
Leucina	Leu	131,17	
Isoleucina	Ile	131,17	
Asparagina	Asn	132,12	
Ornitina	Orn	132,16	
Acido aspartico	Asp	133,1	
Acido glutammico	Glu	147,13	
Metionina	Met	149,21	
Istidina	Hys	155,16	
Fenilalanina	Phe	165,19	
Arginina	Arg	174,2	
Tirosina	Tyr	181,19	

Gli amminoacidi possono essere presenti come enantiomeri L o D (non per la glicina, per la quale il gruppo R è un atomo di idrogeno: questo fa perdere la chiralità alla molecola). In atmosfera gli L-amminoacidi sono i più comuni, ma vi è una presenza non trascurabile di D-amminoacidi, solitamente dovuti alla presenza di batteri [26]. Tuttavia, sebbene nella superficie del mare la concentrazione degli enantiomeri D degli amminoacidi è relativamente alta a causa dell'attività batterica nel *microlayer*, la presenza nel particolato di questa forma enantiomerica è inferiore al 10 % della totale concentrazione del corrispondente amminoacido. Il largo eccesso di L-amminoacidi indica una significativa porzione di amminoacidi derivanti da sorgenti primarie. E' comunque probabile che la rottura di bolle sulla superficie della acqua marina (spray marino) favorisca l'immissione in atmosfera di amminoacidi L e D rispettivamente derivanti dal fitoplancton e dai batteri presenti nel microlayer.

I primi studi di azoto organico disciolto sono stati effettuati in pioggia e neve nel 1950 [27] [28] ma la conoscenza è aumentata negli ultimi anni, in quanto questi composti sono una fonte molto importante di nutrienti per gli ecosistemi marini ed influenzano la chimica in atmosfera e la qualità dell'aria [29]. Essi sono una componente importante del WSOC (*water soluble organic carbon*) e influenzano il ciclo atmosferico dell'acqua, la radiazione atmosferica, l'igroscopicità delle particelle e tutta la chimica atmosferica [30] [31]. I composti amminoacidici, inoltre, vengono coinvolti nella formazione di nuvole [32].

Gli amminoacidi in fase particolata possono essere prodotti da una molteplicità di fonti diverse: ad esempio, glicina, treonina, serina, fenilalanina e prolina sono rilasciate durante le eruzioni vulcaniche, mentre alanina, acido aspartico, glutammina e la stessa glicina sono state ritrovate nel fumo di sigaretta.

Gli amminoacidi inoltre sono sottoposti a molte trasformazioni in atmosfera, ma i meccanismi non sono completamente conosciuti. Si conosce tuttavia il processo di degradazione atmosferico della metionina, la quale si trasforma a metionina solfossido [33]. Istidina e tirosina, invece, vengono ossidate dal radicale ossidrilico e dall'ossigeno molecolare. In fase acquosa cisteina e tirosina risultano essere molto reattive con O_3 , mentre i composti a minor reattività in acqua sembrano essere glicina e acido glutammico. Sempre in fase acquosa, la serina può reagire con $OH\cdot$ formando NH_4^+ , mentre per reazione con

O_3 può formare NO_3^- . Il gruppo R laterale di amminoacidi come arginina, lisina, prolina e treonina può essere ossidato da reazioni che coinvolgono ioni metallici, con produzione di semialdeidi o derivati idrossilati. Anche gli amminoacidi che posseggono un gruppo aromatico possono essere ossidati a derivati idrossilati.

In generale, gli amminoacidi degradano in atmosfera attraverso una combinazione di fotoreazioni dirette (assorbimento di luce seguita dalla reazione) e fotoreazioni indirette (foto-formazione di intermedi reattivi seguita dalla reazione con gli amminoacidi) [31].

A seconda del pH e della matrice in cui sono dispersi, gli amminoacidi possono assumere la forma neutra o quella zwitterionica, cioè una molecola nel suo complesso elettricamente neutra che però presenta sia cariche positive sia negative localizzate. L'amminoacido dunque risulterà contemporaneamente ionizzato negativamente all'estremità acida e positivamente all'estremità amminica. In Figura 2.6 è riportata la forma neutra dell'alanina e la sua forma zwitterionica.

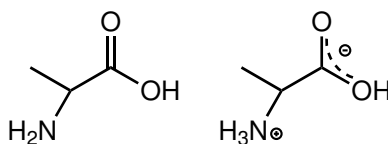


Figura 2.6: Forma non ionizzata e ionizzata dell'alanina

Per quanto riguarda le concentrazioni in atmosfera, studi nella laguna di Venezia riportano concentrazioni di amminoacidi in media di 334 pmol/m^3 [34], molto più alte rispetto ad aree dell'Oceano Pacifico nord-occidentale ($10,7 \text{ pmol/m}^3$) [35] e dell'Oceano Atlantico meridionale (20 pmol/m^3) [29].

Studi più recenti [36] [37] riportano concentrazioni di FAA (*free amino acids*) molto basse nell'ambiente artico (Isole Sbalvard), in media di 0.1 ng/m^3 , mentre nell'ambiente urbano di Roma si attestano in $0.1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$, superiore di circa 3 ordini di grandezza.

2.3 Metossifenoli

I metossifenoli (PC, *phenolic compounds*) sono composti organici polari e idrosolubili caratterizzati da un anello fenolico con uno o più sostituenti metossilici ($-OCH_3$) ed a

seconda della singola struttura molecolare sono semivolatili, fotosensibili e reattivi in atmosfera. Essi assumono rilevanza nello studio dell'inquinamento atmosferico che riguarda la combustione di biomassa. Con biomassa si indica generalmente un insieme di organismi animali o vegetali presenti in una certa quantità in un dato ambiente come quello acquatico o terrestre ed influisce sulla qualità dell'aria, sulla salute umana e sui cambiamenti climatici globali. La biomassa generalmente è costituita per il 75 % da carboidrati, contenuti in cellulosa ed emicellulosa, mentre per il restante 25 % da lignina. Dalla combustione della cellulosa si origina il levoglucosan che viene utilizzato come *markers* di *biomass burning* [48] [49], mentre dalla combustione della lignina derivano i metossifenoli. La lignina, costituente del legno, è formata da unità scheletriche date da molecole fenilpropaniche legate a vari siti in modo tridimensionale e complesso. La lignina, in tutti i vegetali, lega e compatta tra loro le fibre per conferire resistenza della pianta. Essa è sintetizzata attraverso la deidrogenazione enzimatica polimerica a partire da 3 alcoli [38], riportanti in Figura 2.7.

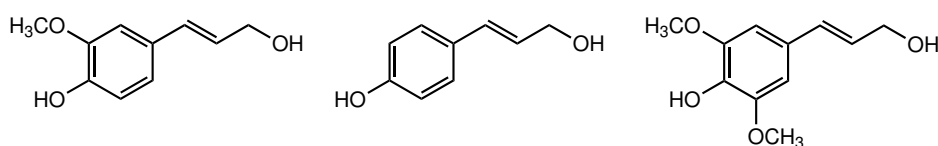


Figura 2.7: Alcool coniferilico, alcool p-cumarilico ed alcool sinapilico

A seconda della quantità e tipologia di monomeri presenti nel polimero, vengono definiti tre tipi di lignina [38]:

- lignina *softwood*: è costituita principalmente da alcool coniferilico e in maniera minoritaria da alcool p-cumarilico. E' presente nelle gimnosperme, cioè un gruppo di piante vascolari (Tracheobionta) che producono semi non protetti da un ovario (conifere)
- lignina *hardwood*: formata maggiormente da alcool coniferilico e alcool sinapilico. Appartengono a questa categoria le angiosperme, cioè piante evolute con fiore e seme protetto (alberi a foglie)
- lignina erbacea: costituita principalmente dall'alcool p-cumarilico (piante erbacee)

Solitamente il polimero della lignina viene estratto per essere usato come tracciante di piante vascolari, come indicatore TOM (*terrestrial organic matter*) in matrici acquose e per lo studio del paleoclima o paleovegetazione [47].

L'ossidazione o la pirolisi (combustione) della lignina da origine ai metossifenoli, composti aldeidici, chetonici o acidi. Nella Tabella 2.3 sono riportati i metossifenoli studiati nel presente lavoro di tesi.

Tuttavia, la combustione non è l'unica via di formazione dei metossifenoli, che possono essere originati per via fotochimica [39], per degradazione ad opera di batteri e funghi [40] [41], per la presenza di *bacterioplankton* (con *bacterioplankton* viene definita la totalità della componente batterica presente in acqua nelle diverse profondità) o da altri batteri che si nutrono di *fitoplankton* (insieme degli organismi autotrofi fotosintetizzanti presenti nel plancton, ovvero da quegli organismi in grado di sintetizzare sostanza organica) [42] [43].

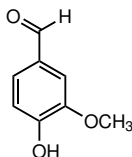
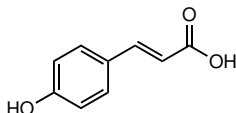
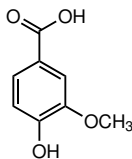
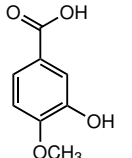
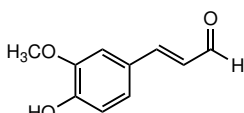
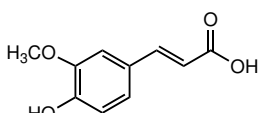
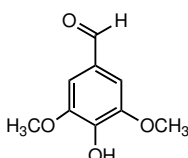
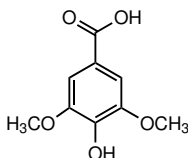
La lignina viene degradata da batteri in condizioni aerobiche attraverso enzimi extracellulari, quali attinomiceti (batteri filamentosi appartenenti al raggruppamento dei batteri Gram-positivi) [44]. Tuttavia, maggiormente responsabili della degradazione sono i funghi, principalmente *white rot*, che svolgono un'attività intensa, rispetto a *brown rot* e *soft rot*, meno attivi (la classificazione viene effettuata a seconda del colore che causa la degradazione) [45] [46].

Un'efficace rappresentazione dei metossifenoli viene effettuata tramite quattro gruppi:

- fenoli siringici, indicati con la lettera **S** e dati dalla somma di acido siringico, siringaldeide e acetosiringone
- fenoli vanillici, indicati con la lettera **V** e dati da acido vanillico ed omovanillico, vanillina ed acetovanillone
- fenoli cinnamici, (**C**), dati dall'acido p-cumarico e ferulico
- sommatoria totale, indicata con \wedge_8 , che si riferisce alla somma degli otto metossifenoli sopracitati

La degradazione di *softwood*, essendo formato in maniera predominante da alcool coniferillico, produce principalmente fenoli vanillici (vanillina, acido vanillico ed omova-

Tabella 2.3: Composto, simbolo, peso molecolare e struttura dei metossifenoli in esame

Composto	Simbolo	PM	Struttura
Vanillina	VAH	152,15	
Acido p-cumarico	PA	164,16	
Acido vanillico	VA	168,15	
Acido isovanillico	IVA	168,15	
Coniferil aldeide	CAH	178,18	
Acido ferulico	FA	179,22	
Siringaldeide	SYAH	182,17	
Acido siringico	SYA	198,17	

nillico ed acetovanillone) [48]. I fenoli vanillici sono prodotti anche dalla degradazione dell'*hardwood*, formato da alcool coniferilico e sinapilico, che da anche fenoli siringici (acido siringico, siringaldeide ed acetosiringone) [49]. I fenoli cinnamici infine (acido ferulico e p-cumarico) sono associati prevalentemente alle piante erbacee [50]. Oltre a dipendere dall'origine della degradazione, la distribuzione dei PC in atmosfera dipende fortemente anche dalle condizioni atmosferiche, quali temperatura, umidità, ecc.

L'origine della combustione viene indicata dai rapporti tra le varie sommatorie indicate in seguito:

- S/V indica il contributo relativo di angiosperme o gimnosperme, se maggiore di 1 denota la prevalenza di latifoglie
- C/V indica il contributo relativo dei tessuti erbacei, più alto è il rapporto, maggiore è la presenza di lignina erbacea e minore è quella di *softwood* ed *hardwood*

Inoltre, i rapporti tra acidi e rispettive aldeidi indicano invece il grado di ossidazione del sistema:

$$\left(\frac{Ad}{Al}\right)_v \quad \left(\frac{Ad}{Al}\right)_s$$

dove il primo indica il rapporto acido vanillico/vanillina, mentre il secondo acido siringico/siringaldeide. Un approccio di questo tipo viene impiegato per valutare i metossifenoli come indicatori *POM*, cioè materiale organico particolato di origine terrigena. A partire da campioni di fiumi e di sedimenti marini si ricavano informazioni sulla vegetazione locale e sul clima [51].

In atmosfera i metossifenoli liberi vengono studiati come traccianti per il *biomass burning*, cioè per la combustione della biomassa, in particolare per la lignina [52]. Questo perchè il *biomass burning* è una delle più importanti sorgenti di materia organica nell'atmosfera ed influenza l'assorbimento e la dispersione della radiazione solare. I metossifenoli vengono emessi in forma gassosa, condensando poi sulla superficie dell'aerosol pre-esistente in ambiente atmosferico. Generalmente sono inquinanti a lungo raggio, anche se si trovano a concentrazione maggiore vicino alla fonte di emissione [53].

Infine, i metossifenoli vengono impiegati nell'industria farmaceutica, alimentare, chimica e nella cosmesi. Sono impiegati inoltre come analgesici e per la cura di patologie respiratorie, oltre che per la sintesi di profumi, fragranze ed aromi ^[54].

Capitolo 3

Lo strumento

Lo strumento impiegato per l'analisi nel lavoro di tesi è un cromatografo liquido ad alte prestazioni (HPLC) Agilent 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germania) accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Applied Biosystem API 4000 (Biosystem/MDS SCIEX Concord, Ontario, Canada).

La cromatografia liquida è una tecnica separativa efficace che necessita di un dispositivo atto alla separazione degli analiti: in questo lavoro di tesi è stato usato uno spettrometro di massa che impiega come analizzatore un triplo quadrupolo. Il principale vantaggio nell'utilizzo di uno spettrometro di massa come rivelatore, rispetto ad altri tipi di rilevazione cromatografica (spettrometro UV, fluorimetro, etc), consiste nella sensibilità e nella specificità della risposta, poichè ogni analita viene rivelato in base al rapporto massa/carica (m/z) degli ioni generati. Nel caso di composti cromatograficamente non completamente risolti, lo spettrometro di massa porta all'identificazione ed alla quantificazione degli analiti, purchè non isobari (ioni con stesso rapporto m/z ma diversa composizione atomica) ^[55].

3.1 *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è una tecnica separativa basata sulla ripartizione dei composti, contenuti nel campione, tra la fase mobile e quella stazionaria. La caratteristica principale della cromatografia liquida è la capacità di separare miscele di

composti non volatili, ad alto peso molecolare ed eventualmente termolabili, riuscendo a discriminare analiti polari o apolari, ionici o neutri, ma necessariamente solubili nella fase mobile liquida.

Le prime cromatografie liquide venivano eseguite in colonne di vetro con diametro minimo di 50 *mm* e lunghezza fino a 5 *m*, impaccate con particelle solide di diametro minimo pari a 150 μm rivestite di un liquido adsorbito al solido che fungeva da fase stazionaria. I tempi di separazione erano molto lunghi ed i tentativi di accelerare la separazione applicando una pressione non andarono a buon fine perchè aumentando il flusso diminuivano il numero dei piatti teorici. La misura dell'efficienza infatti viene effettuata attraverso l'altezza del piatto teorico (H) ed il numero dei piatti teorici (N). I due termini sono così correlati:

$$N = \frac{L}{H}$$

dove L è la lunghezza e N il numero dei piatti. L'efficienza aumenta man mano che N cresce o quanto H diminuisce. Lo studio che sviluppò questi concetti ^[56] trattò una colonna come se fosse una colonna di distillazione: in corrispondenza di ciascun piatto si suppose che si instaurasse l'equilibrio tra fase stazionaria e mobile. Successivamente si implementò lo studio attraverso la teoria della velocità, che continua comunque ad usare i termini sviluppati dalla teoria dei piatti teorici. La teoria della velocità descrive le forme e le ampiezze delle bande cromatografiche in termini quantitativi basati su un meccanismo di scorrimento casuale che regola la migrazione delle molecole attraverso una colonna. In generale, l'efficienza delle colonne cromatografiche può essere approssimata mediante l'espressione:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_s u + C_M u$$

in cui u è la velocità lineare della fase mobile, A è il coefficiente che descrive gli effetti del percorso multiplo e C_s e C_M sono rispettivamente i coefficienti di trasferimento di massa della fase stazionaria e mobile. Sapendo che C_M è direttamente correlato al quadrato del diametro delle particelle che formano l'impaccamento, al diminuire delle dimensioni delle particelle, l'efficienza della colonna aumenta.

Solo alla fine degli anni '60 si sviluppò la tecnologia in grado produrre particelle aventi diametro compreso tra 3 e 10 μm e tale tecnologia ha richiesto strumenti in grado di operare a pressioni elevate.

Attualmente una fase stazionaria è solitamente costituita da particelle solide impaccate, di granulometria molto fine (tra 1.8 e 10 μm), alloggiata all'interno di una colonna formata da un tubo in acciaio di calibro sottile, adatta a sopportare le alte pressioni di esercizio che possono raggiungere i 300 bar nei sistemi convenzionali, ma anche i 1000 bar nei nuovi UPLC, una cromatografia che utilizza particelle con dimensione di 1.7 μm sino a 5 μm .

La fase mobile occupa gli spazi aperti tra le particelle dell'impaccamento: opera in condizioni di alta pressione e a temperature che variano tra 20 °C e 80 °C. La velocità del flusso resta costante e compresa tra 50 $\mu L/min$ e 5 mL/min , in base al diametro della colonna cromatografica ed al sistema di interfaccia dello spettrometro di massa.

Le componenti principali, riportate in Figura 3.1, del cromatografo liquido HPLC Agilent Serie 1100 utilizzato per questo lavoro di tesi sono:

- serbatoi per i solventi, che costituiscono la fase mobile: un solvente acquoso ed uno organico
- pompa binaria e degaser, utilizzato per l'eliminazione di eventuali bolle formate all'interno del sistema HPLC
- *autosampler*
- pannello di controllo
- vano a temperatura costante che contiene la colonna cromatografica
- eventuale detector se non si utilizza la modalità ifenata HPLC-MS/MS

In generale, il tipo più diffuso di HPLC è quella di ripartizione a fase legata, nella quale la fase stazionaria è formata da un rivestimento legato grazie ad un legame chimico ad un supporto in gel di silice o con struttura polimerica, formando impaccamenti ad alta stabilità insolubili nella fase mobile. Dalla colonna allo spettrometro di massa gli analiti sono trasportanti tramite un tubo in *peek*, un materiale termoplastico con elevate caratteristiche meccaniche e con basso coefficiente d'attrito.

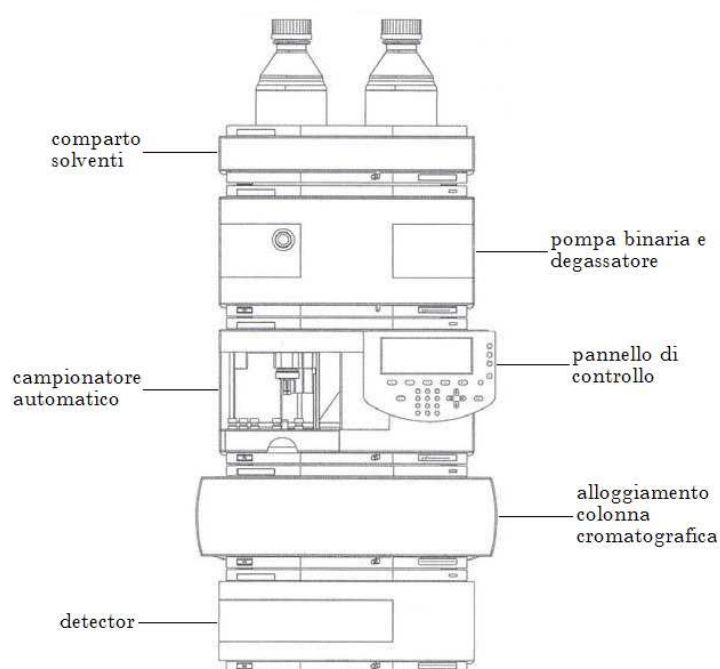


Figura 3.1: Schema dell'HPLC Agilent Serie 1100

3.1.1 Cromatografia a fase inversa

La cromatografia viene definita a fase inversa quando il rivestimento legato al substrato ha un carattere non polare. E' stato calcolato che più di tre quarti di tutte le separazioni in HPLC vengono effettuate in colonne con impaccamenti a fase inversa [57]. I principali vantaggi sono che si può usare l'acqua come fase mobile e, con fasi stazionarie non polari, il trasferimento di massa risulta più rapido. Al contrario, la cromatografia a fase diretta è caratterizzata da un rivestimento che contiene gruppi funzionali polari. Le analisi eseguite per la determinazione dei *markers* dell' α -pinene e dei metossifenoli utilizzano un sistema cromatografico a fase inversa (*RPC - reverse phase chromatography*). In Figura 3.2 a pag. 39 è riportata la fase stazionaria della colonna *Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) Extend-C18* utilizzata per l'analisi.

La colonna incorpora un sistema brevettato costituito da gruppi organosilani bidentati con catene C_{18} legati chimicamente a microsfele porose di silice. I due atomi di Silicio inoltre presentano un ponte propilenico ed una protezione per proteggere il substrato.

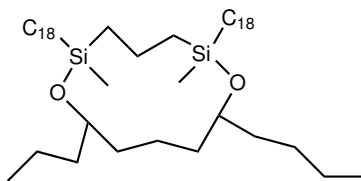


Figura 3.2: Fase stazionaria della colonna Agilent ZORBAX Extend-C18

3.1.2 Separazione cromatografica enantioselettiva

La cromatografia enantioselettiva è la tecnica cromatografica utilizzata nel presente lavoro di tesi per la determinazione degli amminoacidi e consente di separare coppie di enantiomeri. E' noto che essi hanno proprietà fisiche e chimiche identiche, ma vengono riconosciuti in modo differente dai sistemi biologici. La tecnica si divide principalmente in due metodi, definiti come:

- metodo diretto, basato sulla derivatizzazione antecedente all'eluizione per dar luogo ad una coppia di diasterisomeri separati dunque con fasi stazionarie non chirali
- metodo indiretto, utilizzo di una colonna con fase stazionaria chirale, in modo da formare specie diasterisomeriche transienti in colonna

Il grande vantaggio del metodo indiretto è che non si va a manipolare la matrice in esame attraverso reazioni preventive che potrebbero dar luogo a importanti contaminazioni, falsando il risultato finale. Motivo per il quale la cromatografia chirale a metodo indiretto è quella largamente più usata, anche se il metodo diretto risulta essere agevole quando le matrici sono molto complesse.

Il metodo indiretto dunque si basa su selettori chirali legati alla fase stazionaria, i quali formano addotti diasterisomerici non covalenti con l'analita ed il suo enantiomero. Essi, essendo diasterisomeri, assumono proprietà chimico-fisiche diverse: questo si traduce in un diverso tempo di ritenzione in colonna.

Per la quantificazione di L e D-amminoacidi è stata usata la colonna CHIROBIOTIC TAG (Astec, Sigma Aldrich[®]), caratterizzata da una catena glicopeptidica macrociclica (teicoplanina aglicone) legata attraverso molteplici legami covalenti al substrato siliceo.

In Figura 3.3 è riportato il gruppo funzionale attivo contenuto nella fase stazionaria della colonna: essa presenta otto centri chirali e quattro cavità evidenziate dalle lettere A, B, C e D.

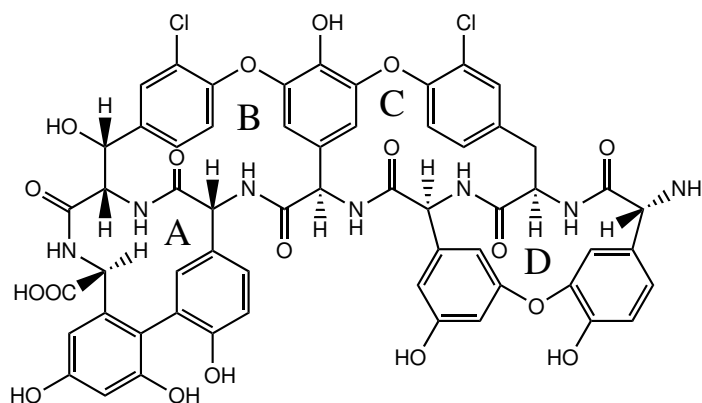


Figura 3.3: Struttura del glicopeptide macrociclico teicoplanina aglicone che costituisce la fase stazionaria della colonna Astec CHIROBIOTIC TAG

3.2 Spettrometro di massa

La spettrometria di massa è, forse, tra tutte le metodologie analitiche disponibili, quella di più vasta applicazione. Le più importanti applicazioni della spettrometria di massa vanno a fornire la composizione elementare dei campioni in una sostanza e i rapporti isotopici degli analiti di interesse, dare la composizione quali-quantitativa di miscele complesse e descrivere la composizione di superfici solide (attraverso l'utilizzo di particolari sorgenti *FAB* o *MALDI*). Le principali componenti di uno spettrometro di massa (Figura 3.4) sono la sorgente, in cui vi è la formazione di ioni di analita gassosi, l'analizzatore, che separa gli ioni in base al rapporto m/z , il detector e il sistema di pompaggio di vuoto. Per questo lavoro di tesi, è stato usato uno spettrometro di massa API 4000 con sorgente TURBO VTM (sorgente ESI) e analizzatore a triplo quadrupolo (QqQ).

3.2.1 Interfaccia LC/MS e sorgente

L'accoppiamento tra un cromatografo liquido e l'analizzatore necessita di una sorgente capace di ionizzare gli analiti e rimuovere completamente l'eluente attraverso un'interfac-

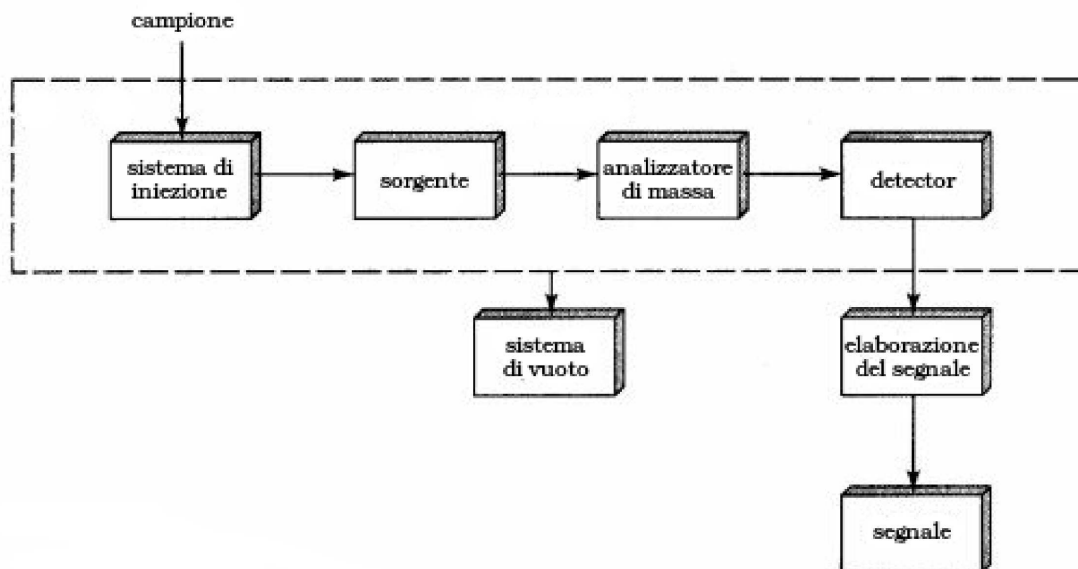


Figura 3.4: Schema a blocchi di uno spettrometro di massa

cia tale da preservare il vuoto di 10^5 - 10^6 Torr caratteristico dell'analizzatore. I sistemi più diffusi nell'accoppiamento HPLC-MS sono le sorgenti ESI (*ElectroSpray Ionization*), APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e PPI (*Photometric Pressure Ionization*): queste sono definite sorgenti API (*Atmospheric Pressure Ionization*).

Per il presente lavoro di tesi è stata utilizzata la sorgente ESI, che permette lo studio di composti ionici polari. La sorgente tratta analiti che sono dunque già ioni o che sono facilmente ionizzabili. La soluzione in arrivo dalla colonna cromatografica attraversa un capillare, viene caricata da un potenziale elettrico (formando il cosiddetto "cono di Taylor") e nebulizzata grazie ad un gas ausiliario. La desolvatazione, favorita dallo stesso gas ausiliario e dalla temperatura della sorgente, porta ad un aumento di densità di carica superficiale fino al raggiungimento del "limite di Rayleigh". Lo spray di goccioline cariche è attirato da un potenziale opposto applicato al *curtain plate* che permette agli ioni carichi di entrare all'interno dell'analizzatore.

Come riportato in Figura 3.5, questo meccanismo si ripete a cascata portando alla formazione di ioni desolvatati in fase gassosa, i quali possono avere carica unitaria o multipla.

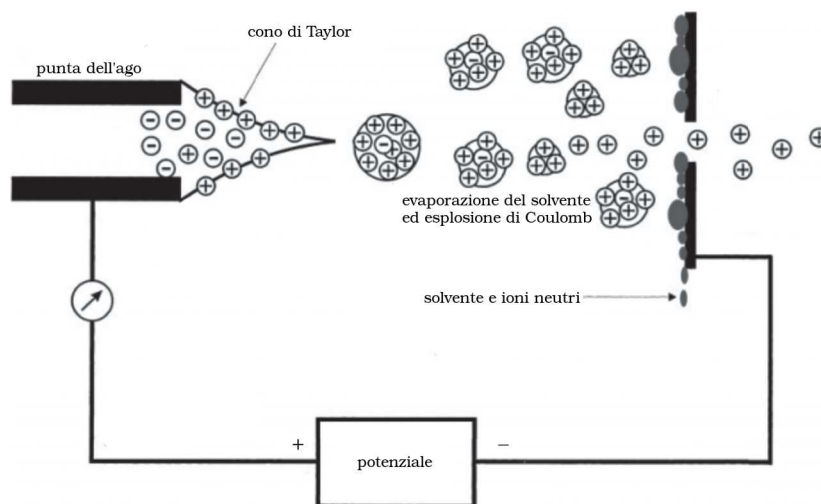


Figura 3.5: Schema della sorgente ESI

Nella sorgente Turbo V^{TM} utilizzata per questo lavoro di tesi (Figura 3.6) sono presenti due getti *turbo heaters* che immettono in sorgente gas riscaldato, con angolazione di 45° , allo scopo di accelerare l'evaporazione del solvente. I due getti assicurano corrette condizioni di lavoro fin ad un flusso di $2 \text{ mL}/\text{min}$, mentre in assenza del turbo gas la velocità di flusso può raggiungere valori massimi di $10 \mu\text{L}/\text{min}$.

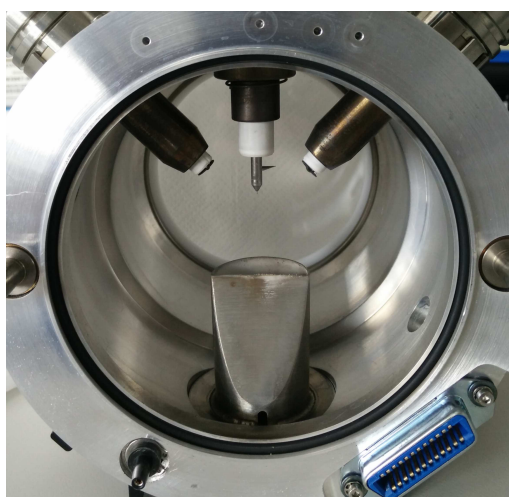


Figura 3.6: Sorgente Turbo V^{TM}

La sorgente utilizzata inoltre presenta il capillare posto perpendicolarmente rispetto all'ingresso del *curtain plate*. Questo favorisce l'eliminazione degli ioni neutri che tenderanno a non essere attratti dal potenziale dei piatti. Oltre al *curtain plate* sono presenti altre due piastre, chiamate *orifice plate* e *skimmer cone*. Dotate di fori al loro centro sempre più piccoli, hanno il compito di convogliare gli ioni e mantenere il vuoto nell'analizzatore.

3.2.2 Analizzatore

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QqQ) è costituito, in realtà, da quattro quadrupoli. Oltre alla presenza dei convogliatori di ioni *curtain plate*, *orifice plate* ed *skimmer cone*, inizialmente è posizionato un quadrupolo (Q0) che provvede unicamente alla focalizzazione degli ioni. Successivamente sono posti due analizzatori quadrupolari (Q1 e Q3) e la cella di collisione (Q2), posta fra loro come mostrato in Figura 3.7 a pag. 44.

Gli analizzatori Q1 e Q3 operano a $\Delta m = 1$ (Δm fornisce la differenza di m/z tra due picchi visibili), cioè costante in tutto lo spettro. L'analizzatore a quadrupolo dunque, come analizzatori *ion trap* o TOF, variano la loro risoluzione variando la massa. Infatti, essendo la risoluzione pari a:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

a m/z 400 si avrà risoluzione 400, mentre a m/z 1000 si avrà risoluzione 1000, in modo tale da avere in tutto lo spettro $\Delta m = 1$. Al contrario, gli analizzatori di tipo magnetico lavorano a risoluzione costante, cambiando Δm in funzione di m/z .

Q2 costituisce, invece, la cella di collisione, una regione ad alte pressioni (con valori massimi di $8 \cdot 10^{-3}$ Torr) in cui avviene la frammentazione degli ioni per collisione di una molecola gassosa neutra (N_2 o Ar).

Le più importanti applicazioni del sistema MS/MS vertono nei processi di quantificazione. Infatti, il sistema massa tandem, attraverso l'uso della cella di collisione, frammenta lo ione selezionato dal Q1, per poi andare ad analizzare i frammenti generati con il Q3. Esistono diverse modalità di lavoro del triplo quadrupolo. Le più semplici vedono lo stru-

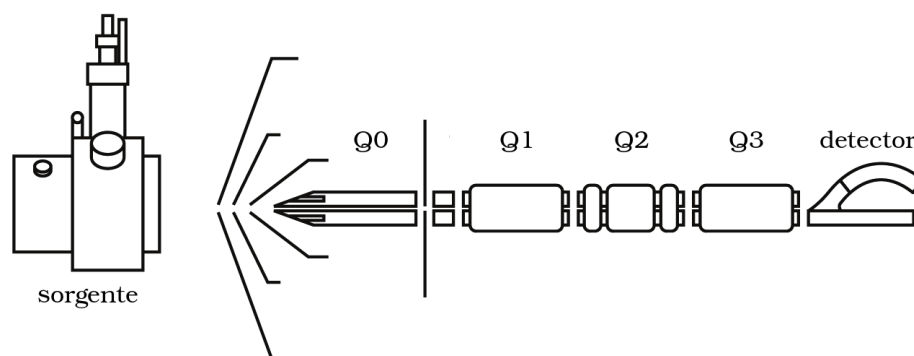


Figura 3.7: Analizzatore e schema a blocchi dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo

mento utilizzato in *full scan*, dove il Q1 esegue una scansione di tutti i rapporti m/z o in *SIM*, in cui il Q1 seleziona un singolo rapporto m/z . In entrambi i casi cella di collisione e Q3 vengono spenti. Altre sono:

- *product ion scan*: il quadrupolo Q1 seleziona, attraverso la modalità SIM, uno ione, il quale viene frammentato in Q2. I frammenti gerati vengono analizzati in *full scan* dal Q3
- *multiple reaction monitoring*: in Q1 si ha la selezione degli ioni di interesse analitico (*SIM*). Il Q3 lavora in *SIM* isolando esclusivamente alcuni ioni prodotti dalla frammentazione dello ione avvenuta in Q2. Questa metodologia è la più utilizzata in chimica analitica quantitativa in virtù delle sue caratteristiche selettività e sensibilità
- *precursor ion scan*: il primo quadrupolo lavora in *full scan*, mentre il Q3 seleziona un frammento generato nella cella di collisione Q2 (modalità *SIM*)
- *constant neutral loss scan*: in questo caso entrambi i quadrupoli lavorano in modalità *full scan*. Si opera però con un *offset* di massa costante tra loro e, fissata una differenza a , quando gli ioni vengono selezionati dal Q1 e frammentati dal Q2, si ha rivelazione solo nel caso i cui si ha formazione di uno ione $m - a$.

Detector

Il detector, è costituito da un elettromoltiplicatore CEM (*channel electron multiplier*) composto da un dispositivo a dinodo continuo. Gli ioni in arrivo dal Q3, sono convogliati da un sistema di lenti focalizzatrici e indirizzati al detector. Come si vede in Figura 3.8, l'analizzatore ha una struttura cilindrica curva: quando uno ione collide la superficie del cilindro, si ha il rilascio in numerosi elettroni, che andranno ad essere moltiplicati in numero a causa delle successive collisioni con le pareti.

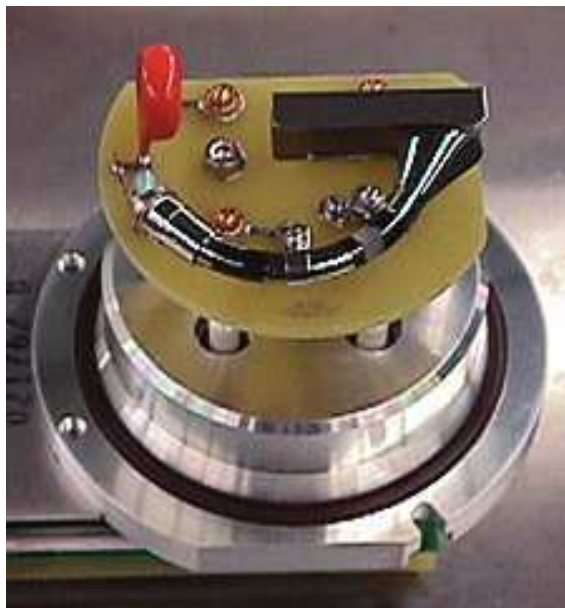


Figura 3.8: Elettromoltiplicatore CEM

Per effetto del gradiente di potenziale presente, gli ioni sono convogliati verso l'uscita del cono, dove il segnale elettrico viene tradotto in segnale digitale, fornendo il conteggio degli ioni in relazione alla loro massa.

Capitolo 4

Aspetti teorici del metodo analitico

La metodologia, o procedura analitica, è l'insieme delle operazioni preanalitiche e strumentali. La procedura per la scelta del metodo consiste nella definizione degli obiettivi dell'analisi e nella scelta della tecnica analitica strumentale. Successivamente viene individuata la procedura più adatta alla preparazione del campione (preanalitica) e le migliori condizioni operative dello strumento di analisi.

E' molto importante inoltre la raccolta bibliografica di dati pregressi, relativi a studi simili, per impostare e strutturare l'indagine. Una volta determinati gli obiettivi, si procede all'acquisto di materiali, solventi e reagenti.

4.1 Metodo strumentale

L'obiettivo è lo sviluppo di un metodo strumentale che permetta allo spettrometro di massa di identificare gli analiti in uscita dal cromatografo. Vengono dunque iniettati direttamente in sorgente soluzioni standard di analita e analita marcato isotopicamente (o in alternativa uno standard interno), per infusione diretta mediante siringa *Syringe Pump Model 11*. A seconda dell'informazione bibliografica acquisita e delle caratteristiche chimiche degli analiti, vengono scelte sorgenti di ionizzazione a disposizione. Inizialmente viene individuato lo ione precursore tramite *full scan* in Q1. Per ciascun ione precursore vengono ottimizzati i potenziali DP ed EP (il *declustering potential* controlla il voltaggio dell'*orifice plate*, mentre *entrance potential* controlla il potenziale in Q0 con il compito di

focalizzare gli ioni). Successivamente si procede attraverso la modalità *product ion scan*: vengono selezionati gli ioni precursori in Q1 (che lavora in modalità *SIM*) e frammentati nella cella di collisione Q2. Il quadrupolo Q3 opera in *full scan*, andando a visualizzare i frammenti prodotti. Infine si ottimizzano CE e CXP (il *collision energy* governa l'energia di collisione in Q2 fornita agli ioni selezionati in Q1, mentre il *cell exit potential*, applicato all'uscita della cella di collisione, ottimizza focalizzazione ed accelerazione dei frammenti).

4.2 Metodo cromatografico

E' opportuno confrontare le capacità di separazione di diverse colonne a disposizione e individuare quella che, sulla base delle caratteristiche della fase stazionaria, presenta la migliore separazione dei picchi cromatografici. Si procede con la scelta della composizione della fase mobile (se in modalità fase inversa, una fase sarà di tipo organico, mentre la seconda acquosa) al fine di ottenere una separazione soddisfacente dei picchi, in un tempo di separazione solitamente non superiore a 40 minuti. La corsa cromatografica inoltre dovrà contenere una fase di pulizia.

Allo scopo di aumentare il segnale del picco, vengono ottimizzate le condizioni della sorgente attraverso il settaggio dei parametri *Gas1* e *Gas2*, la temperatura della camera e l'IS (*ion spray voltage*, cioè il potenziale imposto all'ago della sorgente ESI).

4.3 Preanalitica

Una volta definita la tecnica strumentale, si deve trasformare il campione in modo tale da poterlo utilizzare con la strumentazione scelta. Spesso la fase preanalitica prevede la preconcentrazione del campione e, solo se necessaria, la purificazione. I metodi più frequenti di estrazione sono le estrazioni liquido/liquido o liquido/solido (Sohxlet, ultrasuoni, microonde, ecc) e prevedono il trasferimento dell'analita dalla matrice ambientale ad una più adatta alla determinazione strumentale. In questo lavoro di tesi, la procedura preanalitica consiste nell'estrazione solido/liquido in acqua ultrapura, tramite ultrasuoni, di campioni di aerosol raccolti su piatti in alluminio e filtri in quarzo QFF.

4.4 Validazione del metodo

Generalmente i parametri per la valutazione di un metodo analitico sono:

- selettività: capacità di un metodo analitico di determinare univocamente l'analita di interesse
- limite di rilevabilità del metodo (MDL): consiste nella più bassa concentrazione dell'analita in esame che può essere rilevata sperimentalmente. L'MDL viene definito come il triplo dello scarto quadratico medio determinato sul segnale del bianco S_B (σ_B si riferisce alla deviazione standard del bianco):

$$MDL = 3\sigma_B$$

- limite di quantificazione del metodo (MQL): consiste nella più bassa concentrazione dell'analita in esame che può essere quantificata sperimentalmente. L'MQL è definito come 10 volte la deviazione standard del segnale del bianco medio S_B :

$$MQL = 10\sigma_B$$

- limiti di rilevabilità e quantificazione strumentale (LOD_S e LOQ_S): minima concentrazione di analita che lo strumento è in grado rispettivamente di rilevare o di quantificare. Viene generalmente calcolato sulla base del segnale prodotto da soluzioni standard degli analiti. Si discostano nettamente da MDL ed MQL, perchè LOD e LOQ si riferiscono esclusivamente all'ultima fase analitica, quella strumentale. Sono calcolati come 3 volte (per il LOD) e 10 volte (per il LOQ) il rapporto tra l'area del rumore di fondo nel cromatogramma e l'area del picco dell'analita moltiplicati per la concentrazione dell'analita:

$$LOD_S = 3 \cdot \frac{A_{RCN}}{A_N} \quad LOQ_S = 10 \cdot \frac{A_{RCN}}{A_N}$$

- intervallo di linearità: è la proprietà di uno strumento di misura di dare in uscita valori che possano mettersi in relazione lineare con il segnale d'ingresso, all'interno di un determinato campo di validità. La proporzionalità è verificata attraverso il

calcolo del coefficiente di correlazione R^2 della curva di calibrazione. In questo lavoro di tesi è stata eseguita per mezzo di soluzioni standard. Generalmente sono accettati coefficienti di correlazione pari ad almeno 0.99

- precisione della misura: è il grado di dispersione di dati rilevati individualmente rispetto al valore medio della serie cui appartengono. Viene suddivisa tra ripetibilità (concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenute con identiche condizioni) e riproducibilità (concordanza tra risultati di prova, ottenuti con lo stesso metodo su materiali identici ma da laboratori ed operatori diversi)
- accuratezza: grado di concordanza tra il valore medio della concentrazione di analita e un valore di riferimento accettato
- sensibilità: è definita come la pendenza della curva di calibrazione in corrispondenza della concentrazione a cui si sta lavorando
- robustezza: capacità di un metodo di non essere influenzato significativamente per effetto di variazioni deliberatamente introdotte
- recupero: indica la quantità di analita determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità totale
- incertezza: esprime i parametri che caratterizzano un intervallo di valori attribuiti ad una misura

Non essendo disponibili in commercio dei supporti certificati di aerosol atmosferico vengono usati gli stessi substrati utilizzati nel campionamento, pretrattati nello stesso modo, ai quali sono aggiunte quantità note di soluzioni standard.

Capitolo 5

Campionamento

5.1 Sito di campionamento

I campioni analizzati per questo lavoro di tesi sono stati raccolti presso il Campus Scientifico dell'Università Ca' Foscari di Venezia, in via Torino, 155, Mestre-Venezia. In Figura 5.1 è evidenziato il punto di campionamento, situato nella sommità dell'Edificio Delta.



Figura 5.1: Sito di campionamento presso il Campus scientifico

La campagna di campionamento è stata condotta nei mesi di marzo, aprile e maggio 2016 utilizzando un impattore ad aspirazione multistadio 120 MOUDI™ II.

5.2 Campionatore

L'impattore ad aspirazione ^[58] usato in questo lavoro di tesi è dotato di un foro nella testata per consentire l'ingresso dell'aria e di undici stadi a cascata che lavorano sfruttando il principio della deposizione delle particelle su una superficie ad impatto. La superficie è costituita da un disco in alluminio del diametro di 56 *mm* ricavato dalla fustellatura di fogli di alluminio commerciali. Ogni stadio (Figura 5.2) è caratterizzato dalla presenza di ugelli perpendicolari alla superficie di impatto: le particelle con diametri superiori agli ugelli, attraverso il flusso della corrente d'aria all'interno del campionatore, si depositano e vengono campionate, mentre le particelle più piccole procederanno allo stadio successivo incontrando ugelli via via sempre più piccoli. In questo modo vengono progressivamente campionati particelle sempre più fini. Dopo l'undicesimo stadio, che trattiene particelle fino ad un diametro di 56 *nm*, il percorso delle particelle si conclude per opera di un filtro in quarzo, precedentemente muffolato, nel quale vengono trattenute le particelle con diametro inferiore ai 56 *nm*.

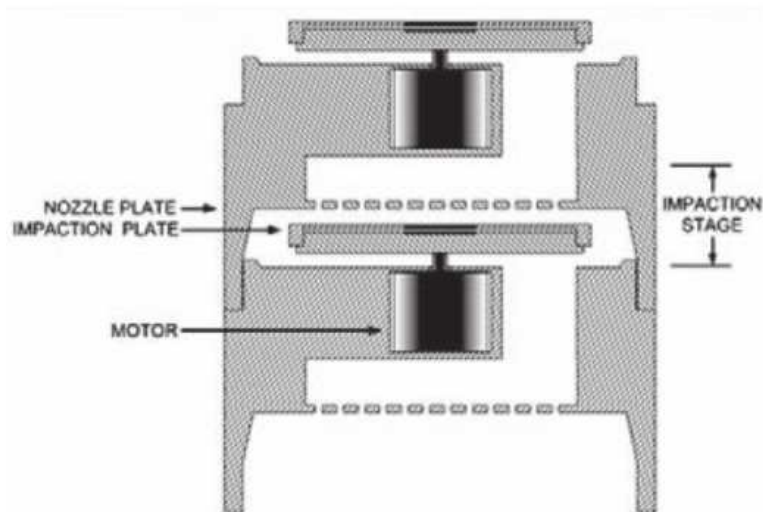


Figura 5.2: Rappresentazione di uno stadio

Il flusso di lavoro ottimale è di $30 L/min$ ed è garantito da una pompa ad aspirazione MODEL HCP5 - Copley Scientific ^[59]: essa contiene un motore in grado di generare un flusso massimo di $416 L/min$ regolabile attraverso una valvola allocata nel pannello di controllo. La pompa è dotata di due ingressi di aspirazione, uno a destra ed uno a sinistra, per facilitare il posizionamento del campionatore. Il raffreddamento viene effettuato tramite una ventola nella parte anteriore della pompa che richiama l'aria attraverso la griglia di ventilazione posta nel lato superiore. Due maniglie sono situate sulla sommità della pompa per il suo spostamento e posizionamento, come si vede in Figura 5.3.

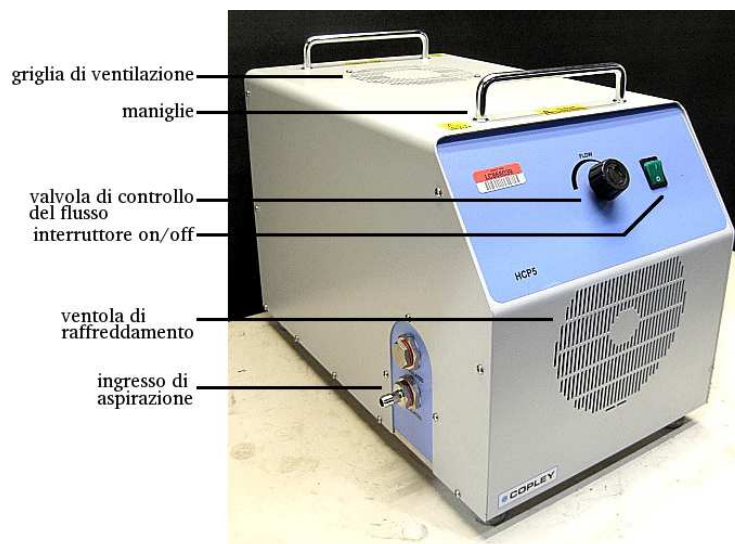


Figura 5.3: Pompa ad alta portata MODEL HCP5

L'impattore, inoltre, è caratterizzato dalla rotazione dei piatti di campionamento ad una velocità di $1 rpm$, con l'obiettivo di formare un deposito di particelle uniforme in ogni substrato (in Figura A.4, Appendice A, viene riportato come si presenta uno stadio dopo il campionamento). L'effetto principale è quello di aumentare la massa delle particelle depositate fino ad un fattore 1000 rispetto a strumenti non rotativi ^[60]. Il movimento di rotazione è generato da singoli motori che guidano i piatti in ogni stadio.

Quando l'impattore è assemblato e pronto per il campionamento, è da posizionarsi all'interno di un alloggiamento esterno, in grado di misurare costantemente la temperatura

di esercizio e 6 diverse pressioni in 6 diversi stadi. Questo per fornire un rapido mezzo per identificare problemi che possono derivare da un non corretto assemblaggio o dall'ostruzione degli ugelli. L'aumento di una o più pressioni monitorate in ogni stadio (con flusso costante), è un sintomo dell'ostruzione degli ugelli. Lungo l'impattore infatti il diametro dei fori diminuisce progressivamente, facendo aumentare la probabilità di occlusione.

Il campionatore, infine, posizionato nella sommità dell'Edificio Delta presso il Campus Scientifico dell'Università Ca'Foscari di Venezia, è coperto da un tetto per proteggere dalle precipitazioni le parti elettroniche, con aperture laterali per garantire il raffreddamento. In Tabella 5.1 è riportato, per ogni stadio, il diametro nominale delle particelle selezionate, il numero degli ugelli, il diametro dei fori e le pressioni di esercizio ottimali fornite dalla casa costruttrice. In Appedice A sono riportati i vari stadi del campionatore (Figura A.1 e Figura A.2), l'impattore assemblato e l'alloggiamento esterno (Figura A.3).

Tabella 5.1: Classificazione del diametro delle particelle selezionate, numero e ugelli e diametro dei fori per ogni stadio

Stadio	\varnothing nominale (μm)	n° ugelli	\varnothing fori (mm)	Pressione di rif. (kPa)
S1	18	1	17.15	98.0
S2	10	3	8.890	-
S3	5.6	10	3.800	-
S4	3.2	10	2.470	-
S5	1.8	20	1.370	-
S6	1.0	40	0.720	-
S7	0.56	80	0.410	94.9
S8	0.32	900	0.130	93.2
S9	0.18	900	0.100	88.0
S10	0.10	2000	0.055	76.2
S11	0.056	2000	0.052	57.2
filtro	-	-	-	-

L'andamento delle pressioni degli stadi viene continuamente monitorato attraverso un flussimetro ad area variabile prima e dopo il campionamento.

Capitolo 6

Messa a punto del metodo

6.1 Standard e materiali

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate soluzioni standard ottenute sciogliendo in acqua ultrapura o in metanolo ultra-gradiente (Romil LTD, Cambridge, UK) una quantità nota di sostanze ad elevato grado di purezza. Le soluzioni primarie per l'identificazione di *markers* dell' α -pinene, amminoacidi e metossifenoli sono state conservate in assenza di luce in cella frigorifera a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in appropriati contenitori inerti. I traccianti, ed il rispettivo standard interno, della fotoossidazione dell' α -pinene sono riportati in Tabella 6.1.

Tabella 6.1: Analita, n° CAS, casa fornitrice e purezza di acido cis-pinonico, acido pinico e marcato utilizzato

Standard	n° CAS	Fornitore	Purezza
acido cis-pinonico	61826-55-9	Sigma-Aldrich [®]	$\geq 98\%$
acido pinico	28664-02-0	Santa Cruz Biotechnology [®]	$\geq 98\%$
vanillina $^{13}\text{C}_6$	121-33-5	Sigma-Aldrich [®]	99%

In Tabella 6.2 sono elencati gli standard e relativi marchi usati per la quantificazione di L e D-amminoacidi e metossifenoli.

Tabella 6.2: Analita, n° CAS, casa fornitrice e purezza

Standard	n° CAS	Fornitore	Purezza
L-alanina	56-41-7	Sigma-Aldrich [®]	≥ 98%
L-arginina	74-79-3	"	≥ 98%
L-asparagina	70-47-3	"	≥ 98%
L-acido aspartico	56-84-8	"	≥ 98%
L-acido glutammico	56-86-0	"	≥ 99%
glicina	56-40-6	"	≥ 99%
<i>t</i> -4-Idrossi-L-prolina	51-35-4	"	≥ 98%
L-istidina	71-00-1	"	≥ 98%
L-leucina	61-90-5	"	≥ 98%
L-isoleucina	73-32-5	"	≥ 98%
L-metionina	63-68-3	"	≥ 98%
L-ornitina	3184-13-2	"	≥ 99%
L-fenilalanina	63-91-2	"	≥ 98%
L-prolina	147-85-3	"	≥ 99%
L-serina	56-45-1	"	≥ 99%
L-treonina	72-19-5	"	≥ 98%
L-tirosina	60-18-4	"	≥ 98%
L-valina	72-18-4	"	≥ 98%
D-alanina	338-69-2	Alfa Aesar [®]	99%
D-arginina	157-06-2	Sigma-Aldrich [®]	≥ 98%
D-asparagina	5794-24-1	Alfa Aesar [®]	99%
D-acido aspartico	1783-96-6	Alfa Aesar [®]	99%
D-acido glutammico	6893-26-1	Sigma-Aldrich [®]	≥ 99%
<i>t</i> -4-Idrossi-D-prolina	3398-22-9	"	97%
D-istidina	351-50-8	Alfa Aesar [®]	99%
D-leucina	328-38-1	Sigma-Aldrich [®]	99%
D-isoleucina	319-78-8	Alfa Aesar [®]	98%

Standard	n° CAS	Fornitore	Purezza
D-metionina	348-67-4	Alfa Aesar [®]	99%
D-ornitina	16682-12-5	Sigma-Aldrich [®]	98%
D-fenilalanina	673-06-3	Alfa Aesar [®]	99%
D-prolina	344-25-2	Sigma-Aldrich [®]	≥ 99%
D-serina	312-84-5	Alfa Aesar [®]	99%
D-treonina	632-20-2	"	98%
D-tirosina	556-02-5	Sigma-Aldrich [®]	99%
D-valina	640-68-6	Alfa Aesar [®]	98%
L-alanina ¹³ C ₃	100108-77-8	Sigma-Aldrich [®]	99%
L-arginina ¹³ C ₃	NA	"	95%
L-acido aspartico ¹³ C ₄	55443-54-4	"	95%
L-acido glutammico ¹³ C ₅	NA	"	95%
L-leucina ¹³ C	74292-94-7	CIL [®]	99%
L-fenilalanina ¹³ C ₃	NA	"	99%
L-prolina ¹³ C	NA	"	99%
L-valina ¹³ C	NA	"	99%
acido vanillico	121-34-6	Fluka [®]	≥ 97%
acido isovanillico	645-08-9	Sigma-Aldrich [®]	97%
vanillina	121-33-5	Sigma-Aldrich [®]	99%
acido siringico	530-57-4	Sigma-Aldrich [®]	≥ 95%
siringaldeide	134-96-3	Fluka [®]	≥ 97%
acido ferulico	537-98-4	Fluka [®]	≥ 99%
coniferli aldeide	458-36-6	Sigma-Aldrich [®]	98%
acido p-cumarico	501-98-4	Sigma-Aldrich [®]	≥ 98%
acido vanillico ¹³ C ₁	121-34-6	Sigma-Aldrich [®]	99%
vanillina ¹³ C ₆	121-33-5	Sigma-Aldrich [®]	99%

Come si nota dalla Tabella 6.1, il metodo sviluppato ha consentito l'utilizzo dello standard marcato della vanillina $^{13}\text{C}_6$ (usato per l'analisi di metossifenoli) anche per la quantificazione di acido pinico ed acido cis-pinonico.

In seguito sono elencati i solventi utilizzati per questo lavoro di tesi:

- acido cloridrico (HCl) al 37% (Carlo Erba)
- acido formico (CH_2O_2) (98%) (Fluka)
- acetonitrile ultragradiente (CH_3CN) (Romil LTD, Cambridge, UK)
- acqua ultrapura (18.2 $M\Omega$, 1ppb TOC) purificata tramite Cartuccia C18 LC-Pak[®]
- metanolo ultragradiente (CH_3OH) (Romil LTD, Cambridge, UK)

6.2 Metodologia analitica HPLC-ESI-MS/MS

Tutte le soluzioni preparate in questo lavoro di tesi sono state preparate partendo dall'analita in fase solida ad elevata purezza. Acido cis-pinonico ed acido pinico sono stati sciolti in acqua ultrapura. Le soluzioni di amminoacidi ed i relativi marcati, invece, sono state preparate sciogliendo il solido in una soluzione 0.1 M di HCl, ad eccezione di idrossiprolina ed asparagina che, essendo instabili in ambiente acido, sono state disciolte in acqua ultrapura. La soluzione acida viene usata per impedire agli amminoacidi di deprotonarsi, evitando così di compromettere l'analisi a causa della scarsa interazione con la fase stazionaria. Per quanto riguarda i metossifenoli la procedura prevede che la soluzione madre ad alte concentrazioni sia preparata usando come solvente il metanolo, nel quale gli analiti hanno una maggiore solubilità. Per ogni analita studiato dunque sono state preparate le soluzioni madri in un range di concentrazione che va da 850 mg/L a 1700 mg/L .

Le soluzioni madri di acido cis-pinonico ed acido pinico sono state diluite 1/1000 ed iniettate nella sorgente dello spettrometro di massa per infusione diretta al fine di andare a definire i migliori parametri strumentali necessari all'analisi. Per L e D-amminoacidi e metossifenoli questo non è stato necessario, perché l'ottimizzazione dei parametri dell'analizzatore e quelli cromatografici sono già stati sviluppati in studi precedenti [52] [61].

6.2.1 Sviluppo del metodo MRM

Lo scopo del metodo è quello di determinare e quantificare acido cis-pinonico ed acido pinico a livelli di tracce e sub-tracce. Come dimostrato da Parshintsev et al. [62], le caratteristiche della sorgente di tipo ESI in modalità negativa sono ideali per una sufficiente ionizzazione permettendo analisi in tracce per questo tipo di analiti. Lo sviluppo del metodo di acquisizione MRM per lo spettrometro di massa è stato eseguito mediante infusione diretta delle soluzioni standard ad una concentrazione di 1 mg/L (1 ppm) mediante una pompa a siringa Model 11 (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA) ad un flusso di $10 \text{ }\mu\text{L/min}$. Il primo passaggio dello sviluppo del metodo in spettrometria di massa prevede identificazione degli ioni precursori mediante analisi al Q1 in *full scan*. L'acquisizione dei dati è avvenuta con *dwell time* di 200 ms .

A titolo di esempio vengono presentati gli step dello sviluppo del metodo per l'acido cis-pinonico. In Figura 6.1 è riportato lo spettro di acquisizione *full scan* in Q1 dell'acido cis-pinonico da $m/z=100$ fino a $m/z=200$. Inoltre è riportata la centratura, operazione che si svolge dopo aver identificato lo ione precursore $[M - H]^-$ e che serve a rendere più risoluto lo spettro, identificando il valore di massa da utilizzare come ione precursore.

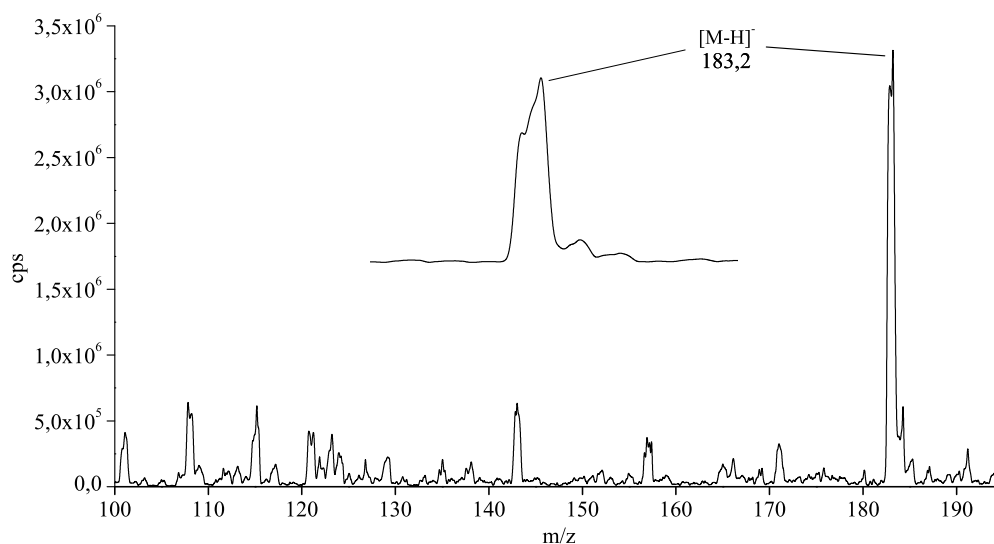


Figura 6.1: Spettro di massa in negativo dell'acido cis-pinonico acquisito nel primo quadrupolo in modalità *full scan* e centratura dello ione precursore $[M - H]^-$

Identificato lo ione precursore (che nel caso riportato equivale allo ione molecolare), si vanno a ottimizzare i potenziali DP ed EP. In Figura 6.2 sono riportate le rampe di potenziale scansionate dallo strumento. L'obiettivo di questa operazione è quella di identificare il valore di DP ed EP che portano ad avere la massima intensità di segnale. Mentre per il *declustering potential* il valore massimo è di -65 Volt, per l'*entrance potential* non vi è aumento significativo di intensità ed è stato preso il valore di -8 Volt.

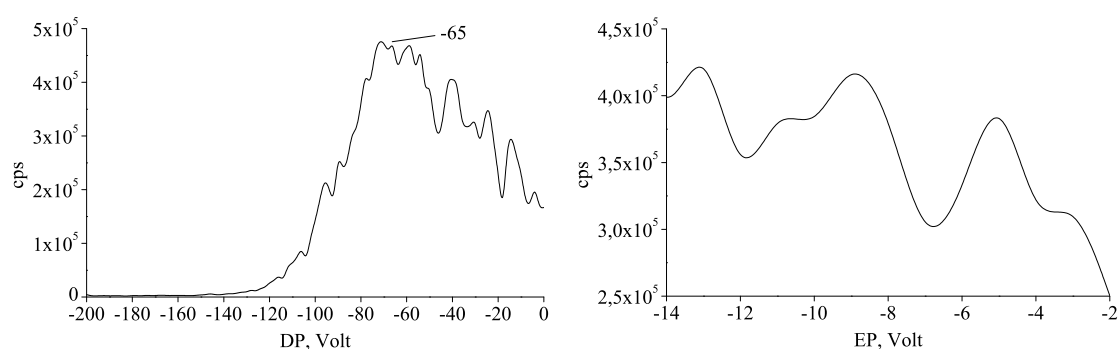


Figura 6.2: Rampe di potenziale DP ed EP

In Figura 6.3 si riporta lo spettro *product ion scan*, ottenuto applicando un'energia di collisione CE iniziale di -20 Volt, scelta in modo tale da mantenere una certa abbondanza di ione precursore.

I frammenti più intensi riportati dallo spettro sono quelli con rapporto $m/z=139.0$ e 141.0 . L'ottimizzazione del potenziale CE avviene attraverso l'applicazione di un'energia di collisione sempre crescente, al fine di individuare quella che porta ad ottenere la maggiore intensità per ogni specifica transizione (Figura 6.4).

I valori scelti di *collision energy* che danno maggiore intensità di segnale sono di -16 Volt per la transizione più intensa, mentre -18 per quella meno intensa.

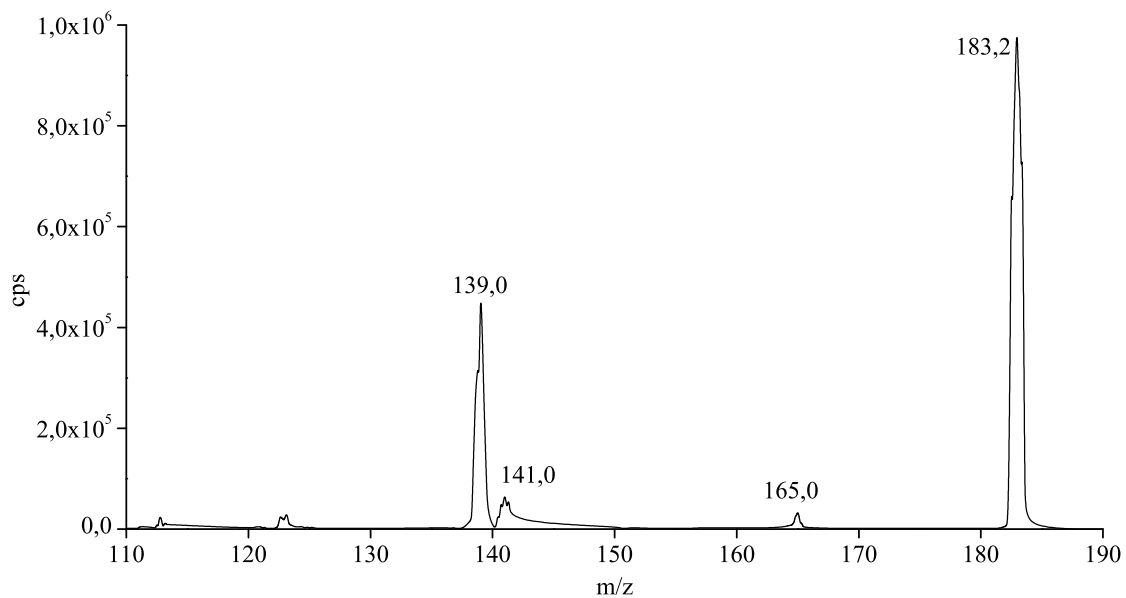


Figura 6.3: Spettro *product ion scan* negativo di una soluzione standard di acido cis-pinonico

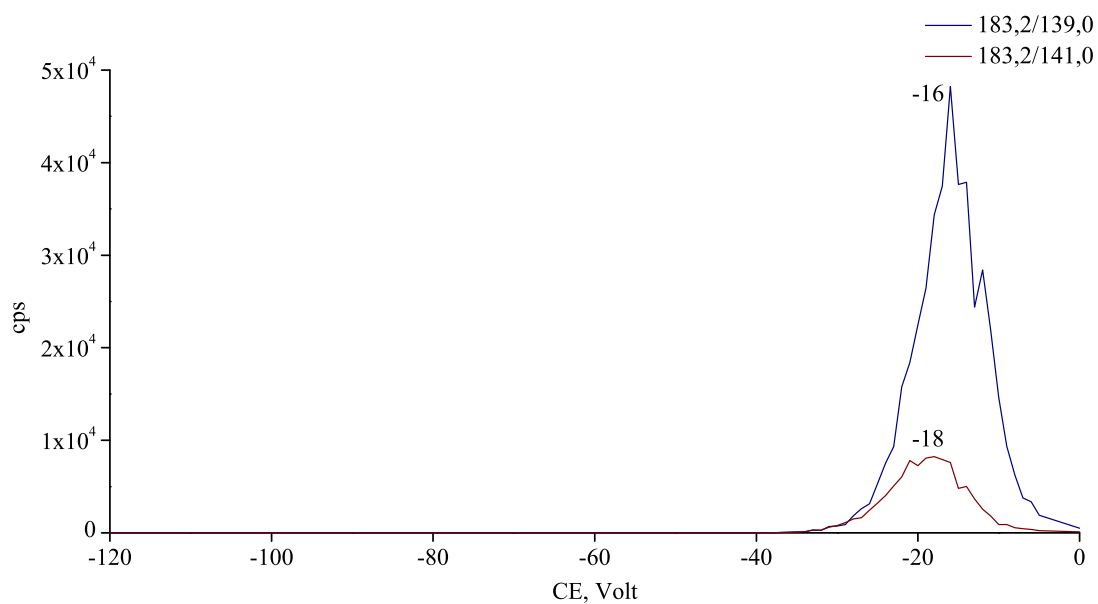


Figura 6.4: Rampa di potenziale CE

A questo punto viene ottimizzato il parametro CXP (*cell exit potential*), attraverso rampe ripetute di potenziale. A titolo di esempio, in Figura 6.5 sono riprodotte le tre rampe di potenziale applicate alla transizione 183.2/141.0: proprio perchè il segnale non presenta una grande stabilità, si ripete la scansione tre volte, da cui poi si ricava un valore di CXP medio. In questo caso è stato scelto il valore di -13 Volt.

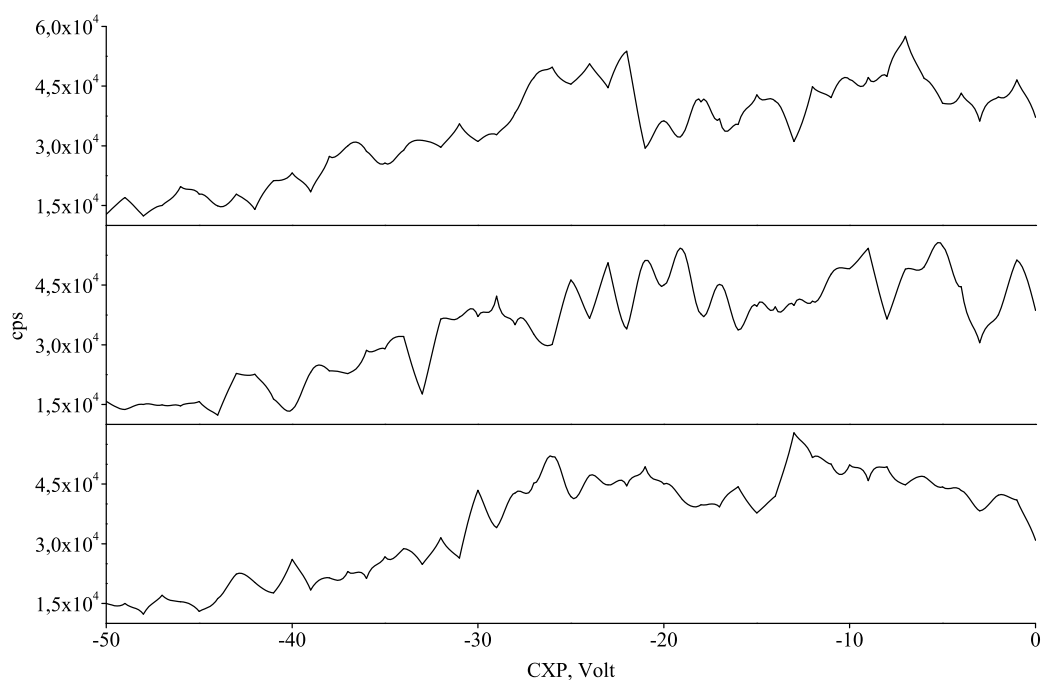


Figura 6.5: Rampa di potenziale CXP per la transizione 183.2/141.0

Al fine di identificare le transizioni più intense, si esegue un'analisi in MRM per un tempo di circa 30 secondi: si nota dalla Figura 6.6 come la transizione più intensa sia quella a 183.2/139.0, mentre risulta meno intensa la transizione 183.2/141.0.

Si riportano in Tabella 6.3 il segnale in massa relativo alle transizioni monitorate con il metodo MRM con i parametri ottimizzati per ciascun analita. Sono state considerate due transizioni, la più intensa (in grassetto) che solitamente viene utilizzata per la quantificazione, mentre la seconda viene utilizzata per confermare l'identità degli analiti.

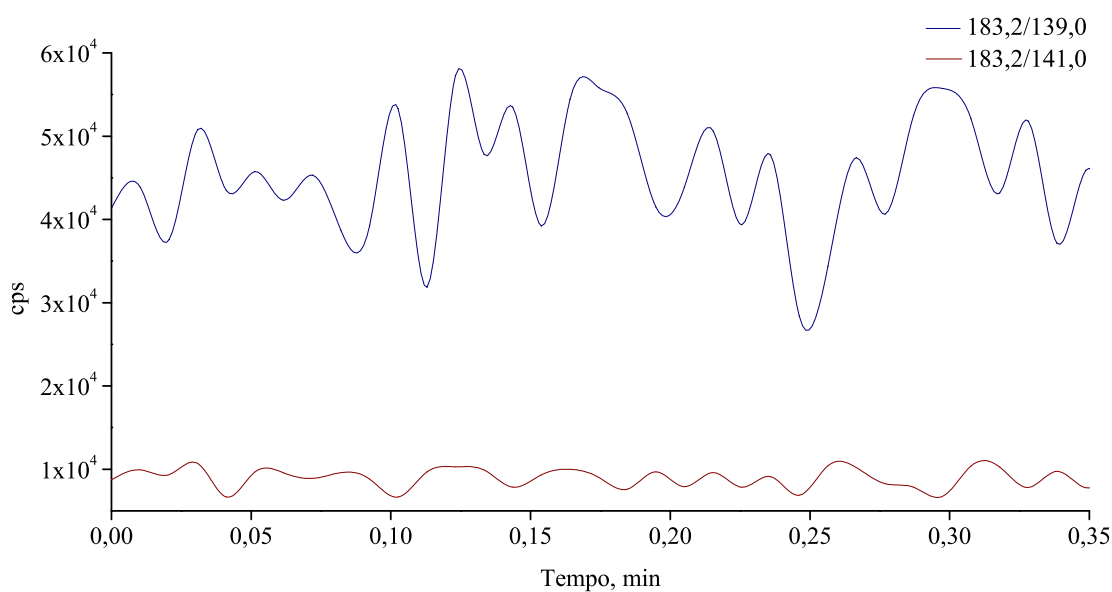


Figura 6.6: Analisi di intensità in MRM

Tabella 6.3: Transizioni in Q1 e Q3 e parametri dei composti ottimizzati per gli analiti

Composto	precursore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	EP	CE	CXP
acido cis-pinonico	$[M - H]^-$	183.2	139.0	-60	-8	-16	-9
			141.0			-18	-13
acido pinico	"	185.2	140.9	-65	-8	-20.7	-10
			166.7			-20.1	-8.5

6.2.2 Sviluppo del metodo cromatografico

Lo sviluppo del metodo cromatografico è basato su studi bibliografici^{[15] [63] [64]} che riducono la scelta delle colonne HPLC a quelle a fase inversa con una catena idrofobia a 18 atomi di carbonio (C_{18}). In Tabella 6.4 sono riportate le colonne HPLC impiegate per lo sviluppo del metodo cromatografico.

Tabella 6.4: Specifiche delle colonne C₁₈ a fase inversa testate in questo studio

Colonna	Dimensione particelle (μm)	Dimensione pori (\AA)	Area superficiale (m^2/g)	Carico di carbonio	Encapped	Lunghezza (mm)	I.D. (mm)	Range di pH
Waters XBridge Shield RP18	3.5	135	185	18	si	100	2.1	1.0-12.0
Agilent Poroshell 120 SB-C18	2.7	120	130	7.5	si	150	2.1	1.0-8.0
Agilent Zorbax SB-Aq	3.5	80	180	NA	no	150	2.1	1.0-8.0
Phenomenex Hydro RP	4	80	475	19	si	50	4.6	1.5-7.5
Phenomenex Kinetex C18	2.6	100	NA	12	no	30	2.1	NA
Agilent Zorbax Extend-C18	3.5	80	180	12.5	doppio	150	4.6	2.0-11.5

Le fasi stazionarie sono state testate a diverse condizioni operative, cambiando diverse composizioni di fasi mobili e diversi gradienti, al fine di migliorare la separazione dei picchi cromatografici e la loro risoluzione. In Figura 6.7 sono riportati i cromatogrammi di prova dell'acido cis-pinonico. Il primo cromatogramma, a partire dal basso, è relativo all'andamento ottenuto con la colonna Waters XBridge Shield RP18, con una soluzione acquosa 0.01% di acido formico (FA) come fase A e metanolo come fase B. La corsa cromatografica è stata condotta utilizzando un flusso costante a $200 \mu L/min$ con il seguente gradiente lineare: 0-20 min da 30% a 100% B, 20-30 min 100% B, 30-40 min 30% B. Una soluzione con una concentrazione di $50 \mu g/L$ è stata iniettata con volume $10 \mu L$. Si nota che il picco cromatografico si trova a circa 35 minuti, tempo che corrisponde alla fase di equilibratura: questo ha portato ad escludere questo tipo di colonna.

Il secondo cromatogramma riporta l'andamento ottenuto con la colonna Agilent Poroshell 120 SB-C18, con $H_2O + 0.01\%$ FA (fase A) e acetonitrile (ACN) (fase B). La corsa è stata condotta con flusso a $200 \mu L/min$ con il seguente gradiente lineare: 0-1 min 20% B, 1-8 min da 20% a 100% B, 8-25 min 100% B, 25-35 min 20% B, volume di iniezione $10 \mu L$. Il picco buoni tempi di ritenzione, ma bassa intensità. Inoltre, approfondimenti successivi hanno rivelato pressioni troppo elevate in fase di eluizione.

Come per il secondo cromatogramma, nel terzo viene usata la colonna Agilent Poroshell 120 SB-C18, con stesse fasi mobili ma con flusso minore, in modo tale da diminuire le pressioni di esercizio, pari a $150 \mu\text{L}/\text{min}$ e con gradiente lineare: 0-1 min 20% B, 1-8 min da 20% a 100% B, 8-20 min 100% B, 20-30 min 20% B. In questo caso è stata usata NH_3 come reattivo post-colonna, ad un flusso di $15 \mu\text{L}/\text{min}$, con l'obiettivo di migliorare la deprotonazione in sorgente degli analiti in esame. Pur presentando buone intensità, gli analiti escono in fase di equilibratura a causa del minor flusso impiegato.

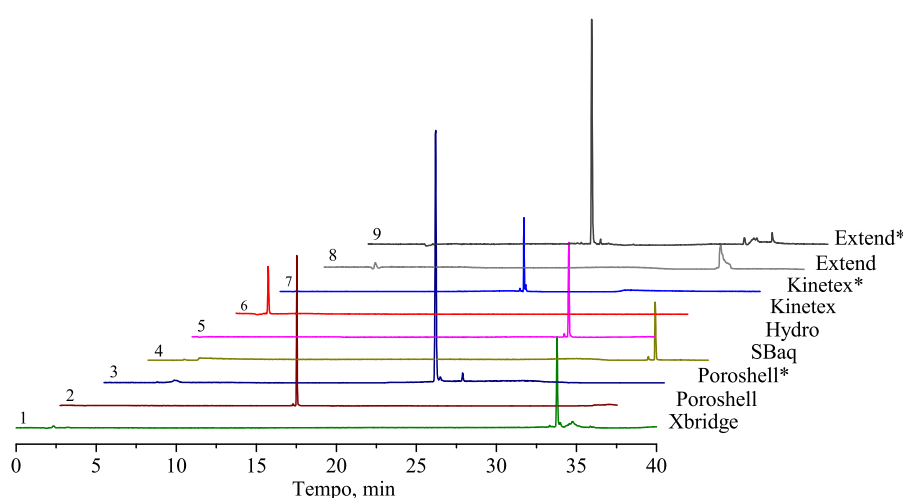


Figura 6.7: Comparazione tra cromatogrammi relativi all'acido cis-pinonico (transizione 182.3/139.0) ad una concentrazione di $50 \mu\text{g}/\text{L}$

Il quarto cromatogramma presenta l'analisi con colonna Agilent Zorbax SB-Aq, fase mobile A $\text{H}_2\text{O} + 0.01\% \text{FA}$ e fase mobile B $\text{MeOH}/\text{ACN} 80:20$, flusso a $200 \mu\text{L}/\text{min}$, gradiente lineare 0-5 min 15% B, 5-15 min da 15% a 100% B, 15-25 min 100% B, 25-35 min 15% B e volume di iniezione $10 \mu\text{L}$. Si può notare dal cromatogramma che l'analita esce in fase di equilibratura a causa dell'interazione troppo elevata con la fase stazionaria della colonna Zorbax SB-Aq.

Il quinto studio presenta problemi simili al precedente: è stata usata una colonna Phenomenex Hydro RP, fase mobile A $\text{H}_2\text{O} + 0.01\% \text{FA}$ e fase mobile B ACN, flusso a $200 \mu\text{L}/\text{min}$, gradiente lineare 0-1 min 20% B, 1-8 min da 20% B a 100% B, 8-20 min 100% B, 20-30 min 20% B e volume di iniezione $10 \mu\text{L}$. Anche in questo caso vi è

un'interazione tra analita e fase stazionaria troppo alta, con conseguente eluizione in fase di equilibratura.

Nel sesto cromatogramma è stata usata una colonna Phenomenex Kinetex C18: fase mobile A H₂O + 0.01% FA e fase mobile B ACN, flusso a 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, gradiente lineare 0-5 min 10% B, 5-15 min da 10% a 100% B, 15-30 min 100% B, 30-32 min 10% B e volume di iniezione 10 μL . In questo caso l'analita è eluito a tempo morto (t_M), ciò significa che non ha interagito con la fase stazionaria. Per ovviare al problema sono state cambiate le condizioni di analisi (*Kinetex**), mantenendo le stesse fasi mobili, ma ponendo il flusso a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, gradiente lineare 0-1 min 20% B, 1-8 min da 20% B a 100% B, 8-15 min 100% B, 15-30 min 20% B. Con le suddette modalità il cromatogramma risulta notevolmente migliorato, anche se l'intensità risulta molto bassa. Tuttavia, analisi successive hanno mostrato importanti impurezze cromatografiche per concentrazioni inferiori a 1 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Le ultime due corse cromatografiche sono state effettuate con la colonna Agilent Zorbax Extend-C18: nella corsa *Extend* è stata usata come fase A H₂O + 0.01% FA e fase mobile B MeOH/ACN 80:20, flusso a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, gradiente lineare 0-2 min 15% B, 2-3 min da 15% a 30% B, 3-8 min 30% B, 8-16 min da 30% B a 70% B, 16-17 min da 70% a 100% B, 17-22 min 100% B, 22-24 min da 100% a 15% B, 24-35 min 15% B e volume di iniezione 20 μL . Il picco cromatografico risulta poco intenso e con un forte *tailing*. L'ultima corsa cromatografica (*Extend**) presenta stesse fasi mobili e stesso flusso della precedente, ma gradiente lineare 0-1 min 20% B, 1-8 min da 20% a 100% B, 8-25 min 100% B, 25-35 min 20% B e volume di iniezione di 100 μL . Sono state scelte queste condizioni operative, in quanto il cromatogramma presenta buona intensità di segnale (a causa del maggior volume di iniezione) e picchi simmetrici. Il metodo inoltre utilizza stesse fasi mobili e stessa fase stazionaria del metodo per l'analisi di metossifenoli: questo permette di porre in sequenza allo strumento sia l'analisi di acido cis-pinonico e pinico, che quella dei metossifenoli, in quanto non sono necessarie operazioni di cambio di colonna e solventi, che comporterebbero ulteriori condizionamenti e stress per la colonna. Nonostante siano state condotte alcune centinaia di analisi, la colonna permette di ottenere la stessa separazione cromatografica inizialmente ottimizzata, dimostrando la robustezza del metodo cromatografico (Figura 6.8).

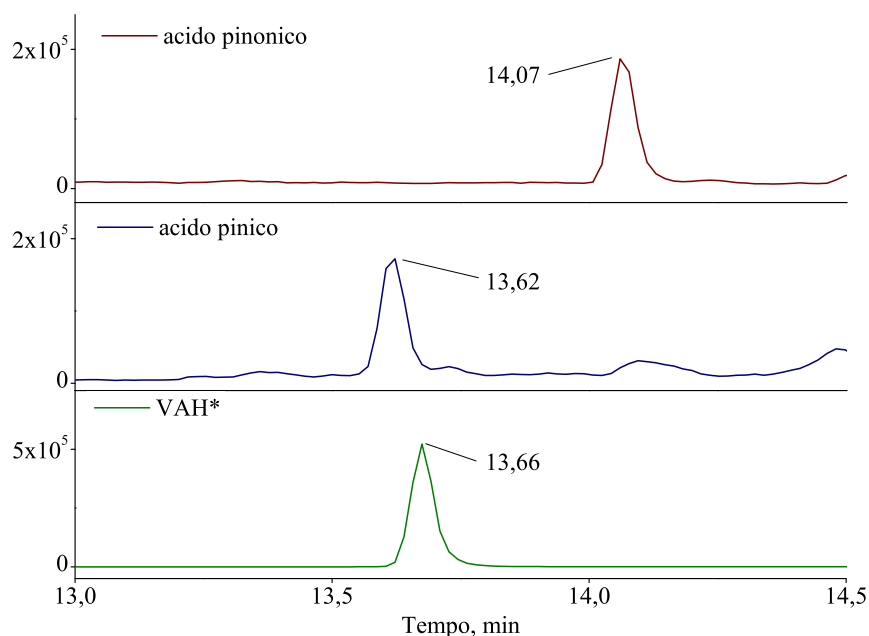


Figura 6.8: Separazione cromatografica tra le transizioni più intense di acido cis-pinonico, pinico e vanillina marcata

Nonostante la transizione 183.2/139.0 per l'acido cis-pinonico sia quella più intensa, per la quantificazione è stata usata la transizione 183.2/141.0. Questo perché la transizione più intensa a basse concentrazioni è caratterizzata da rumori di fondo molto elevati, quindi la transizione 183.2/141.0 presenta miglior limite di rilevabilità grazie ad un basso rumore di fondo. Inoltre, per concentrazioni inferiori a $0.5 \mu\text{g/L}$, la transizione 183.0/139.0 presenta una linea cromatografica molto interferita, rendendone impossibile la quantificazione.

6.2.3 Ottimizzazione della sorgente ESI

Una volta identificate le fasi mobili ed il flusso di eluizione degli analiti è stata condotta l'ottimizzazione di: potenziale applicato all'ago della sorgente (IS), pressione del gas di nebulizzazione e di desolvatazione (GS1 e GS2), temperatura (T), gas posti in controcorrente in uscita dallo *skimmer cone* (CUR) e pressione del gas di collisione (CAD) in Q2. Tale procedura viene condotta in *flow injection analysis* (FIA) in cui una soluzione standard a concentrazione nota viene iniettata utilizzando l'HPLC senza la colonna, utilizzando la

percentuale di fase mobile relativa al tempo di ritenzione dell'analita. In Tabella 6.5 sono riportati i valori dei parametri cromatografici e di sorgente.

Tabella 6.5: Parametri cromatografici e di sorgente per acido cis-pinonico ed acido pinico

Tempo (min)	% fase B	Parametro	Valore
0	20	polarità	negativa
1	20	ion source	turbo spray
8	100	IS	-4500 eV
25	100	temperatura	650°
25.1	20	Gas 1	40 psi
35	20	Gas 2	60 psi
flusso	500 $\mu\text{L}/\text{min}$	CUR	15 psi
iniezione	100 μL	CAD	8 psi

6.3 Metodo per amminoacidi e metossifenoli

La separazione di L e D-amminoacidi è stata effettuata tramite colonna CHIROBIOTIC TAG (Astec, Sigma Aldrich[®]) con flusso di 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, fase mobile A H₂O + 0.1% FA e fase mobile B CH₃OH + 0.1% FA. Il gradiente lineare è il seguente: 0-10 min 30% B, 10-12 min da 30% a 100% B, 12-17 min 100% B, 17-30 min 30% B, iniezione 100 μL . La sorgente di tipo ESI lavora con polarità positiva, IS 5500 eV, temperatura di 500°C, Gas1 20 psi, Gas2 65 psi, CUR 30 psi e CAD 4 psi.

Per i metossifenoli viene utilizzata la colonna Zorbax Extend-C18 (Agilent Technologies) con flusso 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, fase mobile A H₂O + 0.1% FA e fase mobile B MeOH/ACN 80:20, gradiente lineare 0-2 min 15% B, 2-3 min da 15% a 30% B, 3-8 min 30% B, 8-16 min da 30% a 70% B, 16-17 min da 70% B a 100% B, 17-27 100% B, 27-29 da 100% a 15% B, 29-34 min 15% B, iniezione 100 μL . La sorgente lavora in negativo, con IS -4450 eV, temperatura di 650°C, Gas1 45 psi, Gas2 60 psi, CUR 25 psi e CAD 5 psi.

Nella Tabella B.1 e Tabella B.2 in Appendice B sono riportate inoltre le transizioni in Q1 e Q3 e i rispettivi parametri ottimizzati per L e D-amminoacidi e metossifenoli.

6.4 Risposta strumentale

6.4.1 Linearità

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato per la quantificazione il metodo dello standard interno. La mancanza in commercio di acido pinico ed acido cis-pinonico marcati isotopicamente ha reso necessario l'individuazione di una sostanza chimicamente simile agli analiti in esame, da usare come standard interno. La scelta è ricaduta su vanillina $^{13}\text{C}_6$ (Sigma-Aldrich[®]). Un vantaggio della scelta di questo standard interno è dovuto al suo uso anche per la quantificazione di metossifenoli. In laboratorio sono state preparate dunque due soluzioni acquose alla concentrazione di 1 mg/L , una contenente tutti gli analiti in esame (acido cis-pinonico, acido pinico, metossifenoli ed amminoacidi), mentre una seconda contenente gli standard interni.

La linearità della risposta è stata ottenuta mediante curva di calibrazione per tutti gli analiti in esame individuando il rapporto della concentrazione analita/standard interno contro il rapporto area analita/area standard interno. Il fattore che indica la linearità R^2 va da valori di 0.994 fino a 1, nel range di concentrazione $10 \text{ ng/L} - 50 \text{ } \mu\text{g/L}$.

6.4.2 Limiti di rilevabilità e quantificazione strumentali

Il limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) strumentali vengono definiti come la concentrazione di una soluzione standard il cui rapporto segnale/rumore è uguale a 3 (LOD) o uguale a 10 (LOQ) ^[65]. Nella Tabella 6.6 vengono riportati i valori di coefficiente angolare, intercetta, coefficiente di correlazione R^2 ed i valori di LOD e LOQ per acido cis-pinonico ed acido pinico, considerando un volume di iniezione di $100 \text{ } \mu\text{L}$.

Tabella 6.6: Composto e rispettivo marcato, pendenza, intercetta, R^2 , range di linearità minimo e massimo, LOD e LOQ per acido pinonico ed acido pinico

Composto	Marcato	Pendenza	Intercetta	R^2	Range di linearità $\mu\text{g/L}$	LOD ng/L	LOQ ng/L
acido cis-pinonico	VAH*	0.079	0.002	0.999	0.0125 - 65.5	1.6	5.4
acido pinico	VAH*	0.460	0.028	0.999	0.009 - 45	1.2	4.1

I limiti di rilevabilità e di quantificazione definiti in questo lavoro di tesi per acido cis-pinonico e pinico sono inferiori di circa un ordine di grandezza rispetto allo studio di Parshintsev et al. ^[62] (LOD/LOQ acido pinico 12/40 $\mu\text{g}/\text{L}$; acido cis-pinonico 27/90 $\mu\text{g}/\text{L}$), in cui viene utilizzata una colonna XBridge Shield RP-18, sorgente ESI e spettrometro *ion trap* Esquire 3000+ (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, USA).

Infine, la Tabella C.1 in Appendice C riporta i valori di cui sopra per gli amminoacidi e i metossifenoli studiati per questo lavoro di tesi. Samy et al. ^[66], utilizzando un sistema HPLC-QTOF, quantifica i LOD per gli L-amminoacidi da valori di 80 pg/L a circa 0.9 ng/L (considerando sempre un'iniezione di 100 μL), leggermente inferiori ai valori presentati in questo lavoro di tesi.

Per quanto riguarda i metossifenoli, Zangrando et al. ^[52] riporta valori da 2 a 61 pg assoluti: i LOD e i LOQ di questo lavoro di tesi risultano inferiori di un ordine di grandezza. Questo è riconducibile alla purificazione effettuata dell'acqua ultrapura attraverso una colonna C18, usata per abbassare il segnale strumentale "bianco" delle famiglie di composti affini alla fase stazionaria C18, tra cui i metossifenoli.

6.5 Trattamento del campione

Il metodo di trattamento del campione sviluppato per questo lavoro di tesi è stato applicato con lo scopo di poter effettuare con lo stesso substrato campionato le analisi di tutti i composti in oggetto (acido cis-pinonico e pinico, amminoacidi e metossifenoli). I dischi in alluminio, prima dell'uso, sono stati accuratamente lavati con metanolo ultragradiente (Romil LTD, Cambridge, UK), mentre i filtri in quarzo QFF sono stati trattati in muffola per quattro ore a 400°C. I campioni inoltre, prima dell'analisi, sono stati conservati alla temperatura di -20°C. Entrambe le tipologie di substrato campionato hanno subito la stessa procedura: il campione è stato spezzettato in piccole porzioni in una provetta in plastica da 15 mL , precedentemente lavata e sonicata in bagno ad ultrasuoni con acqua ultrapura. In seguito sono stati aggiunti 50 μL di soluzione contenente gli standard interni ad una concentrazione media di 1 mg/L . Il tutto è stato portato ad un volume di 5 mL con acqua ultrapura (in modo tale da ottenere una concentrazione media degli standard interni di

10 $\mu\text{g}/\text{L}$) e la provetta è stata opportunamente sigillata. L'estrazione è stata effettuata attraverso bagno ad ultrasuoni per una durata di 14 minuti. Per evitare l'aumento di temperatura del bagno con conseguente riascio di metossifenoli e degradazione degli acidi pinico e cis-pinonico, è stato raffreddato il bagno con ghiaccio.

L'estratto è stato poi trasferito in siringhe da 5 mL e filtrato con filtro PTFE (\varnothing 25 mm, 0.45 μm , attivato con 5 mL di metanolo e poi risciaquato con acqua ultrapura), al fine di rimuovere il particolato non disciolto e i frammenti di alluminio e QFF formati dal processo di sonicatura. Dalla soluzione filtrata sono stati prelevati 2 mL e posti in due diverse vial: una per la quantificazione di acido pinico, acido cis-pinonico e metossifenoli, l'altra per la quantificazione di amminoacidi. Tutte le precedenti operazioni sono state svolte sotto cappa a flusso laminare, per ridurre le contaminazioni esterne. In Figura 6.9 è riportato lo schema di preparazione del campione.

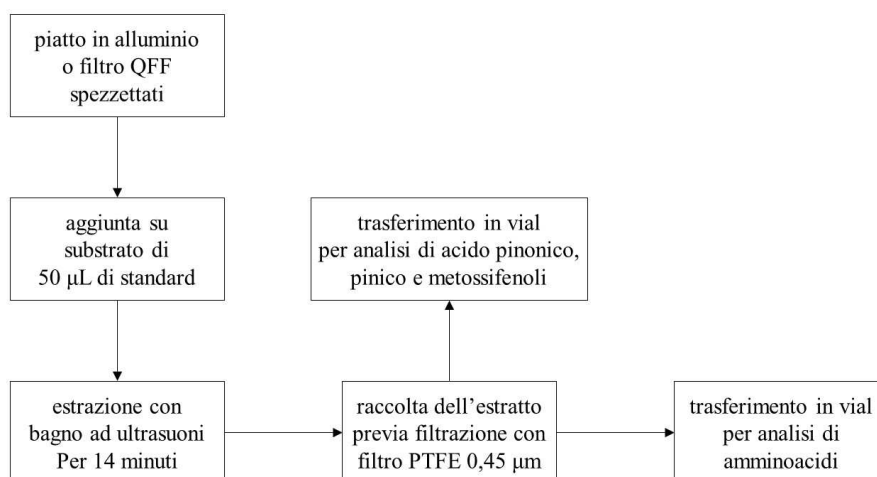


Figura 6.9: Schema a blocchi del trattamento del campione

6.6 Validazione procedurale

La validazione del metodo è stata eseguita mediante la stima dell'errore, del bianco procedurale, delle rese di procedura e dei limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) sia per il substrato di alluminio, sia per quello in quarzo QFF. La quantificazione,

condotta utilizzando il metodo dello standard interno, è stata corretta per un fattore di risposta ad una concentrazione media di $10 \mu\text{g}/\text{L}$, al fine di eliminare le fluttuazioni legate al segnale strumentale. Questo valore si ricava iniettando una soluzione contenente sia gli analiti di interesse che lo standard interno, ad una concentrazione nota. La stima dell'errore medio (che valuta di quanto il valore quantificato si discosta dal valore noto aggiunto alla matrice) per acido cis-pinonico ed acido pinico è stato calcolato eseguendo la stessa procedura preanalitica applicata ai campioni. E' stato dunque spezzettato il disco in alluminio in una vial in plastica da 15 mL precedentemente lavata e sonicata. Successivamente sono stati aggiunti 63 ng assoluti di acido cis-pinonico, 45 ng di acido pinico e 78 ng di vanillina $^{13}\text{C}_6$ in 5 mL con acqua ultrapura (pari ad una concentrazione media di $10 \mu\text{g}/\text{L}$). La soluzione è stata estratta con bagno ad ultrasuoni, per poi essere filtrata e trasferita in vial per l'analisi.

Nella valutazione della resa dell'intera procedura, invece, la vanillina $^{13}\text{C}_6$ è stata aggiunta ai 5 mL subito dopo la filtrazione su filtro PTFE, al fine di valutare l'efficienza di estrazione della procedura. I limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) della metodologia preanalitica sono stati valutati analizzando cinque bianchi procedurali, cioè cinque campioni composti dal substrato in alluminio o in quarzo al quale è stato aggiunto solamente lo standard interno, portando poi al volume di 5 mL . In Tabella 6.7 sono riportati i valori di errore percentuale, rese percentuali, coefficienti di variazione, bianco medio, MDL ed MQL¹ per entrambi i substrati utilizzati.

Tabella 6.7: Errore medio, resa media, CV%, Bianco medio, MDL ed MQL per acido cis-pinonico ed acido pinico

Composto	Errore medio %	Resa media %	CV%	Bianco medio (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
alluminio						
acido cis-pinonico	5.9	77±1	2	2.3±0.2	0.7	2.5
acido pinico	-9.2	66±7	11	3.1±0.4	1.2	4.1
quarzo QFF						
acido cis-pinonico	2.3	80±2	2	3.0±0.8	2.3	7.5
acido pinico	0.9	85±5	6	2.7±0.6	1.9	6.2

¹MDL e il MQL sono stati calcolati rispettivamente come tre e dieci volte la deviazione standard del bianco procedurale

Con il CV% si identifica un indice di dispersione adimensionale, definito come il rapporto tra la deviazione standard e la media aritmetica. È un indice della precisione di una misura. Il calcolo del coefficiente di variazione viene fatto solo per dati aventi media aritmetica non nulla.

Lo standard interno VAH* scelto per la quantificazione di acido cis-pinonico ed acido pinico permette una buona quantificazione, in quanto gli errori percentuali oscillano tra un valore di -9.2 a 5.9. La preparativa inoltre, è caratterizzata da rese di estrazione dal 66 all'85%. J. Parshintsev et al. [62], attraverso un campionamento PILS (*Particle Into Liquid Sampler*) e successiva estrazione SPE (*Solid Phase Extraction*) arrivarono a valori di efficienza di estrazione di 77 ± 9 per acido pinico e 96 ± 4 per acido cis-pinonico per concentrazioni in media di $10 \mu\text{g}/\text{L}$, paragonabili a quelle usate per la validazione procedurale di questo lavoro di tesi. I valori appena descritti si avvicinano molto per l'estrazione da filtro in quarzo, ma si discostano maggiormente per l'estrazione da alluminio, probabilmente per la minore affinità per questo tipo di materiale. Non sono presenti valori confrontabili di MDL ed MQL in letteratura. E' evidente come il disco in alluminio abbia MDL ed MQL inferiori rispetto al filtro in quarzo: questo è dovuto alla porosità del filtro QFF, che presenta maggiore sensibilità alle contaminazioni.

La Tabella D.1 in Appendice D riporta i valori di errore medio, resa media, CV%, Bianco medio, MDL ed MQL per L e D-amminoacidi e metossifenoli. Zhang et al. [67], dopo l'estrazione in acqua ultrapura di campioni di particelle fini ($\text{PM}_{2.5}$), riporta percentuali di estrazione che vanno da 84% al 100%, con un valore medio di 92%. La media della resa di estrazione per questo lavoro di tesi per il substrato di alluminio è del 70%, mentre per il quarzo è di 77%, che conferma le migliori rese percentuali per il filtro QFF viste per acido cis-pinonico e pinico. Come confermato da alcuni studi [34] [66], il range di estrazione in acqua solitamente varia dal 70% al 90%: l'estrazione effettuata in questo lavoro di tesi si attesta a valori simili ma leggermente più bassi, da 55% al 90%. MDL ed MQL per L e D-amminoacidi sono notevolmente inferiori (un ordine di grandezza) ai valori ottenuti per gli stessi analiti da Barbaro et al. [68], questo perché la superficie del substrato risulta molto più contenuta (diametro di 56 mm).

Le rese di estrazione dei metossifenoli vanno da un valore di 61% al 100% per il

substrato in alluminio, mentre risultano ancora più alti per il substrato in quarzo (73% - 100%). Zangrando et al. ^[52] riporta valori di MDL che sono confrontabili con i valori ottenuti in questo lavoro di tesi.

Capitolo 7

Risultati e discussione

7.1 Analisi dimensionale

Le caratteristiche del campionatore MOUDITM II permettono di separare il particolato campionato in 12 frazioni: $\geq 18\mu m$, $18-10\mu m$, $10-5.6\mu m$, $5.6-3.2\mu m$, $3.2-1.8\mu m$, $1.8-1.0\mu m$, $1000-560nm$, $560-320nm$, $320-180nm$, $180-100nm$, $100-56nm$, $\geq 56nm$. La durata di ogni campionamento è stata pianificata per permettere di ottenere una massa significativa per ciascuna frazione dimensionale.

L'andamento della concentrazione di massa delle varie frazioni dell'aerosol (Figura 7.1) è riportato in $\mu g/m^3$ calcolati in base ai m^3 stimati grazie alle misure flussimetriche e al tempo di campionamento, che è stato mediamente di tre giorni. Vengono riportate anche le piogge in millimetri, in modo tale da poter studiare l'effetto del dilavamento del particolato in atmosfera.

Si nota che il range di concentrazione del TSP (*total suspended particles*) va da un minimo di $12 \mu g/m^3$ ad un massimo di $47 \mu g/m^3$. Nella prima parte del campionamento, fino al 15/04/2016, si ha una concentrazione molto superiore rispetto alla seconda parte, dovuto probabilmente all'emissione di particelle quali pollini, batteri e polveri, caratteristici della stagione primaverile. La Figura 7.1, che riporta i mm di pioggia rilevata dalla stazione meteorologica ambientale del Laboratorio di Fisica Tecnica Ambientale - IUAV di Mestre, mostra come l'abbattimento della concentrazione di particelle possa essere spiegato dalla precipitazione che ha interessato il campionamento del 4-8 aprile e del 12-15

aprile. Tale abbassamento delle concentrazioni delle particelle perdura fino al termine della campagna di campionamento. Inoltre, dalla Figura 7.2, che riporta la concentrazione delle particelle suddivisa nelle tre principali frazioni (*coarse*, *fine*, *ultrafine*) è chiaro che la precipitazione ha avuto l'effetto di abbattimento in tutte le frazioni dimensionali, anche se risulta molto più evidente nella frazione fine (da $1.8\mu m$ a $180nm$).

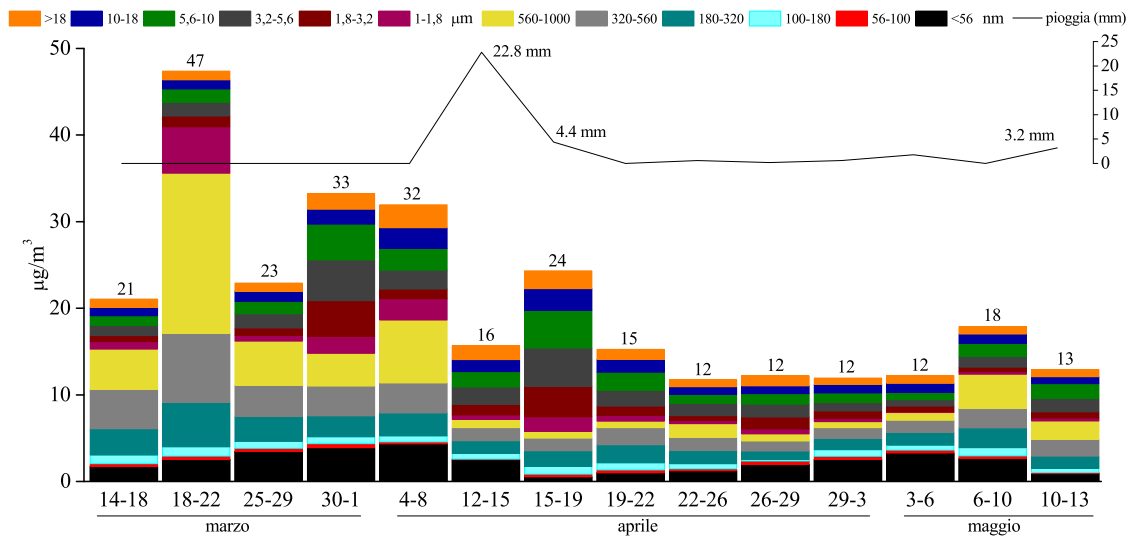


Figura 7.1: Distribuzione dimensionale dal 18/03/2016 al 15/03/2016 ($\mu g/m^3$)

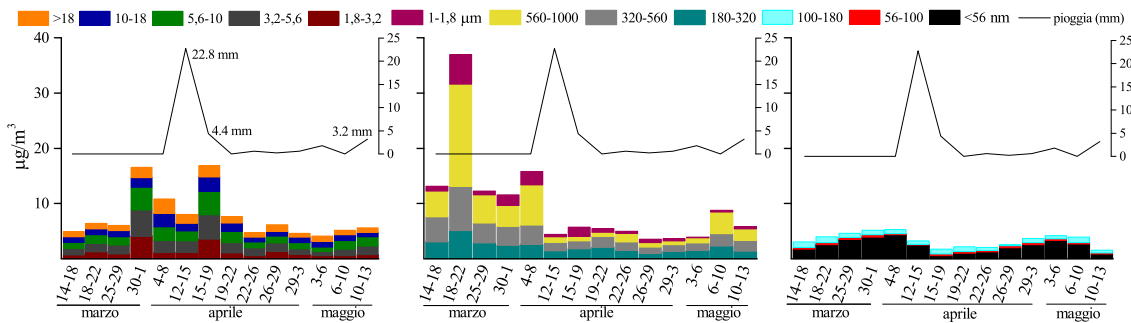


Figura 7.2: Distribuzione delle particelle grossolane (a sinistra), fine (al centro) ed ultrafine (a destra) dal 18/03/2016 al 15/03/2016 ($\mu g/m^3$)

In alcuni studi ^[69] in cui viene utilizzato un impattore MOUDI, si accosta l'abbassamento delle concentrazioni monitorate alla variazione del vento, che ha un effetto di diluizione delle particelle. Tuttavia questo effetto non sembra essere significativo nel presente studio, in quanto le rose dei venti riportate in Figura 7.3 non mostrano intensificazioni dei venti in concomitanza dell'abbassamento di concentrazione dell'aerosol atmosferico.

Per i periodi di campionamento 18-22 marzo, 4-8 aprile, 15-19 aprile e 6-10 maggio l'aumento di concentrazione di aerosol (Figura 7.1) in atmosfera coincide con l'aumento in frequenza di venti da Nord-Ovest (NW) (Figura 7.3), provenienti dal centro della città di Mestre. Il periodo di campionamento dal 30 marzo al 1 aprile però, pur mostrando la seconda concentrazione totale più alta, non ha stessa relazione rispetto ai precedenti, in quanto i venti provenienti da NW sono pressochè trascurabili.

Una conferma del trend di concentrazioni in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ monitorate in questo lavoro di tesi è data dai valori qualitativi di *aerosol optical thickness*, forniti dal satellite Aqua/MODIS NASA (Figura 7.4). La misura si basa sulla capacità dell'aerosol atmosferico di assorbire e diffondere la luce solare, aumentando così lo "spessore ottico". La scala usata è adimensionale: un valore di 0.1 indica un cielo povero di aerosol, viceversa valori prossimi ad 1 ne indicano una presenza importante. Ad esempio, si nota che nel campionamento dal 18 al 22 marzo si ha un'intensificazione nel fenomeno di *aerosol optical thickness*, che coincide con la concentrazione del TSP più alta. Da circa metà aprile successivamente lo "spessore ottico" è limitato, ed è confermato dalle basse concentrazioni in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Una più completa spiegazione dell'andamento delle concentrazioni di aerosol nel tempo è data dall'analisi dei composti che presentano alte concentrazioni in aerosol, come ioni ed acidi carbossilici, che saranno oggetto di studio in successive analisi. Barbaro et al. ^[70], prendendo in considerazione gli analiti più abbondanti nell'aerosol antartico, riesce ad identificare l' $80\pm 20\%$ della massa di aerosol campionato.

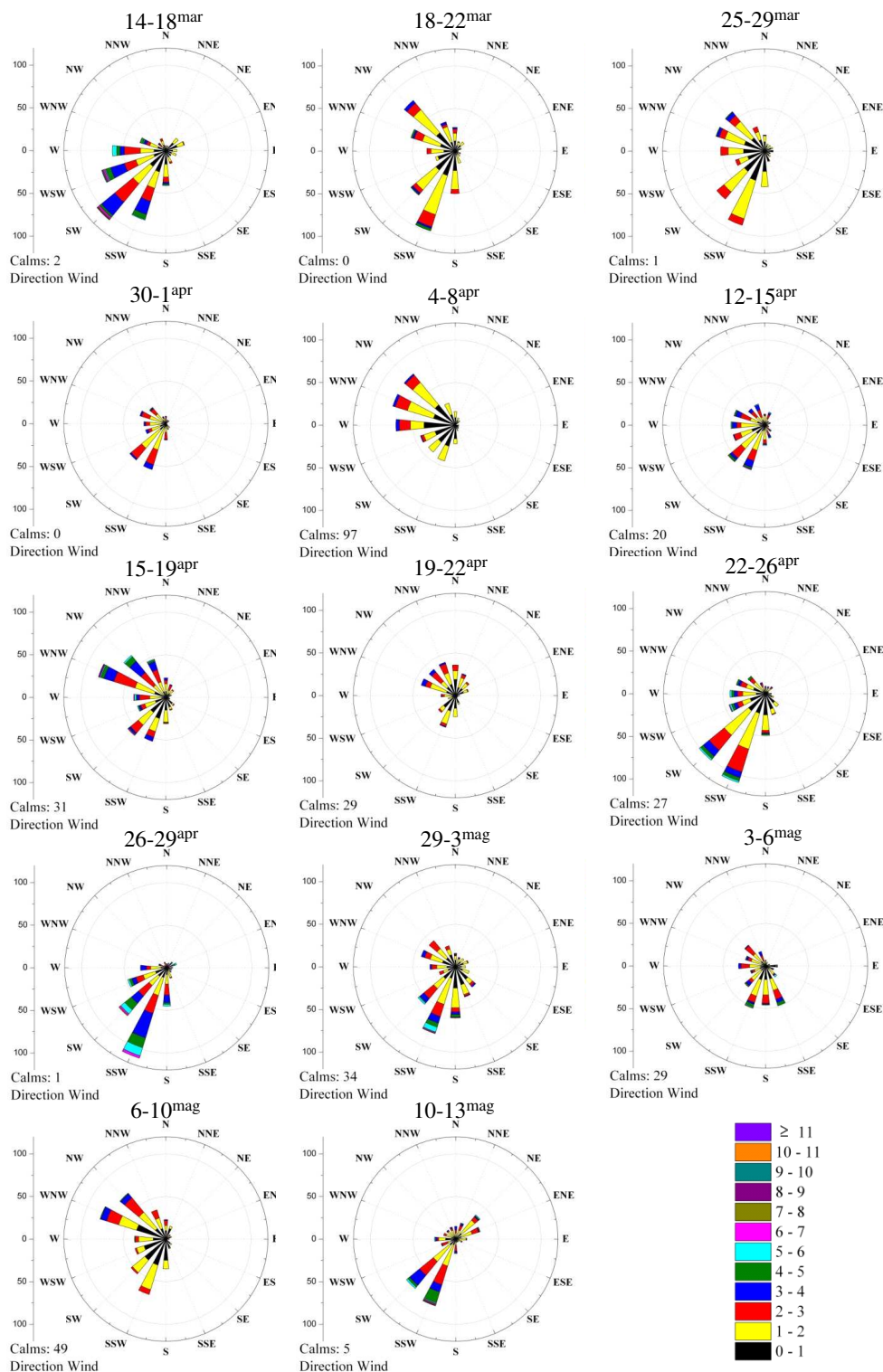


Figura 7.3: Rosa dei venti per ogni periodo di campionamento. I valori sono espressi in m/s . Dati del monitoraggio meteorologico ambientale del Laboratorio di Fisica Tecnica Ambientale IUAV - Mestre

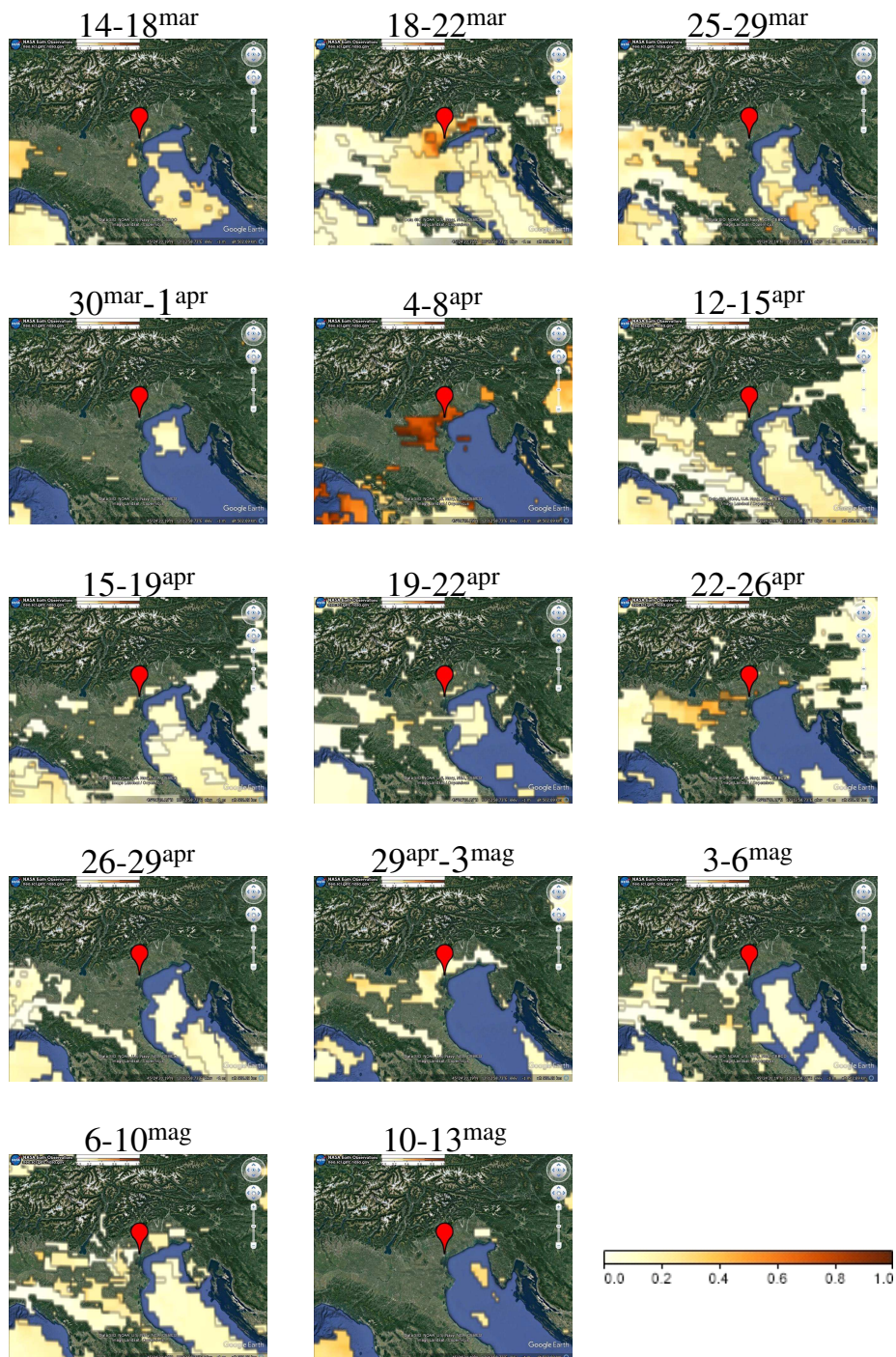


Figura 7.4: Misure di *aerosol optical thickness*, satellite Aqua/MODIS NASA

7.2 Andamenti di acido cis-pinonico e pinico

Lo studio degli andamenti temporali di acido cis-pinonico ed acido pinico assume un'importanza rilevante, soprattutto perchè sono alcuni dei principali composti di fotoossidazione dell' α -pinene ^[21], una molecola semivolatile di cui le emissioni globali vengono stimate in 125 Tg/anno ^[20].

Le più alte concentrazioni di acido cis-pinonico sono state trovate nei periodi di campionamento tra il 26 e 29 aprile, 3-6 maggio e 10-13 maggio, sempre nella frazione ultrafine ($<56\text{ nm}$), con valori che variano da 0.6 a 0.8 ng/m^3 . Per quanto riguarda l'acido pinico, invece, le concentrazioni variano da 0.1 a 0.8 ng/m^3 e l'andamento risulta molto più variabile nel tempo rispetto all'acido cis-pinonico, che è invece caratterizzato da un aumento progressivo passando dal periodo primaverile a quello estivo. Le concentrazioni medie di acido cis-pinonico ed acido pinico sono molto simili e sono nell'intorno di 300 pg/m^3 . Valori molto più alti vengono trovati in altri studi ^[62] ^[71] ^[75] in Finlandia, negli Stati Uniti e in Germania, dove le concentrazioni di acido cis-pinonico e di acido pinico medie sono rispettivamente di circa 20 e 3 ng/m^3 , circa 2 e 1 ordine di grandezza superiori rispetto ai valori di questo lavoro di tesi. L'elevata disparità delle concentrazioni riportate è probabilmente dovuta ai siti di campionamento degli studi di comparazione: essi sono tutti caratterizzati dalla vicinanza di conifere, direttamente responsabili dell'emissione di α -pinene e, di conseguenza, di acido cis-pinonico ed acido pinico ^[19].

Nel lavoro di Sheesley et al. ^[72] viene confermato l'andamento di questo lavoro di tesi: le concentrazioni più alte di acido pinonico vengono monitorate in estate e durante il periodo di fioritura delle piante. Inoltre, Kim et al. ^[73] riporta il notevole impatto che vi è negli USA dei processi di potatura, taglio e sfoltimento delle piante: questi tipi di processi favoriscono l'emissione di monoterpeni. Tuttavia, questo tipo di influenza è sicuramente minore nella zona di campionamento di questo lavoro di tesi, soprattutto perchè i processi di abbattimento di boschi e foreste sono molto più importanti negli Stati Uniti. In Figura 7.5 è riportato l'andamento di temperatura e delle concentrazioni totali TSP di acido pinonico. Dal fit lineare si denota che entrambi hanno un andamento crescente.

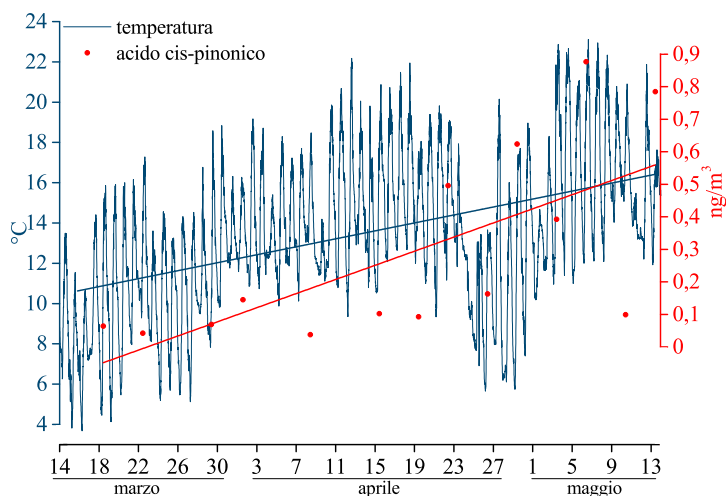


Figura 7.5: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), concentrazioni totali di acido cis-pinonico (ng/m^3) e fit lineari

E' noto infatti che l'acido cis-pinonico è influenzato in modo tangibile dalla temperatura, mentre altri agenti atmosferici, seppur la formazione dei due acidi avviene attraverso reazioni di fotoossidazione, sembra abbiano minor rilevanza [74].

Nel presente studio l'acido cis-pinonico si trova esclusivamente nella frazione ultrafine ($<0.056 \mu\text{m}$). Questo tipo di distribuzione è confermata da diversi studi [75] [76] in cui concentrazioni di acido pinonico vengono trovate fino a valori di diametro delle particelle di $1 \mu\text{m}$. Pio et al. [75] ha riportato che l'acido pinico segue l'andamento dimensionale dell'acido pinonico. In Figura 7.6 sono riportate le distribuzioni dimensionali di acido pinonico ed acido pinico di Pio et al [75].

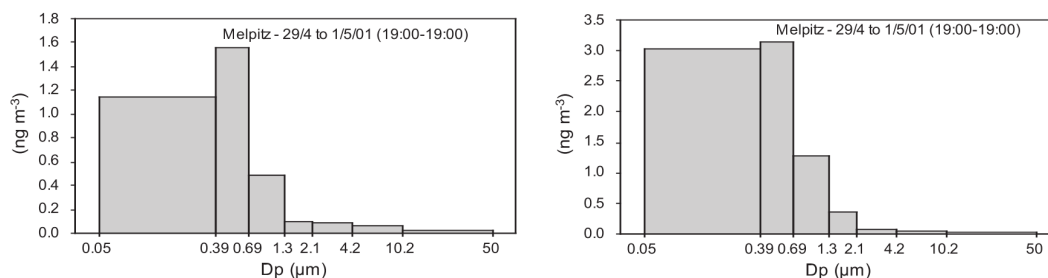


Figura 7.6: Distribuzione dimensionale di acido pinonico (a sinistra) e pinico (a destra) in campioni di aerosol della città di Melpitz - Germania [75]

Tuttavia, in questo lavoro di tesi l'acido pinico risulta essere distribuito in maniera più o meno omogenea in tutte le varie frazioni dell'aerosol, non seguendo dunque il trend di concentrazione paragonabili all'acido cis-pinonico. In Figura 7.7 sono confrontate le concentrazioni di acido pinonico ed acido pinico nel periodo di campionamento.

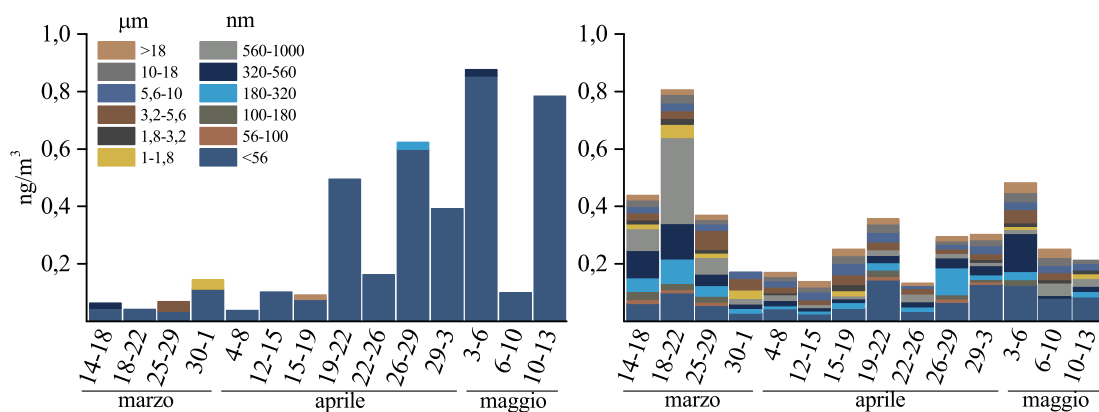


Figura 7.7: Andamenti delle concentrazioni nelle varie frazioni di acido cis-pinonico (a sinistra) ed acido pinico (a destra)

E' chiaro come l'acido pinico sia presente in più frazioni, diversamente dall'acido pinonico. L'effetto è visibile anche dagli andamenti in Figura 7.11. Si nota come l'acido pinico abbia un andamento quasi inverso rispetto all'acido cis-pinonico: in base ai processi reattivi di formazione dell'acido pinico, che viene sintetizzato per degradazione fotoossidativa dell'acido pinonico, è probabile che le condizioni atmosferiche abbiano favorito la formazione di acido pinico nella prima parte del campionamento, mentre nella seconda parte abbiano favorito il decorso della reazione solo fino all'acido pinonico, a discapito dell'acido pinico. In definitiva, la distribuzione dimensionale dell'acido pinico diverge in maniera netta rispetto a quella dell'acido cis-pinonico.

Un altro punto di vista per interpretare gli analiti in esame è dato dallo studio dei dati in mg/g , piuttosto dell'unità in ng/m^3 . Il campionamento effettuato ha dato la possibilità di avere il peso di aerosol per ogni frazione campionata. Dalla Figura 7.8 si evince che non vi sono sostanziali differenze con i dati della Figura 7.7 in ng/m^3 , fatto salvo per i primi

due campionamenti dell'acido pinico: l'unità in mg/g indica che le concentrazioni nei vari stadi diventano pressoché costanti. Tale dato indica che all'aumentare o al diminuire del peso di aerosol per ogni frazione, aumenta o diminuisce rispettivamente la concentrazione di acido pinico.

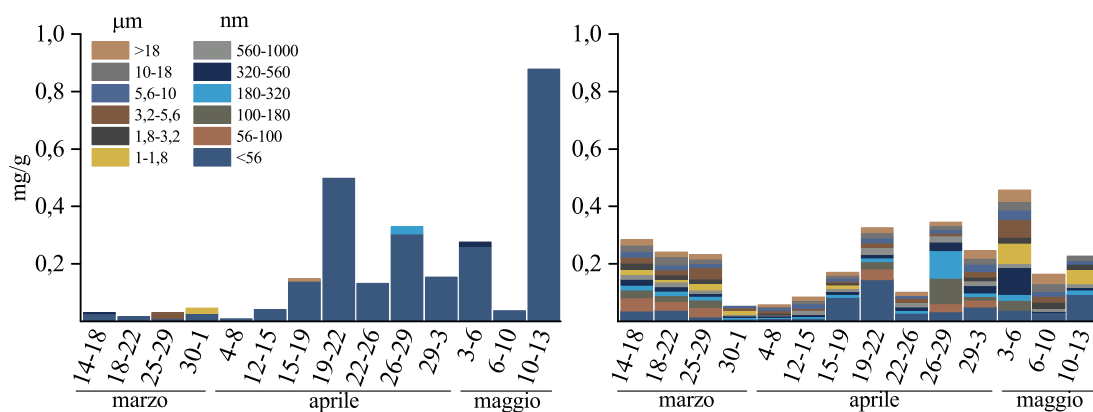


Figura 7.8: Andamenti delle concentrazioni nelle varie frazioni di acido cis-pinonico (a sinistra) ed acido pinico (a destra) in mg/g

I dati in mg/g indicano che nei campionamenti interessati dalle piogge del 4-8 aprile per l'acido cis-pinonico e del 30 marzo-1 aprile e 4-8 aprile per l'acido pinico vi è una lieve diminuzione delle concentrazioni, come accaduto per i dati presentati in ng/m^3 : in realtà i dati presentati in mg/g non sono direttamente interessati dalle piogge perchè l'analita in esame viene stimato sul peso disponibile, indipendentemente dal volume dell'aria. E' possibile tuttavia che la pioggia vada a diminuire l'emissione di α -pinene dalla sorgente, a causa del film acquoso che si crea sulla superficie della vegetazione.

Un'ulteriore spiegazione dell'andamento dell'acido pinico nel periodo di campionamento interessa la stabilità della molecola in atmosfera: in presenza di ozono la degradazione è trascurabile, in quanto viene stimato il tempo di vita in presenza di O_3 in 463 giorni [77], mentre la presenza di batteri o spore fungine può avere un importante ruolo. L'acido pinico infatti viene degradato microbiologicamente raggiungendo tempi di vita di 4 giorni [78]. L'acido cis-pinonico sembra invece non seguire la stessa reattività.

E' stato dunque effettuato un confronto con la L-prolina, un amminoacido presente principalmente nella frazione grossolana e che è presente nell'*ascus*, una cellula che contiene spore [79]. Al fine di verificare l'influenza della concentrazione di spore nell'andamento dell'acido pinico, in Figura 7.9 viene riportato un confronto con la L-prolina.

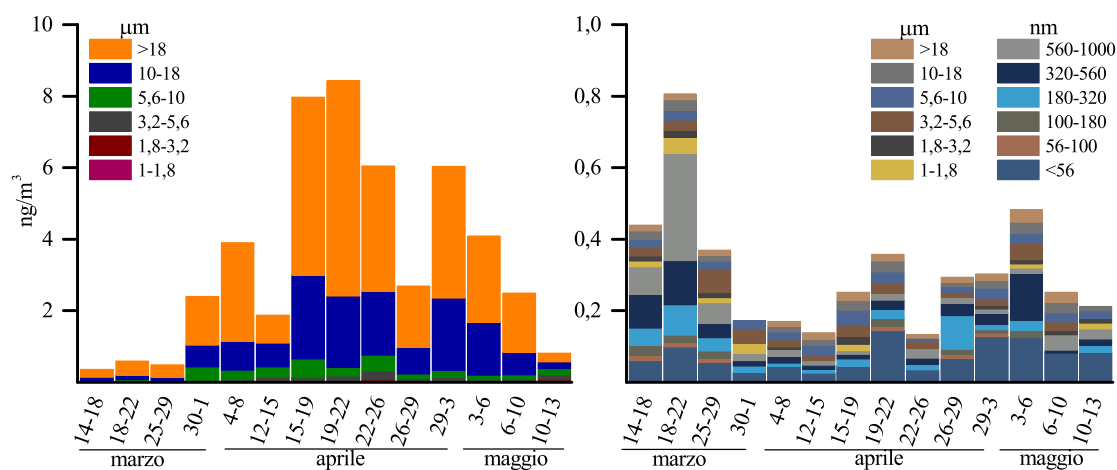


Figura 7.9: Andamenti in ng/m^3 per L-prolina (sinistra) ed acido pinico (destra)

L'immagine non riporta la frazione fine ed ultrafine per la L-prolina, perchè assente in queste frazioni. La distribuzione infatti è in linea con la tipologia di sorgente, perchè la maggior parte delle spore fungine sono presenti esclusivamente nella frazione grossolana. Si nota come ci sia un lieve andamento inversamente proporzionale: all'aumentare della concentrazione di L-Prolina vi è una diminuzione di acido pinico. Se si prendono però in considerazione i D-Amminoacidi, presenti nelle pareti cellulari dei batteri [24] e quindi probabili *markers* per la degradazione microbiologica dell'acido pinico, la correlazione inversa non è del tutto chiara, perchè non tutti hanno un andamento inverso a quello dell'acido pinico. La D-alanina, che è il D-amminoacido più concentrato, non mostra alcuna correlazione con l'acido pinico (Figura 7.10). L'acido D-aspartico invece, presenta un andamento molto simile alla L-prolina: pur non essendo interessato da stessa sorgente della prolina ed essendo a concentrazioni minori di due ordini di grandezza, può comunque essere legato alla diminuzione di acido pinico per fattori biogenici.

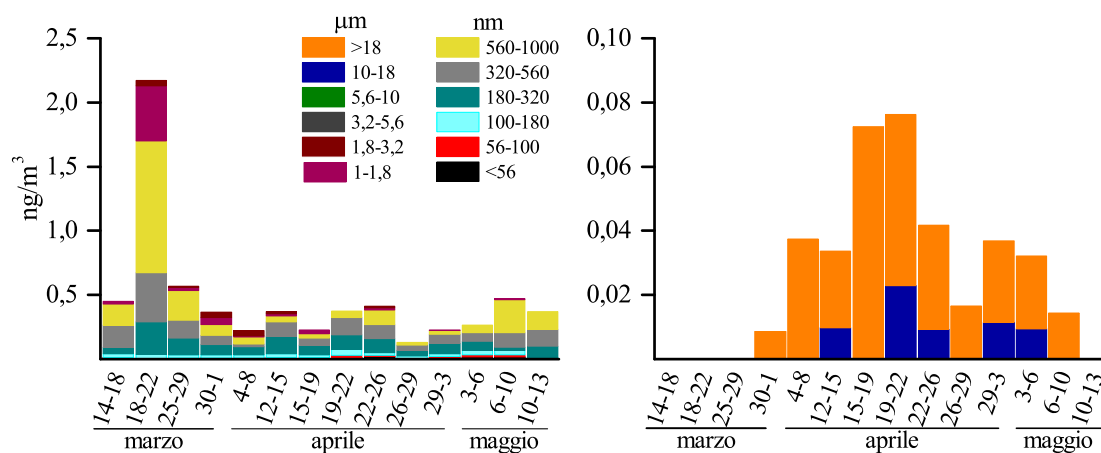


Figura 7.10: Andamenti in ng/m^3 per D-Alanina (frazione fine) sulla sinistra ed acido D-Aspartico (frazione grossolana) sulla destra

Gli andamenti durante il periodo di campionamento di acido cis-pinonico ed acido pinico in ng/m^3 e in mg/g sono riportati nella Figura 7.11 e Figura 7.12. In entrambi i casi si nota il progressivo aumento della concentrazione dell'acido cis-pinonico e la leggera diminuzione di concentrazione dell'acido pinico, che si denota dal campionamento che interessa il periodo dal 4 all'8 aprile.

E' comunque molto complesso apprenderne comportamento e la distribuzione dimensionale in atmosfera perchè i processi fotoossidativi in atmosfera, a partire dall' α -pinene, sono numerosi e tuttora non completamente conosciuti. La correlazione dunque con agenti ossidanti in atmosfera quali O_3 , ossigeno, perossidi, NO_x , $OH\cdot$ e radiazione UV-VIS non risulta efficace. Oltre a questi fattori c'è da considerare che l'acido cis-pinonico è presente quasi esclusivamente nella frazione ultrafine: le particelle ultrafini in atmosfera vengono dette *long range particles*, per la loro capacità di allontanarsi per centinaia di chilometri dalla sorgente. L'acido cis-pinonico dunque subisce la fotoossidazione in più ambienti diversi. Lo stesso concetto non è applicabile all'acido pinico, in quanto è presente in maniera omogenea nelle varie frazioni.

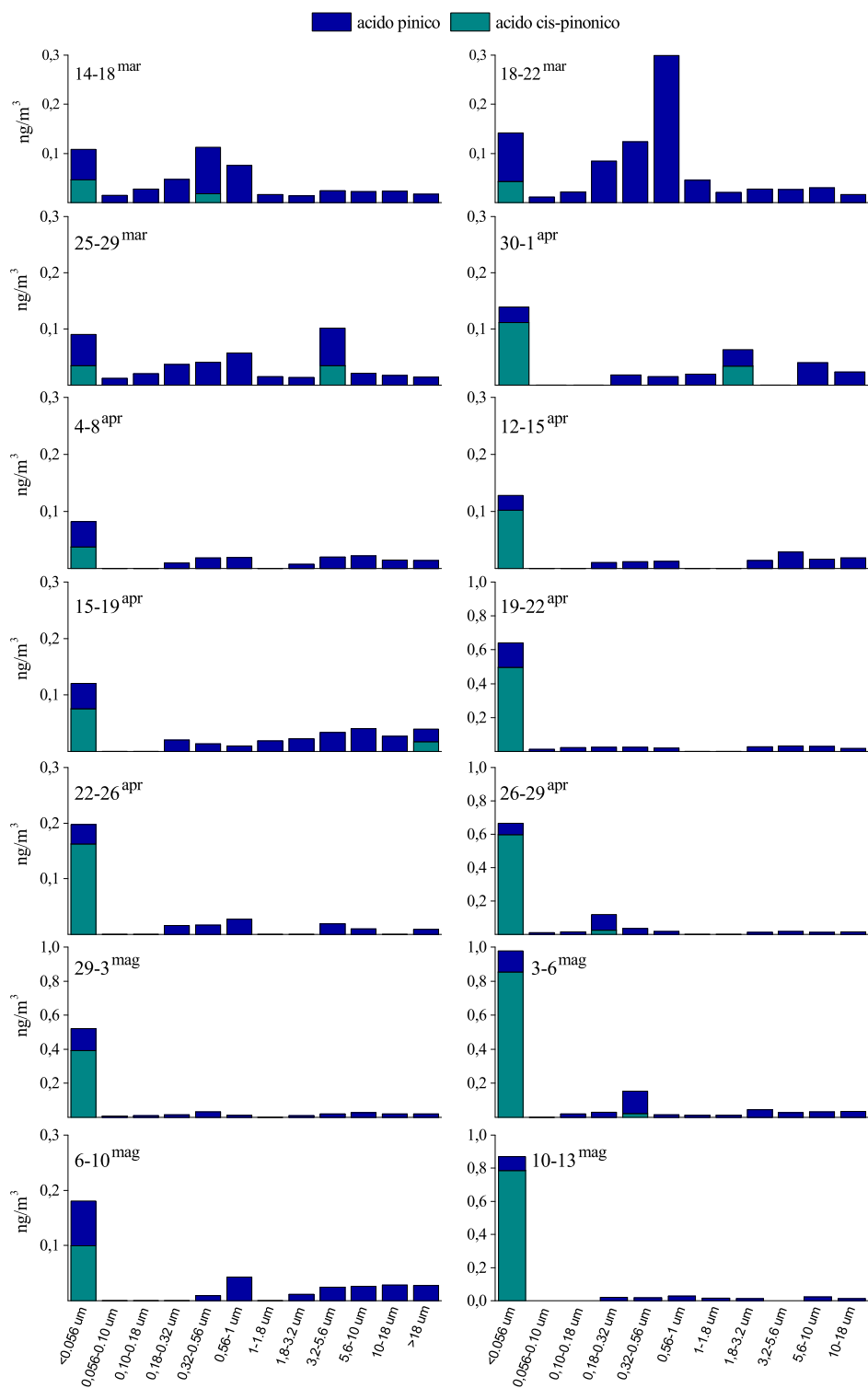


Figura 7.11: Andamenti per ogni campionamento in ng/m^3 per acido cis-pinonico ed acido pinico

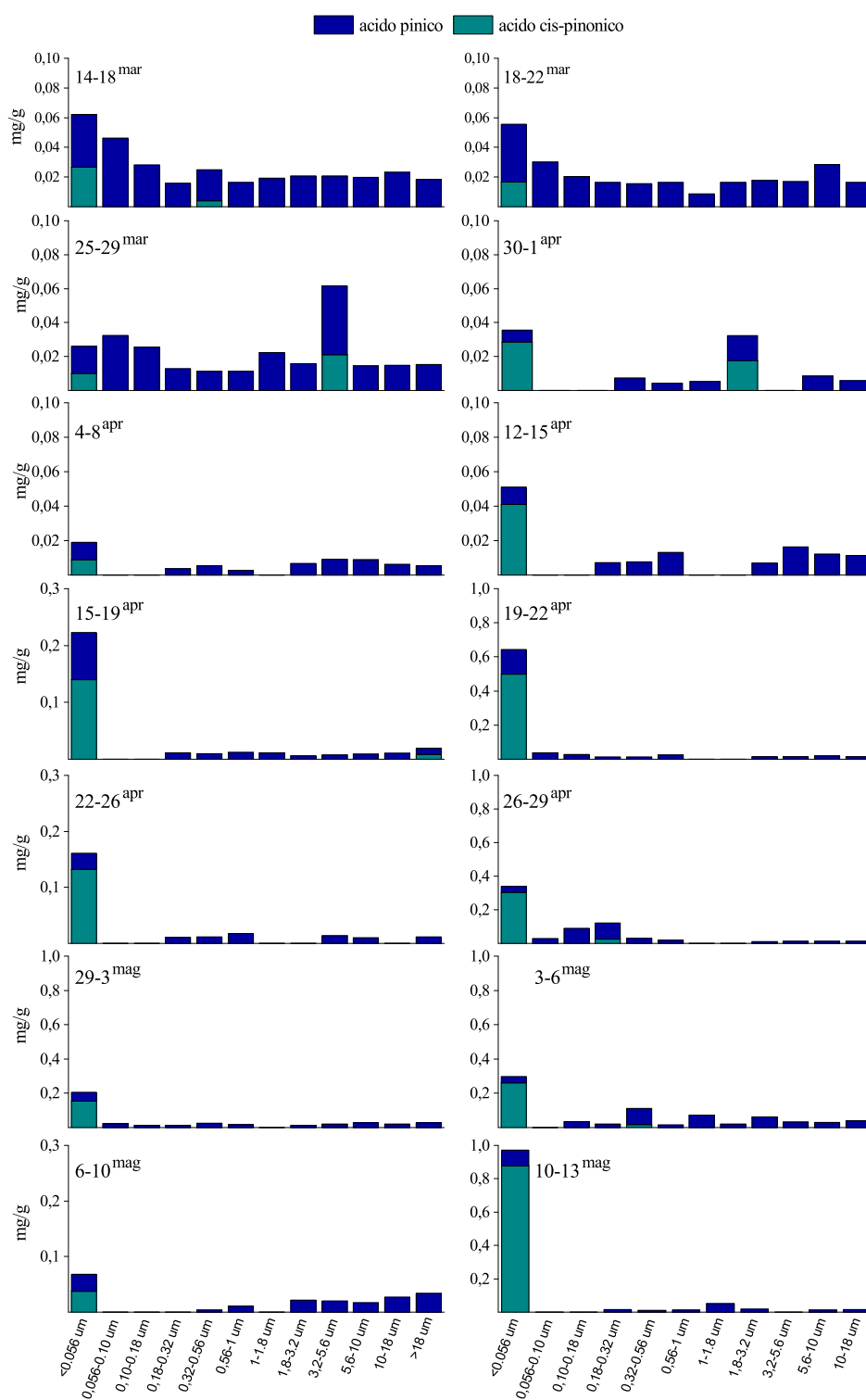


Figura 7.12: Andamenti per ogni campionamento in mg/g per acido cis-pinonico ed acido pinico

7.3 Andamenti di L e D-amminoacidi

In questo lavoro di tesi sono state determinate le concentrazioni di L e D-amminoacidi nelle varie frazioni dimensionali dell'aerosol atmosferico. Gli amminoacidi infatti, avendo basse tensioni di vapore, sono uno dei più significativi composti azotati organici presenti in atmosfera. E' dimostrato inoltre che l'azoto organico varia dal 20% all'80% dell'azoto totale presente nelle particelle di aerosol e viene rilevato sia nelle deposizioni secche sia nelle precipitazioni [25].

Il range di concentrazioni totali per ogni campionamento di L e D-amminoacidi varia da 8 a 26 ng/m^3 , con una media di 17 ng/m^3 . Concentrazioni simili nel sud degli Stati Uniti vengono trovate da Samy et al. [66], che riporta un valore medio di 22 ng/m^3 . Zangrando et al. [34], in campionamenti nella città di Belgrado, riporta concentrazioni medie di L e D-amminoacidi di 73 ng/m^3 , sensibilmente più alte rispetto ai valori trovati in questo lavoro di tesi. Nello studio di Matos et al. [82] in base alle concentrazioni medie totali degli amminoacidi di molteplici studi, viene determinata la tipologia di area. Confrontando i valori riassunti da Matos et al. [82] le concentrazioni del presente lavoro sono caratteristiche di un contesto rurale. Un contesto urbano arriva a concentrazioni fino a 120 ng/m^3 , indicando un forte contributo antropogenico.

Considerando i singoli amminoacidi, Barbaro et al. [34] riporta la concentrazione media per 14 amminoacidi, analizzati come racemi, nella laguna di Venezia. Il confronto con le concentrazioni del presente lavoro, riportate con la somma di L e D-amminoacidi, è riportato nella Tabella 7.1. Si nota che la maggior parte delle concentrazioni disponibili dello studio citato, considerando le deviazioni standard, sono comparabili a quelle quantificate in questo lavoro di tesi, anche se tutti i valori medi risultano inferiori. Sia glicina che L-prolina risultano essere gli amminoacidi più concentrati, in accordo con i valori medi di letteratura [82].

Una visione generale delle abbondanze relative medie di tutti gli amminoacidi studiati in questo lavoro di tesi può essere data dalle percentuali relative sulla totalità degli amminoacidi studiati. In Figura 7.13 è riportata dunque l'abbondanza relativa media.

Tabella 7.1: Confronto con i valori medi di Barbaro et al. ^[34] espressi in ng/m^3

Composto	Barbaro et al.	Presente studio
Ala	3.2±1.7	2.0±0.1
Asn	4.2±3.8	0.7±0.1
Asp	2.6±1.8	0.58±0.05
Glu	4.8±2.8	1.8±0.2
Gly	6.0±4.4	3.6±0.4
4-Hyp	0.3±0.5	0.12±0.01
Leu/Ile	1.6±0.4	0.30±0.04
Met	BDL	BDL
Phe	0.5±0.5	0.15±0.02
Pro	5.0±6.8	3.4±0.8
Ser	1.6±1.1	0.4±0.1
Thr	0.3±0.3	0.12±0.01
Tyr	0.3±0.4	0.08±0.01
Val	0.4±0.4	0.18±0.02

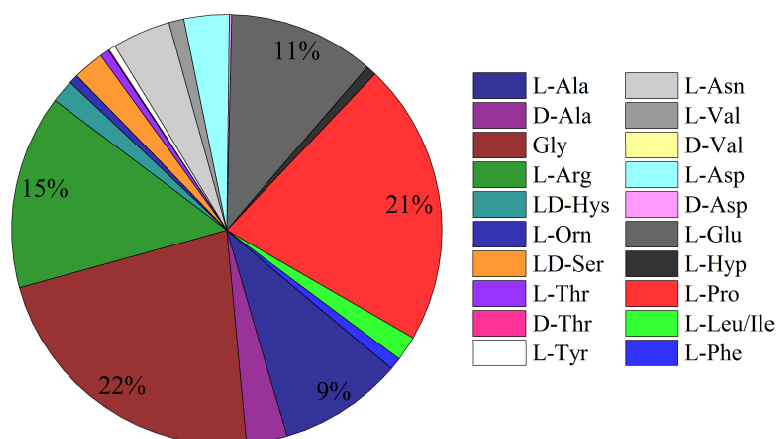


Figura 7.13: Abbondanza relativa media per L e D-amminoacidi

Il grafico a torta mostra come l'amminoacido a più alta concentrazione sia la glicina, segue L-prolina, L-arginina, acido L-glutammico e L-alanina. Gli altri amminoacidi sono al di sotto del 5%. Per meglio comprendere la distribuzione in ogni frazione di L e D-amminoacidi è riportata in Figura 7.14 la distribuzione relativa del campione del 19-22 aprile, preso come esempio. Infatti, le abbondanze relative in tutti i campionamenti sono pressoché stabili. Una distribuzione confrontabile e riproducibile delle varie frazioni può indicare sorgenti comuni, con diversa intensità di emissione nel tempo.

I grafici a torta mostrano come gli andamenti variano in maniera sostanziale nelle varie frazioni: nella frazione grossolana si ha maggior presenza, rispettivamente, di L-prolina, acido L-glutammico e L-arginina, mentre nelle frazioni fini ed ultrafini gli amminoacidi più abbondanti sono glicina, L-alanina e D-alanina. Queste distribuzioni possono indicare che i vari amminoacidi si differenziano all'interno della stessa sorgente.

In Figura 7.15 sono riportati gli andamenti dei L e D-amminoacidi nelle varie frazioni dimensionali per tutto il periodo di campionamento. Come evidenziato nei grafici a torta, la glicina è l'amminoacido più concentrato, seguito da L-prolina, L-arginina e acido L-glutammico. Come già anticipato, la L-prolina deriva da spore contenute nella cellula *ascus* e in quanto tale si distribuisce maggiormente nella frazione grossolana [79]. La L-prolina è caratterizzata da un aumento di concentrazione nel periodo che va da metà aprile ai primi di maggio, con l'aumento di emissione di spore fungine in atmosfera. Le alte concentrazioni della glicina, distribuite principalmente nella frazione fine (180nm - 1μm), possono essere dovute alla stabilità del composto (tempi di semi-vita superiori a 19 giorni) [80]. Metionina e tirosina, ad esempio, hanno tempi di semi-vita inferiori alle 2.5 ore, mentre fenilalanina e leucina hanno tempi di semi-vita che vanno dalle 21 alle 80 ore. La L-arginina segue una distribuzione dimensionale simile alla L-prolina, trovandosi principalmente nella frazione grossolana. Viene dunque emessa da sorgenti locali ed è prodotta dal ciclo dell'urea nei mammiferi [81], ma non è ancora ben chiaro il tipo di sorgente.

Glicina, acido glutammico, serina ed ornitina sono riconosciuti come gli amminoacidi più abbondanti nel *microlayer* marino: alte concentrazioni di questi amminoacidi potreb-

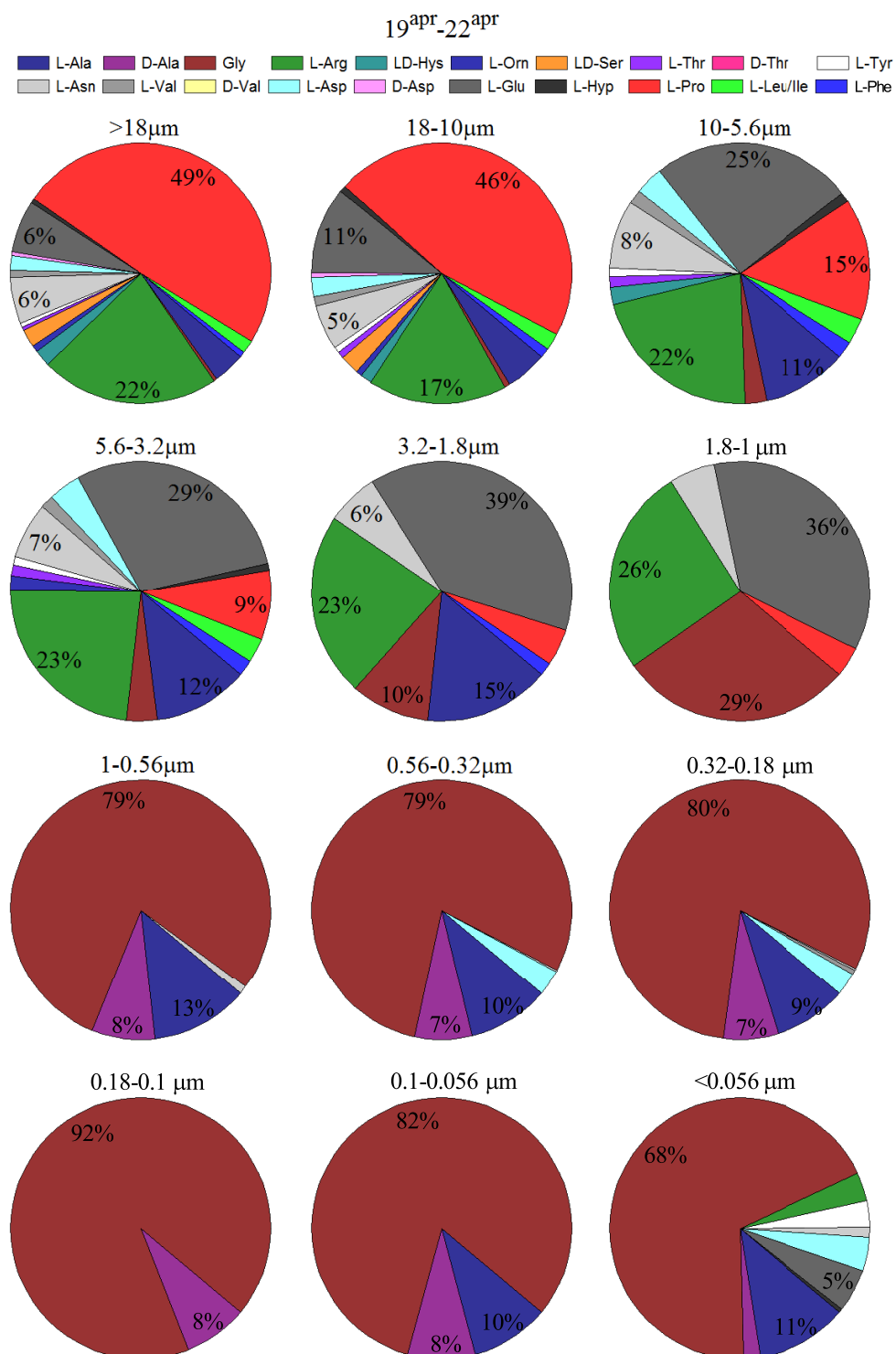


Figura 7.14: Distribuzione per ogni frazione nel campionamento del 19-22 aprile

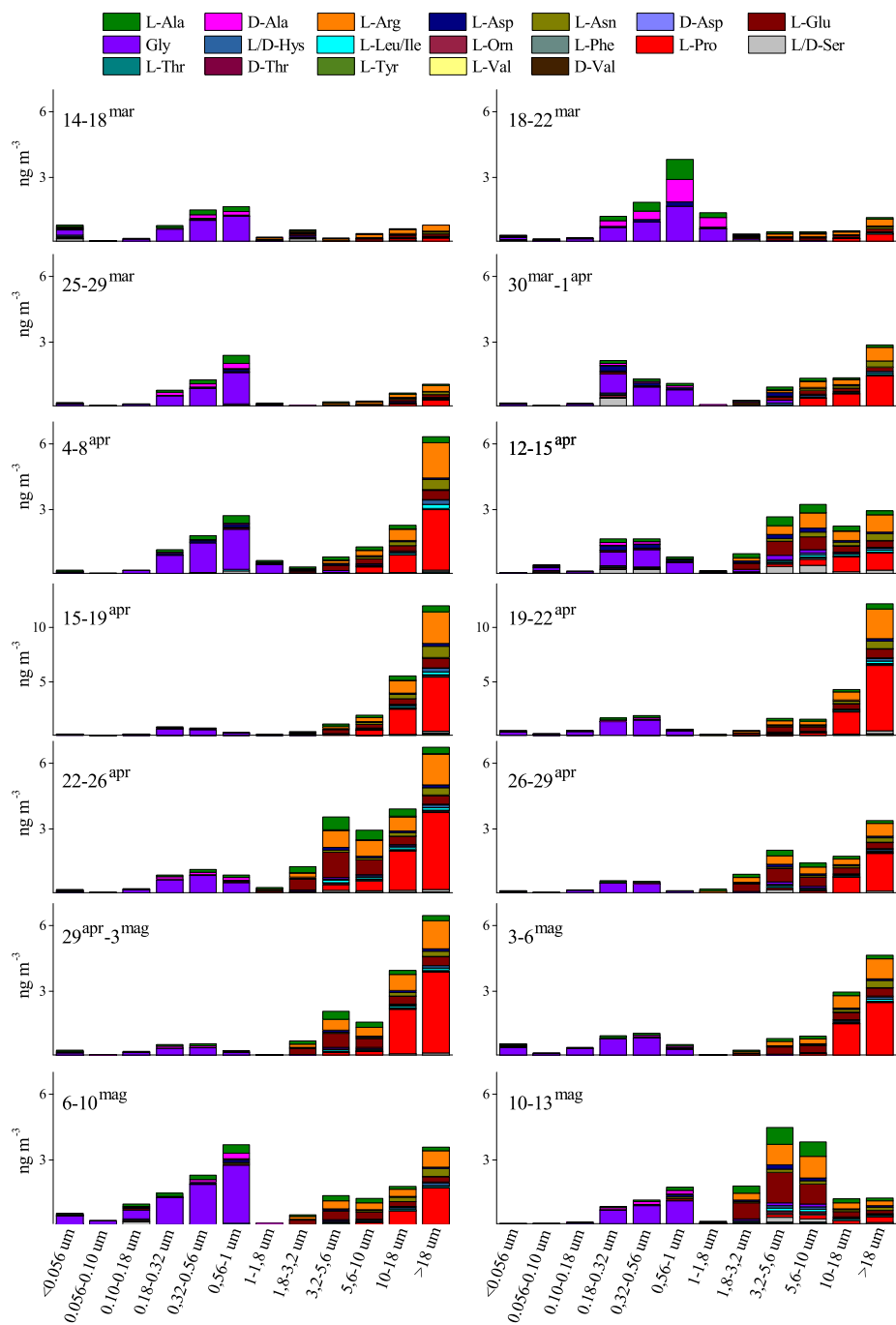


Figura 7.15: Andamenti per ogni campionamento in ng/m^3 per L e D-amminoacidi

bero indicare una prevalente origine marina [89]. Al fine di verificare se l'origine marina sia una possibile sorgente di aerosol, è possibile comparare gli amminoacidi appena descritti con la concentrazione di Clorofilla-a in mare. In Figura 7.16 è riportato l'andamento delle concentrazioni di Clorofilla-a della stazione di Campalto-Venezia, fornite dalla rete di monitoraggio per il controllo della qualità delle acque della laguna di Venezia, affiancata dagli andamenti mensili delle concentrazioni di glicina, acido L-glutammico, L/D-serina ed ornitina.

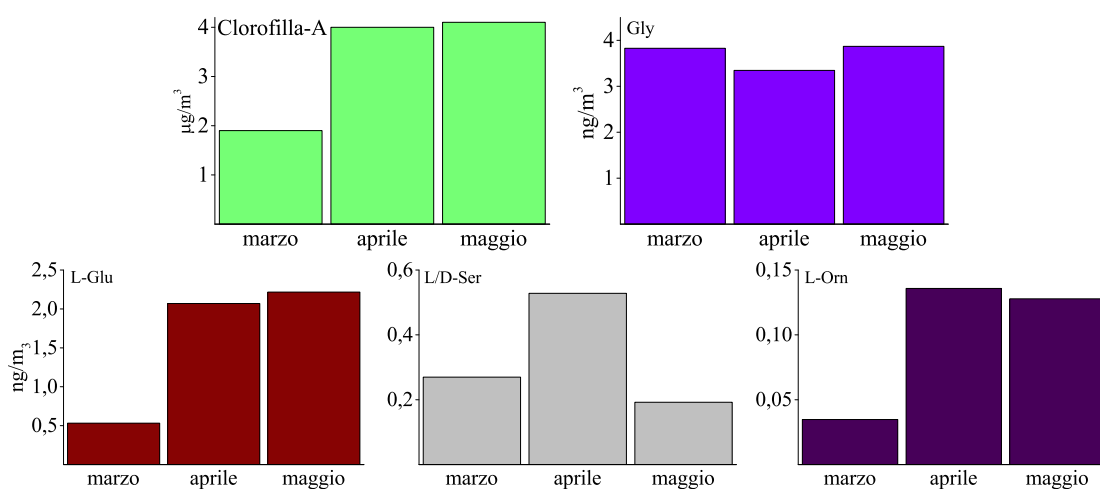


Figura 7.16: Andamenti delle concentrazioni mensili di Clorofilla-A in $\mu\text{g}/\text{L}$ e glicina, acido L-glutammico, L/D-serina e L-ornitina in ng/m^3

Si nota dalla Figura 7.16 come non ci sia correlazione tra glicina e L/D-serina con la Clorofilla-a, mentre vi è un andamento molto simile con l'acido L-glutammico e L-ornitina. La sorgente di acido L-glutammico e L-ornitina è dunque presumibilmente lo spray marino, mentre glicina e L/D-serina derivano da un altro tipo di sorgente.

E' inoltre molto importante lo studio dei D-amminoacidi: sono infatti prodotti da organismi che vivono negli abissi marini e presenti nelle pareti cellulari di alcuni batteri. Amminoacidi di tipo D inoltre sono stati trovati anche nel veleno di alcuni animali, come molluschi, oppure nelle secrezioni mucose di alcune specie anfibie. In Figura 7.17 sono riportati i quattro D-amminoacidi quantificati in questo lavoro di tesi. Dalla figura si

evince che la D-alanina è il D-amminoacido a maggiore concentrazione, mentre l'acido D-aspartico è al di sotto dei $0.1 \text{ ng}/\text{m}^3$. D-treonina e D-valina sono presenti in pochi campionamenti e per questo non vengono considerati rappresentativi. Si nota comunque come l'acido D-aspartico sia presente solo nella frazione grossolana, D-alanina e D-treonina nella frazione fine ed ultrafine, mentre D-valina solamente nella frazione ultrafine.

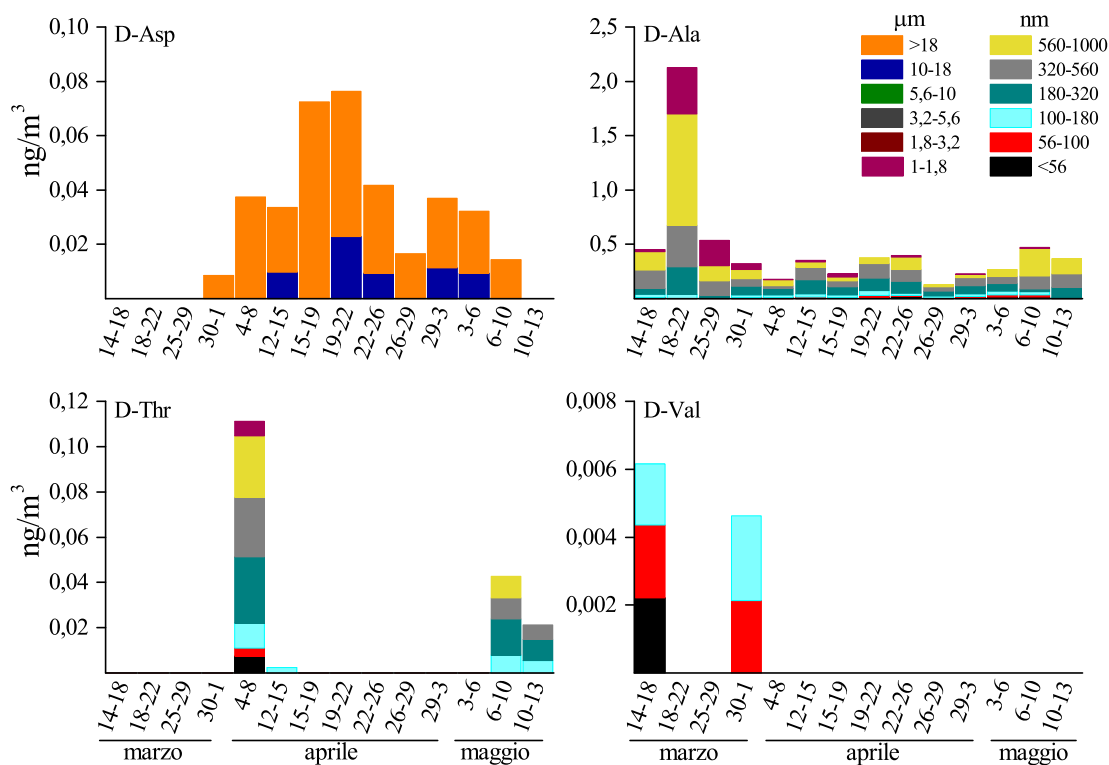


Figura 7.17: Andamenti per ogni campionamento nelle varie frazioni per D-Asp, D-Ala, D-Thr e D-Val

La maggior parte dei D-amminoacidi, quali D-arginina, D-asparagina, acido D-glutammico, D-ornitina, D-leucina e D-isoleucina, D-fenilalanina, D-prolina e D-tirosina non sono riportati perchè al di sotto del limite di quantificazione.

E' importante inoltre lo studio dei rapporti tra gli amminoacidi D/L. Kuznetsova et al. ^[90] descrive infatti i rapporti D/L-Asp e D/L-Ala. In campioni prelevati nella stazione di Dyfamed (Mondaco - FR) ed a Montauk (New York - USA) i rapporti D/L-Asp hanno

un range che va da 0.07 a 0.15, mentre i D/L-Ala vanno da 0.04 a 0.16. Kuznetsova et al. ^[90] inoltre presenta anche i rapporti D/L-Glu e D/L-Ser, non presi in considerazione in questo lavoro di tesi perchè l'acido D-Glutammico è al di sotto del limite di quantificazione, mentre L-Ser e D-Ser non sono stati separati. In Figura 7.18 sono riportati i rapporti D/L-Ala e D/L-Asp del presente studio per ogni campionamento.

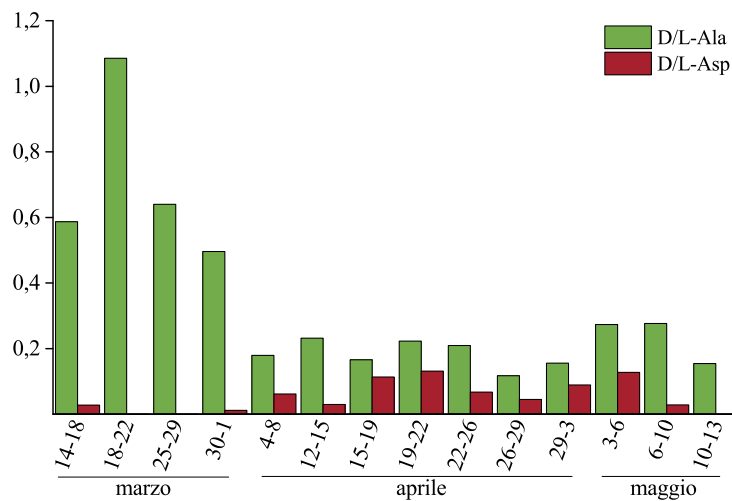


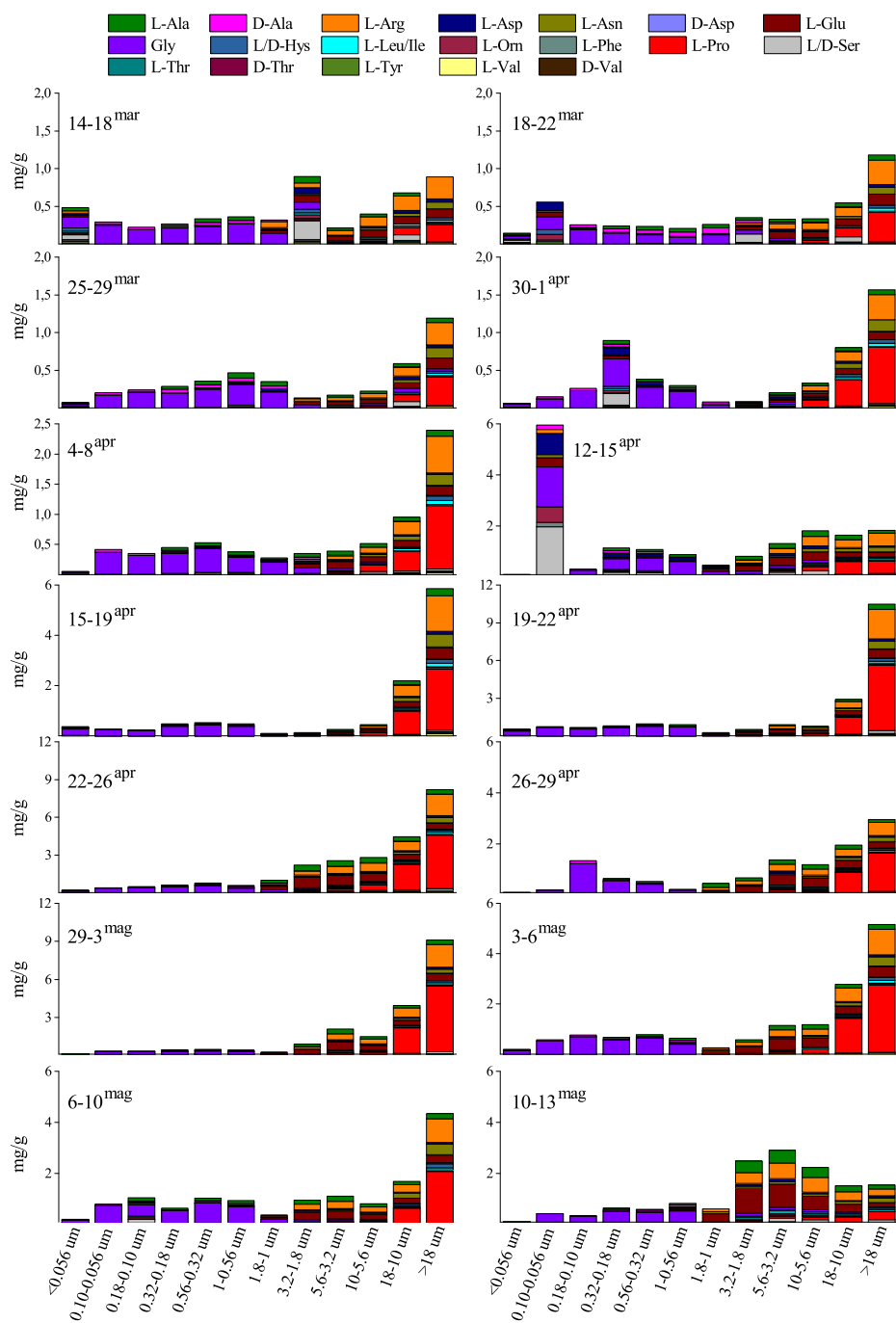
Figura 7.18: Rapporti D/L-Ala e D/L-Asp per ogni campionamento

In tutti i campionamenti si ha un maggiore rapporto di D/L-Ala rispetto a D/L-Asp: questo rispecchia il trend di Kuznetsova et al. ^[90]. Il maggior rapporto di D/L-Ala viene identificato anche in acque subsuperficiali e nel *microlayer*, che potrebbero dunque essere le sorgenti per gli amminoacidi presi in considerazione. Questo confermerebbe anche l'andamento dell'acido L-glutammico e L-ornitina, che presentano stessi andamenti della Clorofilla-A (Figura 7.16). Tuttavia, il range del rapporto D/L-Ala va da 0.12 a 1.09, mentre il rapporto D/L-Asp va da 0 a 0.13: mentre il D/L-Asp è in linea con i valori di Kuznetsova et al. ^[90], il rapporto D/L-Ala è molto superiore. Non è comunque chiaro se l'entità dei rapporti siano legati con la tipologia di sorgente; sicuramente rapporti D/L più elevati indicano che vi è una maggiore influenza batterica nel materiale proteico.

Un'altra sorgente per L e D-amminoacidi potrebbe essere data dal suolo e dalle polveri che ne derivano. Griffin et al. ^[91] infatti riporta la presenza di batteri e spore fungine

in Africa, durante eventi di tempeste di sabbia. Questo pare essere dovuto alla presenza di organismi biologici. Per comprendere però al meglio il contributo di questi organismi, in queste tipo di sorgenti, è necessario lo studio anche dei CAA (*Combinated Amino Acids*), non studiati in questo lavoro di tesi. E' da considerare che queste caratteristiche sono state riscontrate nel continente africano, direttamente influenzato dalla presenza di sabbia. Tuttavia è da considerare che, in generale, il suolo ha un contenuto relativamente basso di amminoacidi e composti proteici [82].

In Figura 7.19 sono riportati gli andamenti di L e D-amminoacidi in mg/g in tutto il periodo di campionamento. Lo studio dei dati in mg/g offre un punto di vista diverso: si notano infatti delle disparità con i dati riportati in ng/m^3 di Figura 7.15. Questo perchè i ng assoluti quantificati non vengono più rapportati ai m^3 ma al peso effettivo del particolato di ogni stadio dell'impattore. Si nota che le percentuali relative degli amminoacidi non cambiano per ogni stadio riportando i valori in mg/g o in ng/m^3 , cambiano però le concentrazioni di stadio in stadio, a causa del diverso peso di aerosol campionato.

Figura 7.19: Distribuzione per ogni frazione in mg/g

7.4 Andamenti dei metossifenoli

I composti fenolici sono prodotti dal *biomass burning*, basato principalmente sulla combustione di lignina, un biopolimero composto da alcool p-cumarilico, alcool coniferillico ed alcool sinapilico. Le abbondanze relative dei metossifenoli vanno inoltre ad indicare il tipo di lignina da cui deriva la combustione.

Le concentrazioni totali di metossifenoli rilevate in questo lavoro di tesi vanno da un valore minimo di 0.03 ng/m^3 ad un valore massimo di 0.59 ng/m^3 . Il valore medio risulta essere di 0.20 ng/m^3 . Nella Tabella 7.2 sono riportati i valori medi dei composti fenolici analizzati in vari ambienti urbani, confrontati con quelli del presente studio. Valori molto più bassi vengono monitorati in ambienti artici ed antartici, nei quali si hanno concentrazioni più basse di circa un ordine di grandezza ^[36]. La maggior parte degli studi confrontati interessano la stagione invernale che evidenziano concentrazioni più alte per la combustione di biomassa rispetto a quelle riportate in questo lavoro di tesi.

In Figura 7.20 è riportato il grafico a torta delle concentrazioni dei metossifenoli analizzati in questo studio.

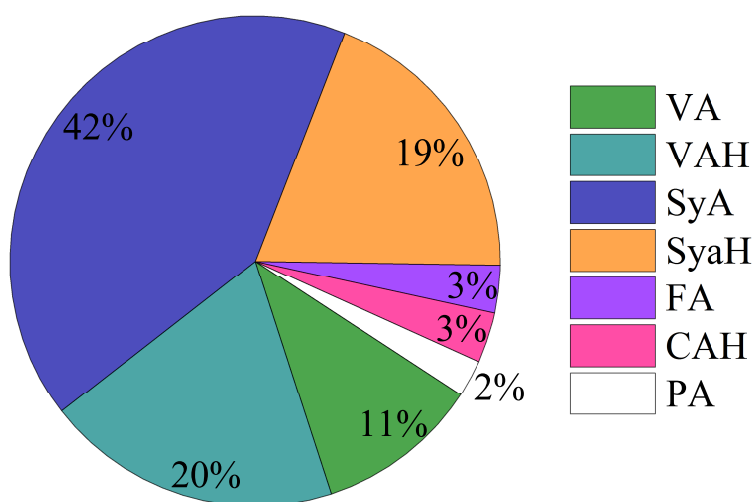


Figura 7.20: Abbondanza relativa media dei metossifenoli

Tabella 7.2: Confronto con i valori medi espressi in ng/m^3

Composto	Sito	Stagione	Conc. (ng/m^3)	Ref.
VAH	Missoula (MT)	<i>smoke events</i>	2.27-18.9	Ward et al. ^[83]
	Belgrade (SRB)	inverno	1.3	Zangrando et al. ^[84]
	Mestre (ITA)	primavera	0.3	presente studio
VA	Libby (MT)	inverno	68.4	Ward et al. ^[83]
	Belgrade (SRB)	inverno	1.3	Zangrando et al. ^[84]
	Oporto (P)	inverno	120	van Drooge et al. ^[85]
	Copenhagen (DK)	inverno	40	van Drooge et al. ^[85]
	Amsterdam (NL)	inverno	360	van Drooge et al. ^[85]
	Vienna (A)	annuale	120-160	Caseiro et al. ^[86]
	Graz (A)	annuale	250-480	Caseiro et al. ^[86]
	Mestre (ITA)	primavera	0.15	presente studio
SYAH	Dettenhausen (D)	inverno	15.2	Bari et al. ^[88]
	Libby (MT)	inverno	5.8	Ward et al. ^[83]
	Denver (CO)	annuale	1.2	Simpson et al ^[87]
	Seattle (WA)	autunno	0.09-0.27	Simpson et al ^[87]
	Belgrade (SRB)	inverno	4.4	Zangrando et al. ^[84]
	Mestre (ITA)	primavera	0.3	presente studio
SYA	Belgrade (SRB)	inverno	1.8	Zangrando et al. ^[84]
	Mestre (ITA)	primavera	0.6	presente studio
FA	Belgrade (SRB)	inverno	0.5	Zangrando et al. ^[84]
	Mestre (ITA)	primavera	0.045	presente studio
CAH	Belgrade (SRB)	inverno	1.2	Zangrando et al. ^[84]
	Seattle (WA)	autunno	0.42	Simpson et al ^[87]
	Mestre (ITA)	primavera	0.048	presente studio

I metossifenoli più concentrati sono acido sirringico, vanillina, siringaldeide, acido vanillico, acido ferulico, coniferil aldeide e acido p-cumarico. L'abbondanza relativa è in linea con i principali metossifenoli prodotti dalla combustione da *softwood*, in particolare da alberi decidui (alberi che nella stagione invernale perdono le foglie per fenomeni di abscissione) indicati da Oros et al. [48]. L'acido isovanillico è al di sotto del limite di rilevabilità in tutti i campioni. E' interessante inoltre vedere la variazione delle abbondanze relative nelle varie frazioni dimensionali. In Figura 7.21 sono riportate le percentuali dei metossifenoli più abbondanti nelle varie frazioni per il periodo di campionamento dal 18 al 22 aprile, preso come esempio perchè è uno dei periodi di campionamento a maggior concentrazione di metossifenoli e dunque più rappresentativo.

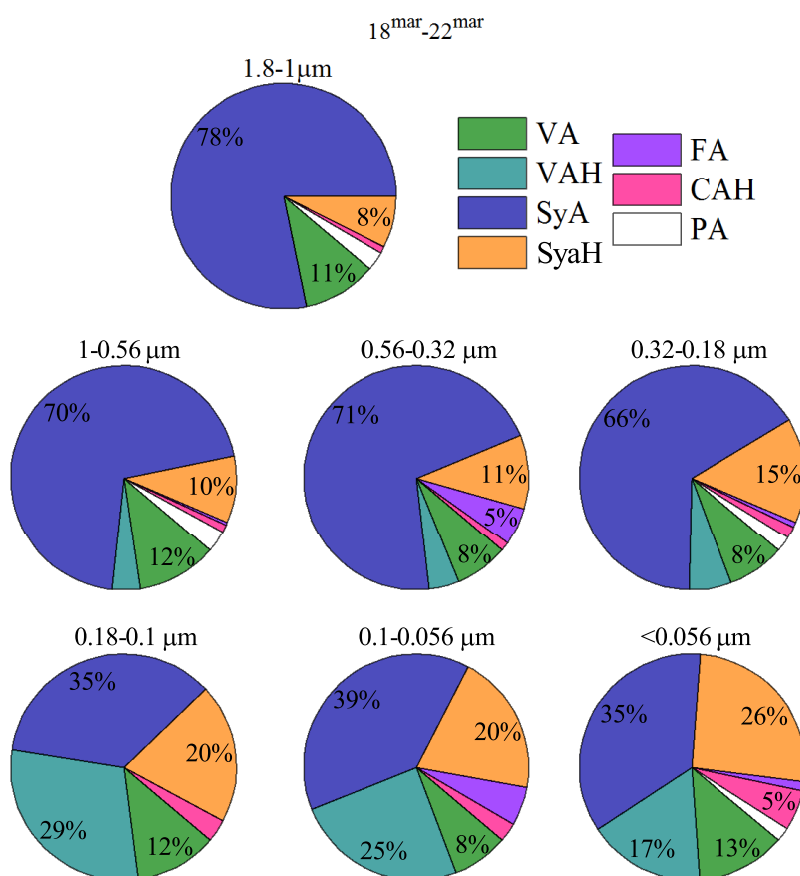


Figura 7.21: Abbondanza relativa nelle varie frazioni dei metossifenoli, periodo di campionamento 18-22 aprile

Nella figura non viene riportata la frazione grossolana da $1.8 \mu m$ a $>18 \mu m$, in quanto la presenza di composti fenolici nella frazione *coarse* è al di sotto dell'MDL. Si nota come in questo caso l'acido siringico diminuisca al diminuire del diametro delle particelle. Trend inverso invece hanno siringaldeide e coniferil aldeide. La vanillina si trova invece principalmente nella frazione ultrafine ($< 0.18 \mu m$), mentre acido vanillico, acido p-cumarico ed acido fumarico hanno un andamento pressoché costante. Gli andamenti nelle diverse frazioni degli altri periodi di campionamento, rispetto all'esempio riportato, sono pressoché comparabili. Come nel caso degli amminoacidi, una distribuzione confrontabile e riproducibile nelle varie frazioni nei diversi campionamenti può indicare sorgenti comuni, ma diversa intensità di emissione nel tempo.

L'andamento delle concentrazioni dei composti fenolici analizzati sono riportati in Figura 7.22, in cui vi è la somma dei metossifenoli per ogni frazione dimensionale.

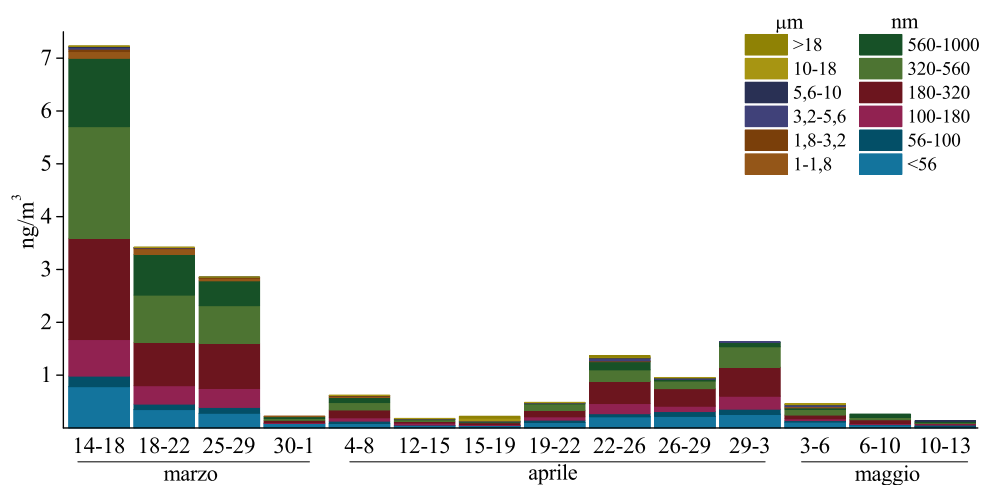


Figura 7.22: Variazione delle concentrazioni in ng/m^3 dei metossifenoli totali durante il periodo di campionamento

L'andamento è caratterizzato da due periodi in cui le concentrazioni risultano più elevate: dal 14 al 30 marzo e dal 22 aprile al 3 maggio. L'andamento di fine marzo può corrispondere all'interruzione dei riscaldamenti domestici a legna. Questo ne provoca infatti una brusca diminuzione. Una possibile spiegazione del rialzo che caratterizza il

periodo dal 22 aprile al 3 maggio viene data considerando le festività che lo contraddistinguono. Il sostanzioso numero di barbeque e grigliate, infatti, può contribuire all'aumento delle concentrazioni appena descritto. Una conferma delle ipotesi appena effettuate può essere data dagli andamenti del levoglucosan. E' un monosaccaride anidro (1,6-anidro- β -D-glucopiranosio) prodotto durante i processi di pirolisi della cellulosa a temperature elevate ($>300^\circ$) e riconosciuto come tracciante per la combustione di biomassa [92]. In Figura 7.23 sono riportati gli andamenti delle concentrazioni del levoglucosan durante il periodo di campionamento¹.

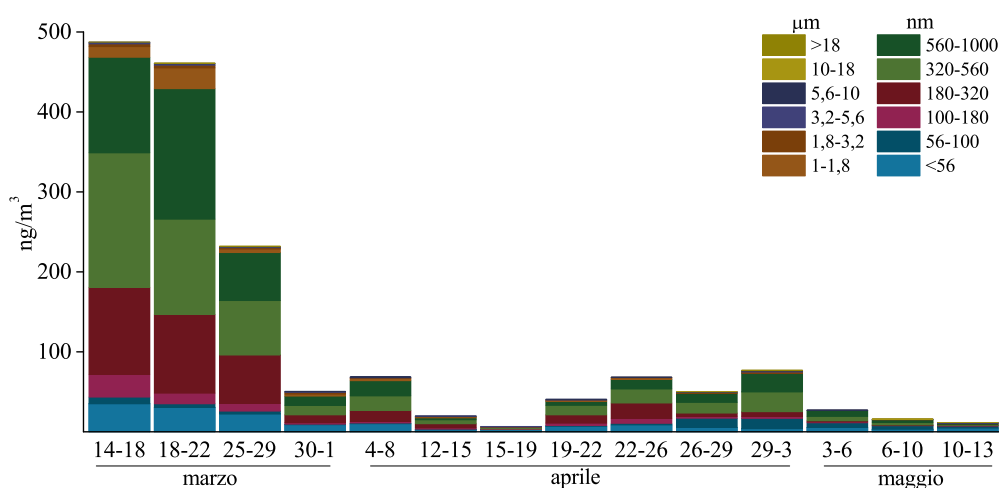


Figura 7.23: Variazione delle concentrazioni in ng/m^3 del levoglucosan totali durante il periodo di campionamento

Si nota come i due andamenti di Figura 7.22 e Figura 7.23 siano molto simili. Questo conferma la provenienza da *biomass burning* dei metossifenoli e le supposizioni fatte precedentemente.

Un importante valutazione del comportamento nel tempo dei metossifenoli analizzati consiste nel considerare i metossifenoli vanillici, indicati con la lettera V (somma di VA e VAH), siringici, indicati con S (somma di SYA e SYAH) e cinnamici, indicati con C (PA + FA). I fenoli vanillici sono prodotti principalmente dalla degradazione di *softwood* ed

¹Dati non ancora pubblicati

hardwood, i fenoliiringici vengono prodotti dalla combustione di *hardwood* e quelli cinnamici sono associati principalmente alle piante erbacee [93]. In Figura 7.24 sono riportati i valori di S, V e C prendendo in considerazione il TSP.

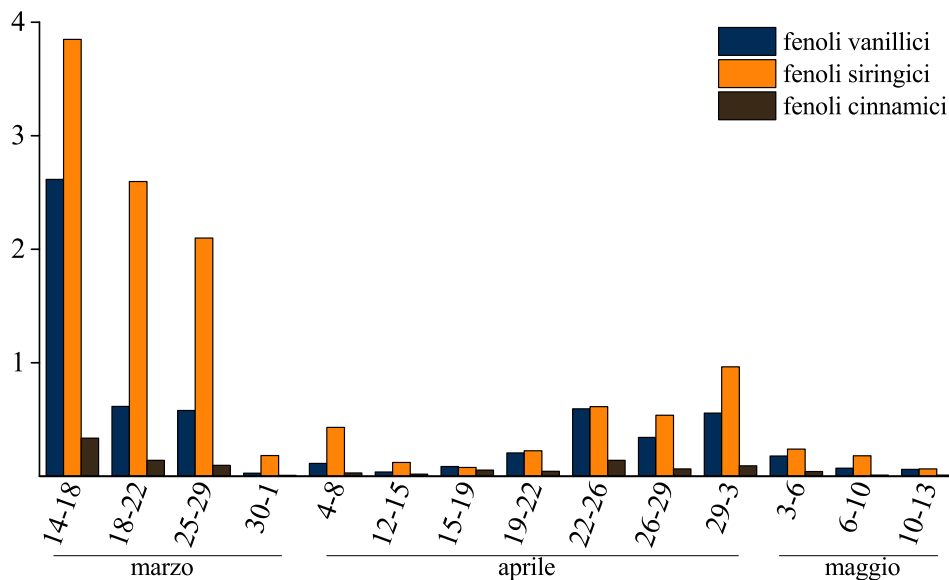


Figura 7.24: Fenoli vanillici,iringici, cinnamici totali per ogni campione

Si nota dalla figura come i fenoliiringici siano costantemente superiori a vanillici e cinnamici. Questo significa che la maggior parte della combustione da biomassa deriva da *hardwood*, cioè da angiosperme, piante evolute con fiore e seme protetto. Questo viene confermato anche dai rapporti S/V e C/V , che rispettivamente indicano il contributo relativo di angiosperme o gimnosperme (se maggiore di 1 denota la prevalenza di latifoglie) e il contributo relativo dei tessuti erbacei (più alto è il rapporto maggiore è la presenza di lignina erbacea). Inoltre, i rapporti tra acidi e rispettive aldeidi indicano invece il grado di ossidazione del sistema: vengono presi in considerazione i rapporti acido vanillico/vanillina e acidoiringico/iringaldeide. In Tabella 7.3 sono riportati tutti i valori appena descritti.

Il rapporto S/V , essendo quasi sempre maggiore di 1, indica il contributo di angiosperme, mentre i bassi valori di C/V indicano il basso contributo della lignina erbacea.

Il rapporti acido/aldeide sono, nello specifico, indicatori di ossidazione biologica, nonostante sia stato dimostrato che la luce solare possa provocarne una sostanziale variazione

Tabella 7.3: S/V, C/V, VA/VAH e SYA/SYAH per ogni periodo di campionamento

Periodo	S/V	C/V	VA/VAH	SYA/SYAH
14-18 marzo	1.5	0.1	0.7	1.1
18-22 marzo	4.2	0.2	1.1	4.4
22-29 marzo	3.6	0.2	0.8	4.4
30 marzo-1 aprile	6.6	0.3	1.7	3.7
4-8 aprile	3.8	0.3	0.8	2.4
12-15 aprile	3.2	0.5	0.3	2.5
15-19 aprile	0.9	0.6	0.5	2.2
19-22 aprile	1.1	0.2	0.2	1.2
22-26 aprile	1.0	0.2	0.6	2.0
26-29 aprile	1.6	0.2	0.2	2.8
29 aprile-3 maggio	1.7	0.2	0.2	2.1
3-6 maggio	1.3	0.2	0.1	1.8
6-10 maggio	2.5	0.1	0.2	2.1
10-13 maggio	1.1	0.2	0.5	4.4

portando a lignine altamente ossidate ^[39]. Si nota come i valori di VA/VAH siano quasi sempre minori di 1, mentre SYA/SYAH è sempre abbondantemente sopra a 1. Shakya et al. ^[94] afferma che se i valori dei rapporti acido/aldeide sono superiori a 0.5, le reazioni in atmosfera dei metossifenoli non dipendono solo da fotoossidazione, ma anche da ossidazione batterica di tessuti vegetali o da degradazioni fungine.

In Figura 7.25 sono riportati gli andamenti dei metossifenoli per tutto il periodo di campionamento. Si nota come i metossifenoli siano principalmente presenti nella frazione fine ed ultrafine e come il composto fenolico maggiormente presente sia l'acido sirringico. Infine, in Figura 7.26 sono riportati gli andamenti in mg/g . La diversa unità di misura in questo caso presenta risultati molto differenti rispetto alle concentrazioni in ng/m^3 . Resta comunque chiaro come tutti i metossifenoli siano pressoché assenti nella frazione *coarse*.

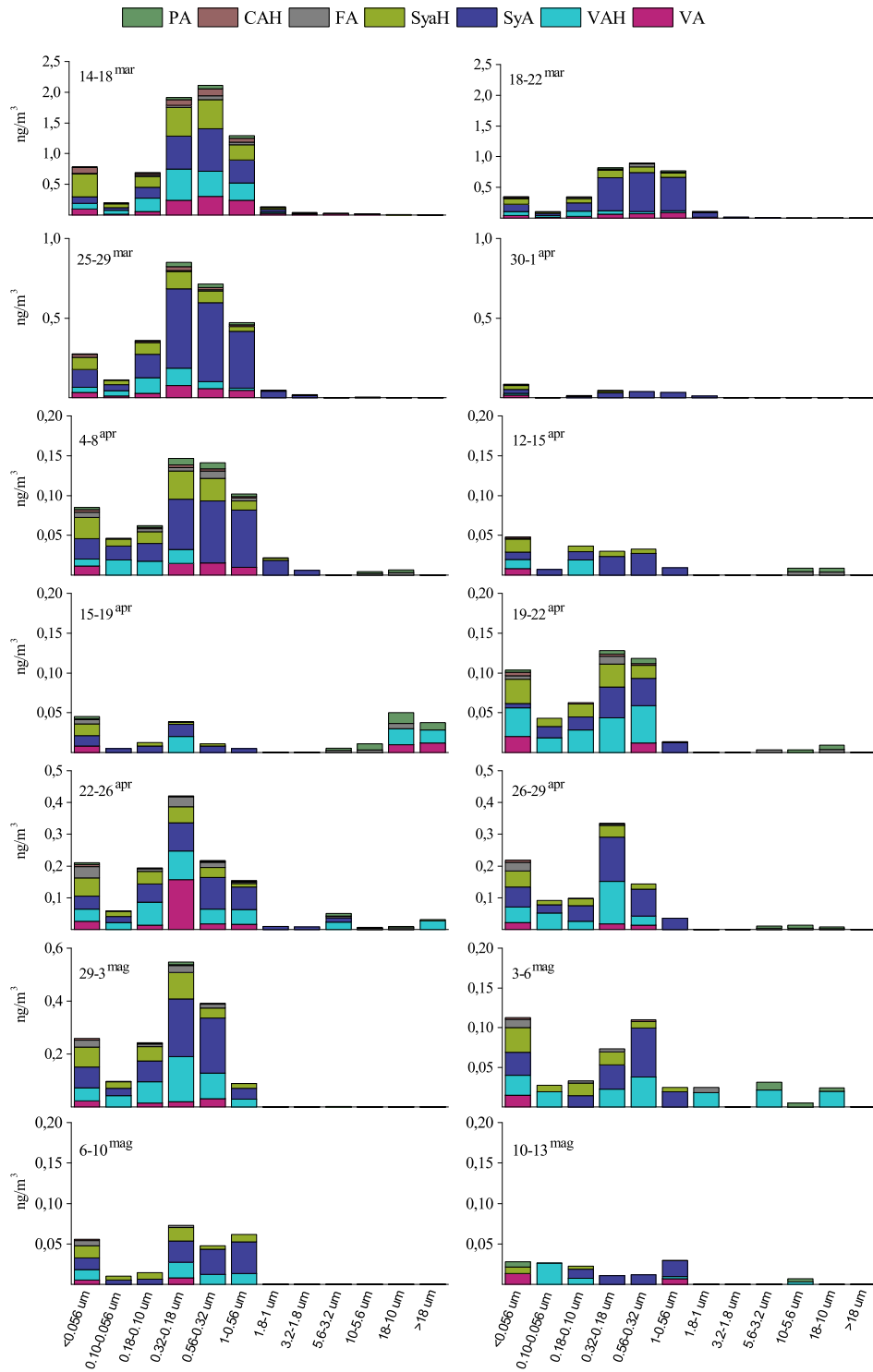


Figura 7.25: Andamenti per ogni campionamento in ng/m^3 per i metossifenoli

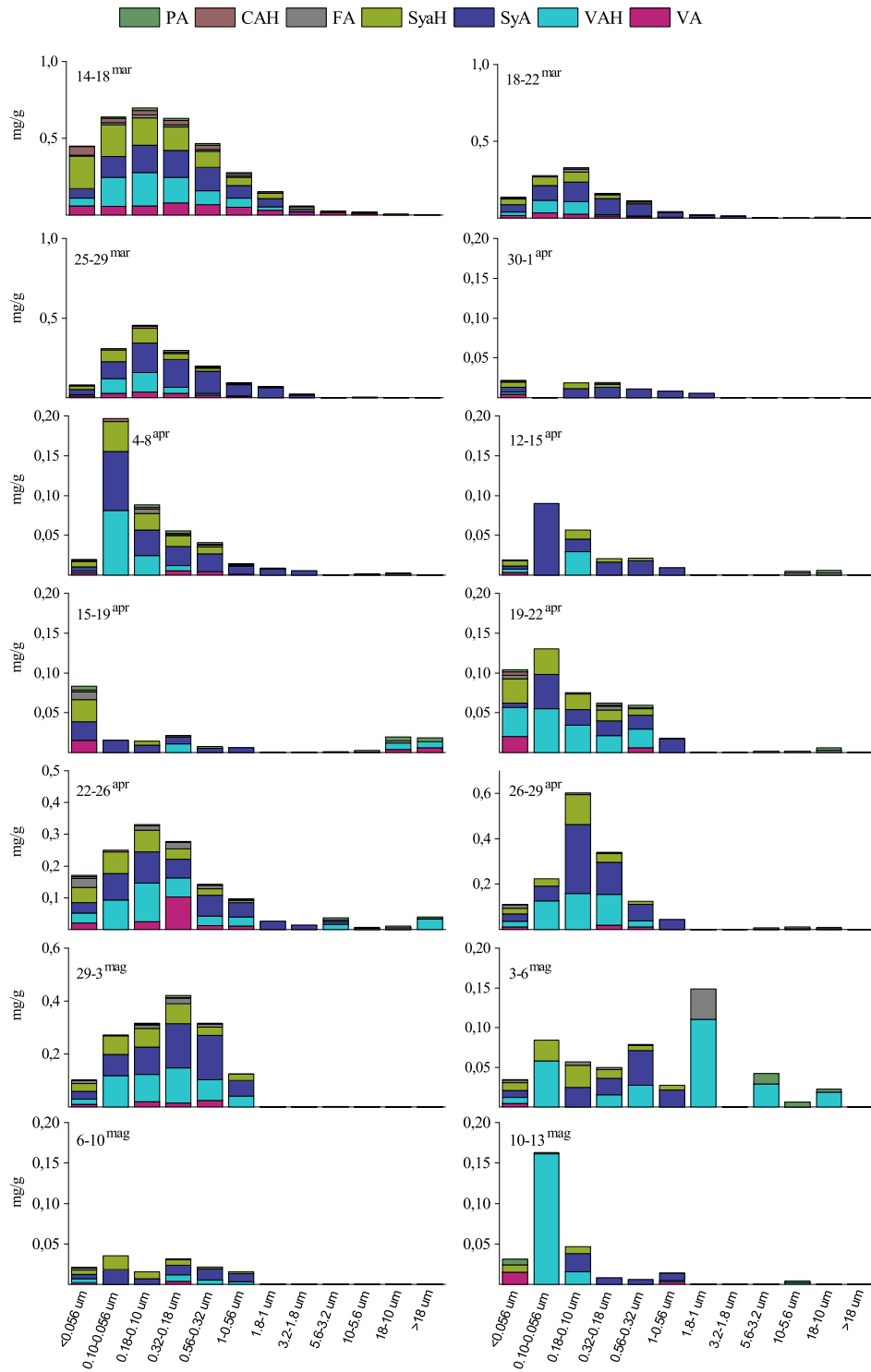


Figura 7.26: Andamenti per ogni campionamento in *mg/g* per i metossifenoli

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato proposto e validato un metodo per la determinazione di acido cis-pinonico ed acido pinico tramite HPLC/ESI/MS-MS. La messa a punto del metodo per acido cis-pinonico ed acido pinico è stata affrontata inizialmente attraverso l'ottimizzazione del metodo strumentale, utilizzato poi per la validazione della metodologia preanalitica in campioni di aerosol atmosferico. Il metodo sviluppato ha consentito di definire limiti di rilevabilità strumentali pari a 1.6 e 1.2 ng/L per, rispettivamente, acido cis-pinonico e pinico. Ad oggi, questi valori sono i più bassi limiti presenti in letteratura. Inoltre, sono stati analizzati i composti fenolici derivanti da *biomass burning* ed L e D-amminoacidi, molecole di origine biogenica. La validazione per tutti gli analiti in esame è stata effettuata tramite stime di accuratezza, precisione, resa, range di linearità, MDL ed MQL.

Le percentuali di estrazione per tutti gli analiti studiati variano dal 54% al 100%, con un errore medio e coefficiente di variazione al di sotto del 10%. L'MDL per acido cis-pinonico ed acido pinico va da valori di 0.7 a 2.3 ng assoluti, mentre per amminoacidi e metossifenoli variano da 0.01 a 13.1 ng assoluti. Il filtro in quarzo, rispetto al disco in alluminio, presenta rese di estrazione migliori, ma con MDL leggermente più elevati.

Le analisi sono state effettuate in campioni di aerosol atmosferico raccolto sulla sommità dell'Edificio Delta all'interno del Campus Scientifico di via Torino (Mestre-Venezia) nel periodo compreso tra marzo e maggio 2016. Il campionatore utilizzato MOUDI II ha reso possibile la separazione dimensionale in 12 stadi, da $<0.056 \mu m$ a $>18 \mu m$.

I risultati del lavoro presentano range di concentrazioni e valori medi molto simili tra acido cis-pinonico ed acido pinico (range da 0.1 a 0.8 ng/m^3 , valore medio nell'intorno di 300 pg/m^3). Rispetto ai valori di letteratura le concentrazioni si presentano inferio-

ri di circa un ordine di grandezza, a causa del sito di campionamento non direttamente influenzato dalla presenza di conifere. E' stato visto che l'acido cis-pinonico è principalmente presente nella frazione ultrafine ($< 0.056 \mu m$), mentre l'acido pinico risulta essere distribuito in maniera più o meno omogenea in tutte le varie frazioni dell'aerosol. L'acido cis-pinonico mostra inoltre una proporzionalità diretta con la temperatura, mentre altri agenti atmosferici risultano meno correlabili. Sapendo che l'acido pinico viene degradato microbiologicamente in pochi giorni, è stato messo in relazione con la L-prolina (presente in cellule contenenti spore) e con l'acido D-aspartico (presente nei batteri), evidenziando una proporzionalità inversa che afferma l'ipotesi di degradazione microbiologica.

Il range di concentrazioni totali per ogni campionamento di L e D-amminoacidi varia da 8 a 26 ng/m^3 , con una media di 17 ng/m^3 . Le concentrazioni sono confrontabili con studi pregressi nella laguna di Venezia. Lo studio di L e D-amminoacidi ha dimostrato che l'amminoacido a più alta concentrazione è la glicina, segue L-prolina, L-arginina, acido L-glutammico e D-alanina. Le alte concentrazioni della glicina, principalmente presente nella frazione fine (180 nm - 1 μm), possono essere dovute alla stabilità del composto, mentre la L-prolina, come precedentemente detto, deriva da spore contenute nella cellule *ascus* e in quanto tale si distribuisce maggiormente nella frazione grossolana. L-arginina infine segue una distribuzione dimensionale simile alla L-prolina, trovandosi principalmente nella frazione *coarse*. Attraverso un confronto con l'andamento della Clorofilla-a, è stata individuato lo spray marino come probabile sorgente per acido L-glutammico ed L-ornitina.

Le concentrazioni totali di metossifenoli rilevate in questo lavoro di tesi vanno da un valore minimo di 0.03 ng/m^3 ad un valore massimo di 0.59 ng/m^3 . Il valore medio risulta essere di 0.20 ng/m^3 . La maggior parte degli studi confrontati interessano la stagione invernale ed evidenziano concentrazioni più alte per la combustione di biomassa rispetto a quelle riportate in questo lavoro di tesi. I metossifenoli più concentrati sono acido sirinico, vanillina, sirinaldeide, acido vanillico, acido ferulico, coniferil aldeide e acido p-cumarico. L'abbondanza relativa è in linea con i principali metossifenoli prodotti dalla combustione da *softwood*, in particolare da alberi decidui. Gli andamenti dei composti fenolici totali nel periodo di campionamento denotano una brusca diminuzione delle concentrazioni da

metà a fine marzo, in corrispondenza dell'interruzione dei riscaldamenti domestici a legna, ed un rialzo che caratterizza il periodo dal 22 aprile al 3 maggio, probabilmente dovuto ai barbeque delle festività, come confermato dall'andamento del levoglucosan.

Appendice A



Figura A.1: I 12 stadi del campionatore con la testata (in alto a sinistra), lo stadio di fondo per l'aspirazione (in basso al centro) e tutti gli alloggiamenti per il posizionamento dei dischi in alluminio (a destra)



Figura A.2: Il filtro posizionato in sede sulla sinistra e l'undicesimo stadio sulla destra



Figura A.3: L'impattore assemblato e inserito nell'alloggiamento (a sinistra ed al centro) e l'alloggiamento chiuso

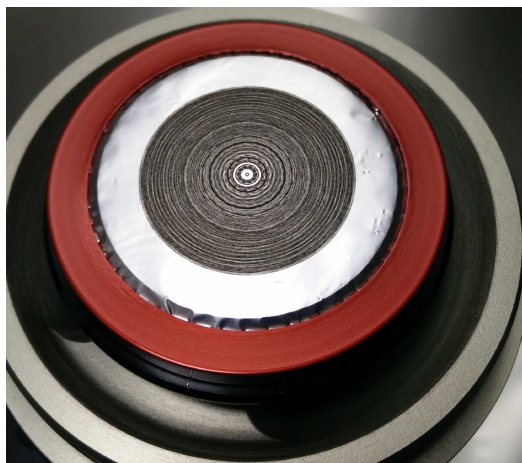


Figura A.4: L'aerosol depositato nello stadio numero 9 dopo un campionamento di tre giorni

Appendice B

Tabella B.1: Transizioni in Q1 e in Q3 e relativi parametri per L e D-amminoacidi. Il valore di EP è di 10 Volt, in grassetto sono riportati i valori usati per la quantificazione degli analiti

Composto	precursore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	CE	CXP
L-/D-Ala	$[M + H]^+$	90	44	32	17	7
L-/D-Arg	"	175.1	70	53	33	13
			116		21	21
L-/D-Asp	"	134.0	74	34	21	13
			88		15	13
L-/D-Asn	"	133.1	74	35	22	7
			87		13	8
L-/D-Glu	"	148.1	84	40	24	16
			130		14	23
Gly	"	76.0	76	33	6	11
			30		17	4
L-/D-Hyp	"	132.1	68	47	31	6
			86		21	7
L-/D-Hys	"	156.1	110	46	20	20
			83		36	15
L-/D-Leu/Ile	"	132.1	86	41	15	16
			69		26	13
L-/D-Met	"	150.1	104	39	15	16
			133		15	23
L-/D-Orn	"	133.1	70	45	24	11
			116		12	15

Composto	precursore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	CE	CXP
L-/D-Phe	[M + H] ⁺	166.1	120	43	18	22
			103		38	19
L-/D-Pro	"	116.1	70	42	24	13
L-/D-Ser	"	106.0	60	34	17	10
			88		15	16
L-/D-Thr	"	120.1	103	78	26	18
			77		36	14
L-/D-Tyr	"	182.1	165	43	15	15
			136		21	12
L-/D-Val	"	118.1	72	35	17	13
			55		30	10
L-Ala ¹³ C ₃	"	93.1	60	37	19	8
L-Arg ¹³ C ₆	"	181.1	74	55	21	7
			121		21	11
L-Asp ¹³ C ₄	"	138.1	76	42	22	7
			91		15	10
L-Glu ¹³ C ₅	"	153.1	135	39	13	12
			106		19	10
L-Leu ¹³ C ₁	"	133.1	86	45	16	7
			44		31	8
L-Phe ¹³ C ₁	"	167.1	121	51	19	11
			104		38	10
L-Pro ¹³ C ₁	"	117.1	70	40	24	6
			68		41	6
L-Val ¹³ C ₁	"	119.1	72	45	18	6
			55		29	5

Tabella B.2: Transizioni in Q1 e in Q3 e relativi parametri per i metossifenoli. In grassetto sono riportati i valori usati per la quantificazione degli analiti, che in questo caso corrispondono alle transizioni più intense

Composto	precursore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	EP	CE	CXP
VA/IVA	$[M - H]^-$	166.9	151.9 107.8	-51	-10	-19 -28	-10 -9
VAH	"	150.9	135.8 92.0	-50	-10	-18 -27.5	-11 -6
SYA	"	181.8	151.9 121.0	-47	-10	-16 -22.7	-15 -8.5
SYAH	"	180.9	165.8 150.9	-42	-10	-18 -25	-12 -12
SYAH	"	180.9	165.8 150.9	-42	-10	-18 -25	-12 -12
FA	"	193.0	177.9 133.8	-42	-10	-18 -21	-11 -12
CAH	"	161.9	177.9 133.8	-41	-10	-19.3 -28.1	-12.5 -9
p-CA	"	162.9	92.8 119.2	-52	-4	-17 -42	-8 -7
VA* $^{13}\text{C}_1$	"	167.8	152.7 107.8	-51	-10	-19 -28	-12 -9
VAH* $^{13}\text{C}_6$	"	156.9	141.8 96.9	-54	-10	-19 -28	-8 -8.8

Appendice C

Tabella C.1: Composto e rispettivo marcato, pendenza, intercetta, R^2 , range di linearità minimo e massimo, LOD e LOQ per amminoacidi e metossifenoli

Composto	Marcato	Pendenza	Intercetta	R^2	Range di linearità $\mu g/L$	LOD ng/L	LOQ ng/L
L-alanina	Ala*	0.649	0.096	0.999	0.0115 - 57.5	2	6.6
D-alanina	Ala*	1.575	0.076	0.999	1 - 62.5	300	1000
L-arginina	Arg*	3.964	0.203	0.998	0.0155 - 77.5	2.7	9.1
D-arginina	Arg*	4.543	-0.109	0.999	0.0137 - 55	412	1375
L-asparagina	Val*	0.139	-0.002	0.999	0.0169 - 50	5.1	16.9
D-asparagina	Val*	0.444	-0.002	0.999	0.0525 - 52.5	15.8	52.5
L-acido aspartico	Asp*	0.797	0.132	0.999	0.014 - 70	2.7	9
D-acido aspartico	Asp*	0.118	2.220	1	0.045 - 45	10.8	36
L-acido glutammico	Glu*	3.158	0.157	0.999	0.012 - 60	1.3	4.3
D-acido glutammico	Glu*	5.154	-0.093	0.999	0.0857 - 65	55.7	85.7
Glicina	Ala*	0.046	0.007	0.998	0.0132 - 57.5	4	13.2
<i>t</i> -4-Idrossi-L-prolina	Pro*	2.458	0.266	0.997	0.0105 - 52.5	1.3	4.3
<i>t</i> -4-Idrossi-D-prolina	Pro*	1.358	0.018	0.999	0.0788 - 52.5	78.8	272.5
LD-istidina ^o	Arg*	7.162	1.214	0.999	0.022 - 110	2	6.6
L-leucina/isoleucina	Leu*	0.645	0.179	0.997	0.026 - 130	2.6	8.8
D-leucina/isoleucina	Leu*	0.585	0.054	0.999	0.0301 - 102.5	9	30.1
L-metionina	Leu*	0.192	0.002	0.999	0.1429 - 70	42.9	142.9
D-metionina	Leu*	0.103	0.001	0.999	0.250 - 55	75	250
L-ornitina	Arg*	4.653	0.595	0.998	0.0095 - 47.5	0.4	1.3

^oPer la coppia L-istidina e D-istidina, L-serina e D-serina e per leucina ed isoleucina, il metodo cromatografico non ha reso possibile la separazione

Composto	Marcato	Pendenza	Intercetta	R ²	Range di linearità $\mu\text{g/L}$	LOD ng/L	LOQ ng/L
D-ornitina	Arg*	4.406	0.197	0.997	0.2149 - 65	64.5	214.9
L-fenilalanina	Phe*	18.900	0.640	0.997	0.012 - 60	3.5	11.7
D-fenilalanina	Phe*	1.813	0.023	0.999	0.01 - 50	8.6	28.6
L-prolina	Pro*	2.012	0.072	0.999	0.01 - 50	1.5	4.9
D-prolina	Pro*	0.713	0.050	0.999	0.6667 - 80	200	666.7
LD-serina	Arg*	5.411	5.857	0.994	0.026 - 130	0.5	1.5
L-treonina	Arg*	2.196	0.217	0.999	0.05 - 75	4.8	16.1
D-treonina	Arg*	2.638	0.210	0.998	0.220 - 55	66	220
L-tirosina	Arg*	3.455	0.417	0.997	0.0156 - 47.5	4.7	15.6
D-tirosina	Arg*	5.768	0.303	0.998	0.3387 - 52.5	101.6	338.7
L-valina	Val*	1.390	0.158	0.998	0.014 - 70	0.8	2.7
D-valina	Val*	2.619	0.035	0.999	0.2143 - 45	64.3	214.3
acido vanillico	VA*	0.683	0.052	0.996	0.01 - 50	1.1	3.9
acido isovanillico	VA*	0.239	0.014	0.994	0.043 - 50	13.0	43.5
vanillina	VAH*	1.420	0.067	0.997	0.0125 - 62.5	2.7	9.12
acido siringico	VAH*	0.170	0.001	0.999	0.0217 - 50	6.5	21.7
siringaldeide	VAH*	0.682	0.009	0.999	0.016 - 57.5	5	16
acido ferulico	VA*	1.248	0.130	0.992	0.013 - 65	3	7.8
coniferil aldeide	VAH*	2.173	0.154	0.997	0.016 - 80	1.4	4.7
acido p-cumarico	VAH*	0.199	0.0005	0.999	0.01 - 50	2.3	7.8

Appendice D

Tabella D.1: Errore medio, resa media, CV%, Bianco medio, MDL ed MQL per L e D-amminoacidi e metossifenoli

Composto	Errore medio %	Resa media %	CV %	Bianco medio (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
<hr/> alluminio <hr/>						
L-alanina	-4.7	66±6	8	2.5±0.4	1.1	3.6
D-alanina	1	77±6	8	0.01±0.003	0.01	0.03
L-arginina	-4.8	66±5	8	0.6±0.1	0.2	0.8
D-arginina	-1.5	68±5	7	0.006±0.001	0.003	0.011
L-asparagina	-6.7	70±2	4	0.1±0.03	0.09	0.3
D-asparagina	-0.9	75±3	4	0.012±0.003	0.01	0.035
L-acido aspartico	-5.5	57±4	7	0.3±0.1	0.2	0.7
D-acido aspartico	4.4	64±4	6	0.8±0.2	0.6	2
L-acido glutammico	-6.1	64±4	6	0.7±0.2	0.7	2.3
D-acido glutammico	-1.3	70±5	6	0.016±0.003	0.01	0.034
Glicina	-2.8	67±4	6	19.9±0.4	1.3	4.2
<i>t</i> -4-Idrossi-L-prolina	1	78±4	5	0.4±0.1	0.2	0.6
<i>t</i> -4-Idrossi-D-prolina	-0.1	78±4	5	0.8±0.1	0.3	1
LD-istidina	-4.2	73±5	7	2.1±0.4	1.1	3.6
L-leucina/isoleucina	-1.2	73±4	5	1.3±0.3	0.9	3
D-leucina/isoleucina	2.6	76±4	6	0.06±0.02	0.05	0.17
L-metionina	0.2	51±5	10	0.04±0.02	0.05	0.18
D-metionina	0.1	54±2	3	0.14±0.04	0.13	0.42
L-ornitina	-5.8	64±6	9	1.5±0.3	0.8	2.8
D-ornitina	0.01	74±8	10	0.19±0.04	0.13	0.43

Composto	Errore medio %	Resa media %	CV %	Bianco medio (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
L-fenilalanina	-5.2	76±5	6	0.4±0.1	0.2	0.7
D-fenilalanina	-1.8	80±5	6	0.013±0.003	0.008	0.026
L-prolina	-1.9	70±4	5	4.7±0.7	2.1	7
D-prolina	-1.2	80±4	4	0.2±0.1	0.2	0.6
LD-serina	-6.8	65±5	7	4.6±1.2	3.6	12
L-treonina	-7.4	64±5	7	0.5±0.2	0.6	1.9
D-treonina	-6.1	70±4	6	0.06±0.01	0.04	0.13
L-tirosina	-9.3	64±6	10	1.8±0.2	0.7	2.4
D-tirosina	-4.3	70±7	10	0.07±0.01	0.03	0.13
L-valina	-0.5	75±5	7	0.8±0.1	0.4	1.2
D-valina	-4.5	73±4	5	0.004±0.002	0.005	0.016
acido vanillico	-1.5	70±2	3	0.8±0.1	0.2	0.7
acido isovanillico	-4.5	64±4	7	0.2±0.1	0.2	0.8
vanillina	1.7	73±6	8	0.4±0.1	0.2	0.8
acido siringico	8.2	90±7	7	0.2±0.1	0.2	0.7
siringaldeide	-9.7	61±3	5	0.08±0.04	0.11	0.35
acido ferulico	9.9	100±8	8	0.2±0.1	0.3	0.9
coniferil aldeide	7.5	86±4	4	0.19±0.1	0.31	1
acido p-cumarico	6.2	74±2	3	1.4±0.4	1.1	3.7
quarzo QFF						
L-alanina	-6.6	74±3	4	2.7±0.4	1.1	3.5
D-alanina	3.4	83±4	4	0.03±0.004	0.012	0.041
L-arginina	-4.9	67±2	3	0.84±0.15	0.44	1.48
D-arginina	-0.5	74±3	4	0.004±0.001	0.003	0.01
L-asparagina	-7.7	78±4	6	0.10±0.02	0.05	0.16
D-asparagina	3.4	85±6	7	0.04±0.004	0.012	0.039
L-acido aspartico	-6.6	74±1	1	0.30±0.084	0.25	0.84
D-acido aspartico	-1.6	79±4	5	0.7±0.2	0.57	1.9
L-acido glutammico	-8.5	72±2	2	0.6±0.1	0.3	1.1
D-acido glutammico	1.1	82±4	4	0.02±0.01	0.03	0.08
Glicina	-1.5	75±6	8	1.8±0.3	0.9	3.1
<i>t</i> -4-Idrossi-L-prolina	-7.1	78±1	2	0.35±0.02	0.06	0.21

Composto	Errore medio %	Resa media %	CV %	Bianco medio (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
<i>t</i> -4-Idrossi-D-prolina	3.8	86±1	2	0.55±0.02	0.07	0.24
LD-istidina	-5.2	79±3	3	1.2±0.2	0.06	0.21
L-leucina/isoleucina	-5	78±2	2	1.2±0.1	0.4	1.4
D-leucina/isoleucina	6.8	87±3	4	0.8±0.1	0.3	1
L-metionina	-6.6	77±2	3	0.19±0.08	0.25	0.84
D-metionina	2.2	80±3	4	0.3±0.1	0.2	0.8
L-ornitina	-6.4	65±2	4	1.5±0.3	0.8	2.6
D-ornitina	-0.7	73±3	5	0.13±0.03	0.09	0.3
L-fenilalanina	-7	79±2	3	0.47±0.06	0.17	0.58
D-fenilalanina	-2.9	82±4	5	0.017±0.001	0.004	0.013
L-prolina	-9	76±1	2	2.3±0.2	0.5	1.8
D-prolina	-5.2	79±4	5	0.16±0.01	0.04	0.13
LD-serina	-1.3	68±2	2	4.9±1.3	3.9	13.1
L-treonina	-1.1	71±2	3	0.019±0.004	0.011	0.038
D-treonina	-0.7	73±3	5	0.009±0.002	0.006	0.019
L-tirosina	0.5	71±3	5	1.1±0.1	0.4	1.5
D-tirosina	4.5	76±4	5	0.08±0.03	0.09	0.3
L-valina	-4.1	79±3	4	0.67±0.08	0.24	0.8
D-valina	-1.5	83±5	6	0.006±0.002	0.006	0.02
acido vanillico	-7.8	81±1	1	0.6±0.1	0.2	0.6
acido isovanillico	-8.4	79±3	4	0.19±0.08	0.23	0.76
vanillina	-4.3	79±2	3	1.7±0.7	2.2	7.3
acido siringico	5.8	84±3	3	0.8±0.3	0.9	3.1
siringaldeide	-15.5	73±3	4	0.30±0.12	0.36	1.21
acido ferulico	8.3	100±4	4	0.17±0.09	0.28	0.94
coniferil aldeide	-4.2	93±9	10	0.11±0.03	0.10	0.35
acido p-cumarico	-2.4	80±1	1	1.9±0.4	1.1	3.7

Bibliografia

- [1] Prospero et al., *The atmospheric aerosol system: an overview*, J. Geophys Res. (1983), **21**, 1607-1629
- [2] P. H. McMurry, *A review of atmospheric aerosol measurements*, Atmospheric Environment (2000), **34**, 1959-1999
- [3] A. Marconi *Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma*, Ann Ist Super Sanità (2003), **39**, 329 pp
- [4] K. T. Whitby, *The physical characteristics of sulfur aerosols*, Atmospheric Environment (1978), **12**, 135-159
- [5] K. R. Spurny, *Aerosol chemical processes in the environment*, CRC Press (2000), 640pp
- [6] B. J. Turpin, J. J. Huntzicker, *Secondary formation of organic aerosol in the Los Angeles Basin: a descriptive analysis of organic and elemental carbon concentrations*, Atmospheric Environment (1991), **25**, 207-215
- [7] J. H. Seinfeld, S. Pandis, *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change*, Wiley (2006), 1232 pp
- [8] Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio (2003)
- [9] R. Szmigielski, J. Surrat, Y. G. Gonzales et al., *3-methyl-1,2,3-butanetricarboxylic acid: an atmospheric tracer for terpene secondary organic aerosol*, Geophysical Research Letters (2007), **34**, 2-7

- [10] S. Zappoli, A. Andracchio, S. Fuzzi, M.C. Facchini, A. Gelencser, G. Kiss, Z. Krivacsy, E. Meszaros, H.C. Hansson, K. Rosman, Y. Zebuhr *Inorganic, organic and macromolecular components of fine aerosol in different areas of Europe in relation to their water solubility*, Atmospheric Environment (1999), **33**, 2733-2743
- [11] A. C. Pope, D. W. Dockery, *Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect*, Journal of the air and waste management association (2006), **56**, 709-742
- [12] P. Wahlin et al., *Pronounced decrease of ambient particle number emissions from diesel traffic in Denmark after reduction of the sulphur content in diesel fuel*, Atmospheric Environment (2001), **35**, 3549-3552
- [13] R. Harrison et al., *Measurement of number, mass and size distribution of particles in the atmosphere*, Philos Trans R Soc A (2000), **358**, 2567-2579
- [14] R. Szmigielski, J. D. Surratt, Y. Gomez-Gonzalez, *3-methyl-1,2,3-butanetricarboxylic acid: An atmospheric tracer for terpene secondary organic aerosol*, Geophysical Research Letters (2007), **34**, 2-7
- [15] M. Reinning, L. Muller, J. Warnke, T. Hoffmann, *Characterization of selected organic compound classes in secondary organic aerosol from biogenic VOCs by HPLC/MS*, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2008), **391**, 171-182
- [16] K. Tsigaridis, M. Kanakidou, *Global modelling of secondary organic aerosol in the troposphere: a sensitivity analysis*, Atmos. Chem. Phys. (2003), **3**, 1849-1869
- [17] N. S. Holmes, *A review of particle formation events and growth in the atmosphere in the various environments and discussion of mechanistic implications*, Atmospheric Environment (2007), **41**, 2183-2201
- [18] M. Kanakidou, K. Tsigaridis, F. J. Dentener, P. J. Crutzen, *Human-activity-enhanced formation of organic aerosols by biogenic hydrocarbon oxidation*, J Geophys Res Atmos (2000), **105**, 9243-9354

- [19] B. Lamb, A. Guenther, D. Gay, A. Westber, *A national inventory of biogenic hydrocarbon emissions*, Atmospheric Environment (1987), **21**, 1695-1705
- [20] Y. Iinuma, O. Boge, H. Herrmann, *Aerosol-chamber study of the α -pinene/ O_3 reaction: influence of particle acidity on aerosol yields and products*, Atmospheric Environment (2004), **38**, 761-773
- [21] M. Glasius, M. Duane, B. R. Larsen, *Determination of polar terpene oxidation products in aerosols by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry*, Journal of Chromatography (1999), **833**, 121-135
- [22] J. Yu, D. R. Cocker III, R. J. Griffin, R. C. Flagan, J. H. Seinfeld *Gas-Phase Ozone Oxidation of Monoterpenes: Gaseous and Particulate Products*, Journal of Atmospheric Chemistry (1999), **34**, 207-258
- [23] V. Librando, G. Tringali, *Atmospheric fate of OH initiated oxidation of terpenes. Reaction mechanism of α -pinene degradation and secondary organic aerosol formation*, Journal of Environmental Management (2005), **75**, 275-282
- [24] D. L. Nelson, M. M. Cox, *I principi di biochimica di Lehninger*, Zanichelli (2006), 1256 pp
- [25] C. Anastasio, K. G. McGregor *Photodestruction of dissolved organic nitrogen species on fog waters*, Aerosol Science Technology (2000), **30**, 378-386
- [26] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry, 4th edition*, John Wiley and Sons (2011), 1520 pp
- [27] S. Fonselius, *Amino Acids in Rainwater*, Tellus (1954), **6**, 90-90
- [28] A. T. Wilson, *Organic nitrogen in New Zealand snows*, Nature (1959), **183**, 318-319
- [29] M. A. Wedyan, M. R. Preston, *The coupling of surface seawater organic nitrogen and the marine aerosol as inferred from enantiomer-specific amino acid analysis*, Atmospheric Environment (2008), **42**, 8698-8705

- [30] P. Saxena, L. M. Hildemann, *Water-soluble organics in atmospheric particles: a critical reviews of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds*, Journal of Atmospheric Chemistry (1996), **24**, 57-109
- [31] K. G. McGregor, C. Anastasio, *Chemistry of waters in California's Central Valley: 2. Photochemical transformation of amino acid and alkyl amines*, Atmospheric Environment (2001), **35**, 1091-1104
- [32] W. Szyrmer, I. Zawadzky, *Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei: a review*, Bulletin of the American Meteorological Society (1997), **78**, 209-228
- [33] K. Mopper, R. G. Zika, *Free amino acids in marine rains: evidence for oxidation and potential role in nitrogen cycling*, Nature (1987), **325**, 246-249
- [34] E. Barbaro, R. Zangrando, I. Moret et al., *Free amino acids in atmospheric particulate matter of Venice, Italy*, Atmospheric Environment (2011), **45**, 5050-5057
- [35] K. Matsumoto, M. Uematsu, *Free amino acids in marine aerosols over the western North Pacific Ocean*, Atmospheric Environment (2005), **39**, 2163-2170
- [36] E. Scalabrin, R. Zangrando, E. Barbaro, N.M. Kehrwald, J. Gabrieli, C. Barbante, et al., *Amino acids in Arctic aerosols*, Atmos. Chem. Phys. (2012), **12**, 10453-10463
- [37] P. Di Filippo, D. Pomata, C. Riccardi, F. Buiarelli, V. Gallo, A. Quaranta, *Free and combined amino acids in size-segregated atmospheric aerosol samples*, Atmospheric Environment (2014), **98**, 179-189
- [38] B. R. T. Simoneit, W. F. Rogge, M. A. Mazurek, L. J. Standley, L. M. Hildemann, G. R. Cass, *Lignin pyrolysis products, lignans, and resin acids as specific tracers of plant classes in emissions from biomass combustion*, Environmental Science & Technology (1993), **27**, 2533-2541
- [39] S. Opsahl, R. Benner, *Photochemical reactivity of dissolved lignin in river and ocean waters*, Limnology Oceanography (1998), **43**, 1297-1304

- [40] D. L. Crawford, R. L. Crawford, *Microbial degradation of lignin*, Enzyme and Microbial Technology (1980), **2**, 11-22
- [41] R. Vicuna, *Bacterial degradation of lignin*, Enzyme and Microbial Technology (1988), **10**, 646-655
- [42] H. Ducklow, C. Carlson, M. Church, D. Kirchman, D. Smith, G. Steward, *The seasonal development of the Bacterioplankton bloom in the Ross Sea, Antarctica, 1994-1997*, Deep-Sea Research II (2001), **48**, 4199-4221
- [43] A. Bergamasco, V. Defendi, P. Del Negro, S. Fonda Umani, *Effects of the physical properties of water masses on microbial activity during an Ice Shelf Water overflow in the central Ross Sea*, Antarctic Science (2003), **15**, 405-411
- [44] T. K. Kirk, R. L. Farrell, *Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin*, Annual review of microbiology (1987), **41**, 465-505
- [45] K. E. L. Eriksson, R. A. Blanchette, P. Ander, *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1990), 407 pp
- [46] K. E. Hammel, *Fungal degradation of lignin*, Driven by nature: plant litter quality and decomposition (1997), 33-45
- [47] X. Li, T. Zhang, S. Sun, H. Lan, T. Yu, *Lignin in marine environment and its analysis - A Review*, Journal Ocean University of China (Oceanic and coastal sea research) (2012), **11**, 501-506
- [48] D. Oros, B. R. T. Simoneit, *Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosol from biomass burning Part 1. Temperate climate conifers*, Applied Geochemistry (2001), **16**, 1513-1544
- [49] D. Oros, B. R. T. Simoneit, *Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 2. Deciduous trees*, Applied Geochemistry (2001), **16**, 1545-1565

- [50] D. R. Oros, M. R. bin Abas, N. Omar, N. A. Rahman, B. R. T. Simoneit, *Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning: Part 3. Grasses*, Applied Geochemistry (2001), **21**, 919-940
- [51] G. D. Onstad, D. E. Canfield, P. D. Quay, J. I. Hedges, *Sources of particulate organic matter in rivers from the continental USA: Lignin phenol and stable carbon isotope compositions*, Geochimica et Cosmochimica Acta (2000), **64**, 3539-3546
- [52] R. Zangrando, E. Barbaro, P. Zennaro et al., *Molecular Markers of Biomass Burning in Arctic Aerosols*, Environmental Science and Technology (2013), **47**, 8565-8574
- [53] M. A. Bari, G. Baumbach, B. Kuch, G. Scheffknecht, *Temporal variation and impact of wood smoke pollution on a residential area in southern Germany*, Atmospheric Environment (2010), **44**, 3823-3832
- [54] J. Michalowicz, *The natural and anthropogenic processes responsible for the presence of methoxyphenols in ecosystems and human surrounding*, Rocznik Ochrona Srodowiska (Annual Set the Environment Protection) (2008), **10**, 143-164
- [55] R. E. Ardrey, *Liquid chromatography - mass spectrometry: an introduction*, Wiley and Sons LTD (2003), 276 pp
- [56] A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, *A new form of chromatography employing two liquid phases*, Biochemical Journal (1948), **35**, 1358-1368
- [57] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Chimica analitica strumentale*, Thomson Brooks/Cole (2009), 1039pp
- [58] MSP Corporation, *Model 120 MOUDITM II User Guide*, (2006) 28 pp
- [59] Copley Scientific Limited, *Instruction manual High Capacity Pump Modul HCP5*, (2009), 14 pp
- [60] Copley Scientific Limited, *Quality solution for air sampling and particle analysis*, (2010), 40 pp

- [61] E. Barbaro et al., *D- and L-amino acids in Antarctic lakes: assessment of a very sensitive HPLC-MS method*, *Anal Bioanal Chem* (2014), **406**, 5259-5270
- [62] J. Parshintsev, T. Hyotylainen, K. Hartonen, M. Kulmala, M. L. Riekkola, *Solid-phase extraction of organic compounds in atmospheric aerosol particles collected with the particle-into-liquid sampler and analysis by liquid chromatography-mass spectrometry*, *Talanta* (2010), **80**, 1170-1176
- [63] F. Yasmeen, S. Szmigielski, R. Vermeylen et al., *Mass spectrometric characterization of isomeric terpenoic acids from the oxidation of α -pinene, β -pinene, d-limonene, and Δ^3 -carene in fine forest aerosol*, *Journal of Mass Spectrometry* (2010), **46**, 425-442
- [64] J. Warnke, R. Bandur, T. Hoffmann, *Capillary-HPLC-ESI-MS/MS method for the determination of acidic products from the oxidation of monoterpenes in atmospheric aerosol samples*, *Anal Bioanal Chem* (2006), **385**, 34-45
- [65] D.M. Bliesner, *Validating chromatographic methods: A Practical Guide*, John Wiley and Sons, Inc. (2006)
- [66] S. Samy, J. Robinson, M. Hays *An advanced LC-MS (Q-TOF) technique for the detection of amino acids in atmospheric aerosols*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2011), **401**, 3103-3113
- [67] Q. Zhang, C. Anastasio *Free and combined amino compounds in atmospheric fine particles ($PM_{2.5}$) and fog waters from Northern California*, *Atmospheric Environment* (2003), **37**, 2247-2258
- [68] E. Barbaro, R. Zangrando, M. Vecchiato, R. Piazza, W. Cairns, G. Capodaglio, C. Barbante, A. Gambaro, *Free amino acids in Antarctic aerosol: Potential markers for the evolution and fate of marine aerosol*, *Atmospheric Chemistry and Physics* (2015), **15**, 5457-5469

- [69] R. de Miranda, M. de Fatima Andrade, A. Worobiec et al., *Characterisation of aerosol particles in the Sao Paulo Metropolitan Area*, Atmospheric Environment (2002), **36**, 345-352
- [70] E. Barbaro, R. Zangrando, T. Kirchgeorg, A. Bazzano, S. Illuminati, A. Annibaldi, S. Rella, C. Truzzi, M. Grotti, A. Ceccarini, C. Malitesta, G. Scarponi, A. Gambaro, *An integrated study of the chemical composition of Antarctic aerosol to investigate natural and anthropogenic sources*, Csiro Publishing (2016), **13**, 867-876
- [71] X. Ding, M. Zheng, L. Yu, X. Zhang, R. J. Weber, B. Yan, A. G. Russell, X. Wang, *Spatial and seasonal trends in biogenic secondary organic aerosol tracers and water-soluble organic carbon in the southeastern United States*, Environmental science and technology (2008), **42**, 5171-5176
- [72] R. J. Sheesley, J. J. Schauer, E. Bean, D. Kenski, *Trends in secondary organic aerosol at a remote site in Michigan's Upper Peninsula*, Environmental Science and Technology (2004), **38**, 6491-6500
- [73] J. C. Kim, *Factors controlling natural VOC emissions in a southeastern US pine forest*, Atmos. Environ. (2001), Atmos. Environ. **35**, 3279-3292
- [74] A. Guenther, C. N. Hewitt, D. Erickson, R. Fall, C. Geron, T. Graedel, P. Harley, L. Klinger, M. Lerdau, W. A. McKay, T. Pierce, B. Scholes, R. Steinbrecher, R. Tallamraju, J. Taylor, P. Zimmerman, *A global model of natural volatile organic compound emissions*, J. Geophys. Res. (1995), **100**, 8873-8892
- [75] C. Pio, C. Alves, A. Carvalho, C. Santos, *Size distribution characteristics of organic species in atmospheric particulate matter from Finnish and German rural sites with variable anthropogenic influence*, Env. Engineering Science (2006), **23**, 933-941
- [76] C. Alves, C. Pio, A. C. Duarte, *Particulate Size Distributed Organic Compounds in a Forest Atmosphere*, Environ. Sci. Technol. (2000), **34**, 4287-4293

- [77] O. V. Nepotchatykh, P. A. Ariya, *Degradation of Dicarboxylic Acids (C₂-C₉) upon Liquid-Phase Reactions with O₃ and Its Atmospheric Implications*, Environ. Sci. Technol. (2002), **36**, 3265-3269
- [78] P. A. Ariya, O. Nepotchatykh, O. Ignatova, M. Amyot, *Microbiological degradation of atmospheric organic compounds*, Geophysical Research Letters (2002), **29**, 2-5
- [79] M. Fischer, J. Cox, D. J. Davis, A. Wagner, R. Taylor, A. J. Huerta, N. P. Money, *New information on the mechanism of forcible ascospore discharge from Ascobolus immersus*, Fungal Genetics and Biology (2004), **41**, 698-707
- [80] P. J. Milne, R. G. Zika, *Amino acid nitrogen in atmospheric aerosols: occurrence, sources and photochemical modification*, J. of Atmospheric Chemistry (1993), **16**, 361-398
- [81] J. G. Salway, *Metabolism at a Glance*, Blackwell Sci. (1999), 40-46
- [82] J. Matos, R. Duarte, A. Duarte, *Challenges in the identification and characterization of free amino acids and proteinaceous compounds in atmospheric aerosols: A critical review*, Trends in Analytical Chemistry (2016), **75**, 97-107
- [83] T. J. Ward, C. P. Palmer, M. Bergauff, R. K. M. Jayanty, C. W. Noonan, *Organic/elemental carbon and woodsmoke tracer concentrations following a community wide wood-stove changeout program*, Atmos. Environ (2011), **45**, 5554-5560
- [84] R. Zangrando, E. Barbaro, T. Kirchgeorg, M. Vecchiato, M. Vecchiato, E. Scalabrin, M. Radaelli, D. Dordevic, C. Barbante, A. Gambaro, *Five primary sources of organic aerosols in the urban atmosphere of Belgrade (Serbia)*, Science of the Total Environment (2016), **571**, 1441-1453
- [85] B. L. van Drooge, M. Fontal, N. Bravo, P. Fernandez, M. A. Fernandez, J. Munoz-Arnanz, et al., *Seasonal and spatial variation of organic tracers for biomass burning in PM₁ aerosols from highly insolated urban areas*, Environ. Sci. Pollut. Res. (2014), **21**, 11661-11670

- [86] A. Caseiro, H. Bauer, C. Schmidl, C. A. Pio, H. Puxbaum, *Wood burning impact on PM10 in three Austrian regions*, Atmos. Environ. (2009), **43**, 2186-2195
- [87] C. D. Simpson, M. Paulsen, R. L. Dills, L. J. S. Liu, D. A. Kalman, *Determination of methoxyphenols in ambient atmospheric particulate matter: tracers for wood combustion*, Environ. Sci. Technol. (2005), **39**, 631-637
- [88] M. A. Bari, G. Baumbach, B. Kuch, G. Scheffknecht, *Wood smoke as a source of particle-phase organic compounds in residential areas*, Atmos. Environ. (2009), **43**, 4722-4732
- [89] P. A. Matrai, L. Tranvik, C. Leck, J. C. Knulst, *Are high Arctic surface microlayers a potential source of aerosol organic precursors?*, Marine Chemistry (2008), **108**, 109-122
- [90] M. Kuznetsova, C. Lee, J. Aller, *Characterization of the proteinaceous matter in marine aerosols*, Marine Chemistry (2005), **96**, 359-377
- [91] D. W. Griffin, V. H. Garrison, J. R. Herman, E. A. Shinn, *African desert dust in the Caribbean atmosphere Microbiology and public health*, Aerobiologia (2001), **17**, 203-213
- [92] D. Hoffmann, A. Tilgner, Y. Iinuma, H. Herrmann, *Atmospheric stability of Levoglucosan: A detailed Laboratory and Modeling Study*, Environ. Sci. Technol. (2010), **44**, 694-699
- [93] L. J. Kuo, P. Louchouart, B. E. Herbert, *Influence of combustion conditions on yields of solvent-extractable anhydrosugars and lignin phenols in chars: implications for characterizations of biomass combustion residues*, Chemosphere (2011), **85**, 797-805
- [94] K. Shakya, P. Louchouart, R. J. Griffin, *Lignin-derived phenols in Houston aerosols: Implications for natural background sources*, Environmental Science and Technology (2011), **45**, 8268-8275