Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale (*ordinamento ex D.M. 270/2004*)
in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

Sviluppo di un metodo per la determinazione di biomarker in campioni di torba

Relatore
Ch. Prof. Andrea Gambaro

Correlatore
Elena Argiriadis

Laureando
Matteo Martino
Matricola 834509

Anno Accademico
2014 / 2015

Indice

SCOPO DELLA TESI **3**

1 INTRODUZIONE **5**

1.1 I vegetali *5*

1.1.1 Tassonomia 5

1.1.2 Foglie 7

1.2 Torba *8*

1.3 I lipidi nelle piante *10*

1.3.1 FunzionI 10

1.3.2 Sintesi degli acidi grassi e derivati 12

1.3.3 n-alcani 15

1.3.4 Acidi n-alcanoici 17

1.3.5 Significato paleoclimatico 18

1.4 Stanoli e steroli fecali *19*

1.5 Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) *22*

2 MATERIALI E METODI **27**

2.1 Materiali e strumentazione *27*

2.1.1 Solventi, reagenti e standard 27

2.1.2 PLE (Pressurized Liquid Extraction) 27

2.1.3 Turbovap® II 28

2.1.4 Visiprep e SPE 28

2.1.5 Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (gc-ms) 29

2.2 Quantificazione *30*

2.3 Limite di rivelabilità strumentale *36*

3 RISULTATI E DISCUSSIONE **37**

3.1 Messa a punto del metodo *37*

3.1.1 Decontaminazione del materiale e degli strumenti 38

3.1.2 Derivatizzazione 39

3.1.3 Metodo gascromatografico 42

3.1.4 Purificazione 49

3.1.5 Estrazione 66

3.1.6 Qualità del dato analitico 67

3.1.7 Struttura finale della metodica 83

3.2 Applicazione su campioni reali *83*

3.2.1 La torbiera di Coltrondo 83

3.2.2 n-alcani 86

3.2.3 Idrocarburi Policiclici Aromatici 89

3.2.4 Acidi n-alcanoici 91

3.2.5 Steroli e stanoli 93

3.2.6 Interpretazione dei dati 94

4 CONCLUSIONI **98**

5 APPENDICE **100**

6 BIBLIOGRAFIA **106**

SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo lavoro è quello di determinare una metodica analitica unica, a partire da diverse metodiche preesistenti, che consenta l'analisi dei quattro diversi classi di composti utilizzate come *biomarker* paleoclimatici, da un unico campione di torba e, una volta ultimata la messa a punto, valutarne l'attendibilità mediante prove di accuratezza e precisione.

Le torbiere costituiscono un eccellente archivio climatico in quanto sono un importante sito di stoccaggio del carbonio atmosferico e sono state utilizzate nel corso dei secoli dall'uomo per svariate attività, che vanno dallo sfruttamento come semplici pascoli fino all'utilizzo come combustibile. Esse inoltre ricoprono approssimativamente il 3% della superficie terrestre e si stima che attualmente immagazzinino 100 milioni di tonnellate all'anno di carbonio, anche se il valore è variabile nel corso del tempo.
La scarsa diagenesi dei composti organici all'interno della torba e l'ampia diffusione delle torbiere nell'emisfero Nord a partire da 10000-20000 anni fa le rende perciò un'importante fonte di informazioni sui cambiamenti climatici avvenuti nel corso dei secoli e dei millenni.

I *marker* presi in esame per questo lavoro di tesi comprendono analiti con caratteristiche chimiche diverse tra loro, che possono pertanto rendere conto di diversi processi coinvolti nelle trasformazioni ambientali e climatiche naturali e antropiche. Come verrà descritto più in dettaglio in seguito, gli steroli e gli stanoli fecali sono utilizzati come traccianti della presenza umana e animale nei siti di interesse, mentre gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), generalmente analizzati in quanto inquinanti, se visti in un'ottica paleoclimatica forniscono informazioni sugli incendi e sul tipo di materiale combusto nel passato.
Gli n-alcani e gli acidi n-alcanoici, invece, sono alcune delle molecole organiche prodotte in natura sulla cuticola delle foglie come impermeabilizzanti. Studi sulle foglie delle piante contemporanee hanno permesso di legare la distribuzione delle lunghezze delle catene di questi composti a specifici classi di vegetali e, in considerazione della loro lenta diagenesi, numerosi studi li hanno utilizzati per valutare alcuni cambiamenti nella vegetazione nel corso del tempo.

In letteratura sono presenti numerose metodiche sviluppate nel corso degli ultimi decenni per l'analisi dei *biomarker* sopra descritti, un approccio multianalitico consentirebbe però di ridurre i tempi complessivi delle analisi, di ridurre i costi delle stesse e, soprattutto, di ottenere un maggior numero di informazioni paleoclimatiche da ogni singolo campione.

Dopo aver sviluppato e validato la metodica dal punto di vista analitico, la procedura verrà applicata ad alcuni campioni di torba per fornire un esempio di come si possa ipotizzare una ricostruzione paleoclimatica basata sui *biomarker* studiati. I dati ottenuti da questi campioni verranno inoltre confrontati con documenti storici che forniscono informazioni sulla presenza umana, sulle attività antropiche e sui cambiamenti della vegetazione in loco, oltre che con i dati ottenuti dall'analisi pollinica che può fornire informazioni analoghe a quelle di questi *biomarker*. Il confronto con queste differenti fonti di informazioni servirà a fornire indicazioni sull'attendibilità dell'approccio paleoclimatico utilizzato, oltre che ad illustrare come i dati ottenuti dai *biomarker* molecolari e dai pollini possano essere integrati creando ricostruzioni paleoclimatiche multi-*proxy* più complete ed attendibili.

1 INTRODUZIONE

Per meglio comprendere i motivi che hanno condotto a questo lavoro di tesi, si è ritenuto necessario inserire una breve introduzione sul regno vegetale e sui processi che influiscono sulla formazione e sulla presenza nelle matrici ambientali dei *biomarker* presi in considerazione.

1.1 I vegetali

1.1.1 Tassonomia

In funzione dello scopo di questa tesi, il regno vegetale può essere suddiviso come illustrato in fig. 1.1 e descritto di seguito.

Alghe - Numerosi organismi acquatici fotoautotrofi sono noti col nome comune di alghe (dal lat. alga, erba acquatica)., anche se non costituiscono un insieme naturale e pertanto sono distribuiti in diverse categorie sistematiche filogeneticamente distanti.
Questi vegetali abitano sia le acque marine che quelle dolci ed anche alcuni ambienti terrestri. Hanno dimensioni varie, da pochi micron (microalghe come fitoplancton e mucillagini) a decine di metri [1]. Come già accennato in precedenza, gli alcani presenti sulla cuticola di queste specie hanno nC<17[2, 3].

Piante terrestri - Tra le piante terresti si

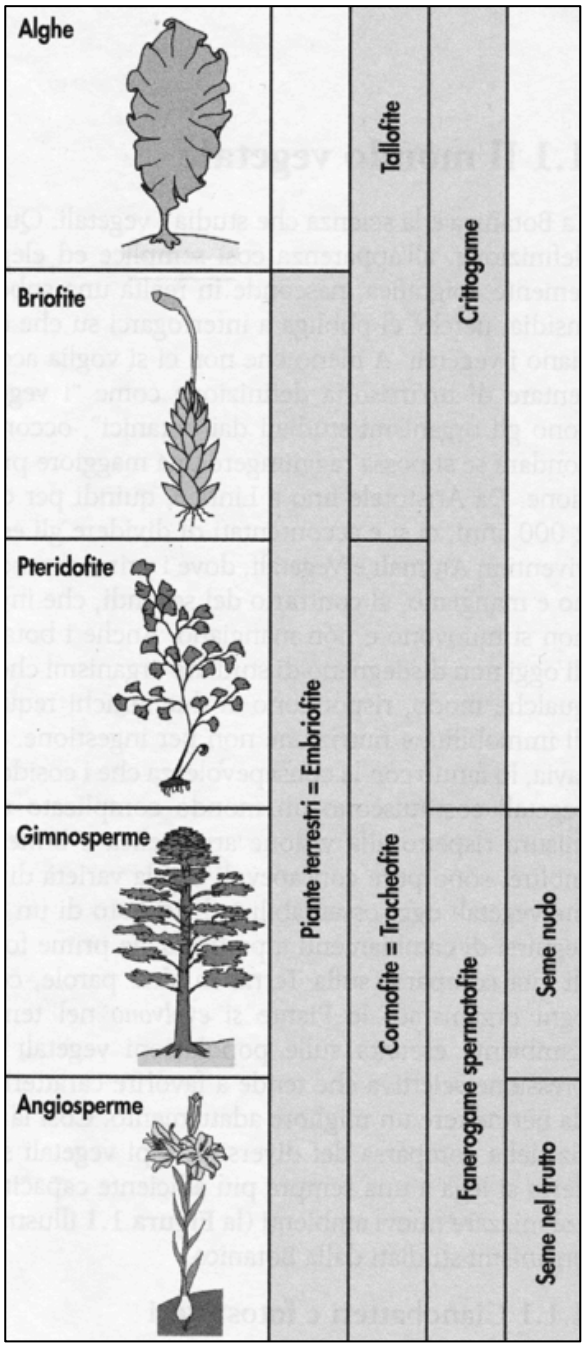

Figura 1.1 - classificazione tassonomica del regno vegetale [1]

possono distinguere briofite e piante vascolari.

Le **briofite** sono le più semplici piante terrestri e sono definite non vascolari in quanto prive di tessuti conduttore a parete lignificata. Sono diffuse in ambienti diversi, come il sottobosco delle foreste, i tronchi degli alberi, i prati, le torbiere, le rocce. Sulla base dei caratteri morfologici vengono tradizionalmente suddivise in 3 classi: *muschi*, *epatiche* ed *antocerote*. I **muschi** rappresentano la componente più cospicua delle briofite e sono suddivisi in base alla struttura della capsula in 7 sottoclassi: di queste, gli **sfagni** sono una classe particolarmente interessante per questa tesi, essendo la componente principale della vegetazione delle torbiere a sfagneti (tipologia di torbiera fortemente acida e fredda) [1]. L'analisi di varie specie di sfagni ha mostrato che le cere di questo tipo di muschi sono caratterizzate dall'alcano C_{23} [2–4].

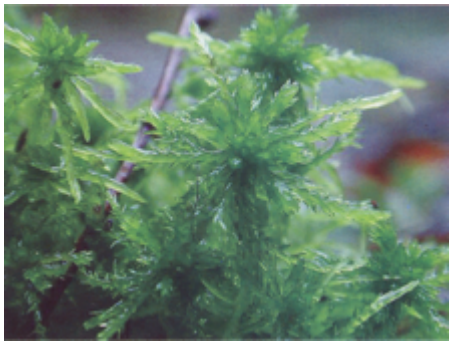

Figura 1.2 - Esempio di sfagno [1]

Le **piante vascolari**, dette anche **tracheofite**, rappresentano un grande gruppo monofiletico di piante per lo più di ambiente terrestre, dotate di tessuti conduttori e di sostegno con pareti lignificate. Si differenziano in modo chiaro per molti caratteri dai taxa terrestri appartenenti ai muschi, epatiche ed antocerote, riferiti nel loro insieme alle briofite.

Le tracheofite viventi vengono riferite a nove categorie principali. Quattro di queste sono prive di semi e vengono tradizionalmente chiamate nel loro insieme **pteridofite** o crittogame vascolari: licofite, psilotofite, etuisetofite e polipodiofite (comunemente indicate come felci).

Gli altri cinque gruppi, ovvero *cicadee*, *conifere*, *gingko*, *gnetofite* e *angiosperme,* costituiscono il gruppo monofiletico più cospicuo tra le piante vascolari, detto delle spermatofite. I *taxa* che caratterizzano questa classe sono: la presenza di seme, macrosporangi avvolti da tegumenti, legno prodotto da un meristema secondario (cambio) e ramificazione ascellare.

Cicadee, conifere, gingko, gnetofite vengono comunemente chiamati **gimnosperme** poiché presentano ovuli, e conseguentemente semi, esposti all'aria (dal greco *gymnos* che significa nudo). Le **angiosperme** hanno invece ovuli e semi racchiusi all'interno di foglie modificate (carpelli) che vanno a costituire l'ovario e in un secondo momento il

frutto [1]. Le angiosperme hanno una produzione di alcani molto più rilevante delle gimnosperme e la lunghezza di catena risulta compresa tra C_{27} e C_{31}[2, 3].

1.1.2 Foglie

Le principali funzioni della foglia sono la fotosintesi e la traspirazione. Essa è costituita dall'epidermide, che è la parte più esterna, dal parenchima clorofilliano, in cui si svolge la fotosintesi, e da un sistema conduttore.

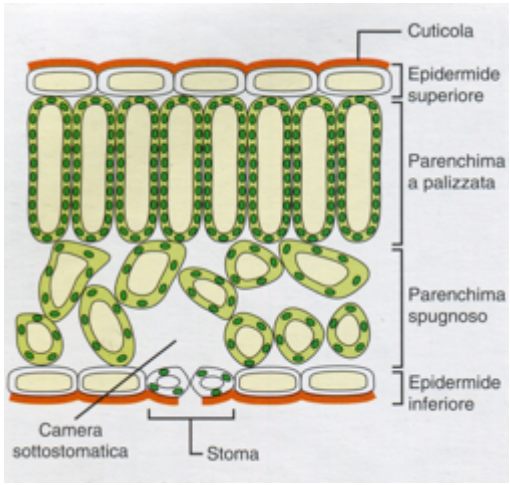

Figura 1.3 - sezione di una foglia con i componenti principali

L'**epidermide** è un tessuto tegumentale esterno d'origine primaria, che ricopre l'intero corpo della pianta. L'epidermide normalmente è unistratificata, ma può essere pluristratificata soprattutto nelle specie adatte a climi aridi (xenofite). Le funzioni fondamentali negli organi aerei della pianta sono essenzialmente di protezione, grazie alle sue caratteristiche questo tessuto modera efficacemente la traspirazione, regola gli scambi gassosi, dà una moderata protezione meccanica ed una buona difesa contro i parassiti.
La traspirazione è indispensabile per il trasporto di acqua e nutrienti minerali, ma deve essere finemente regolata, in modo da mantenere inalterato il bilancio idrico della pianta. L'epidermide deve anche consentire alla luce di raggiungere i sottostanti parenchimi clorofilliani, dove viene utilizzata come fonte energetica nel processo fotosintetico e deve, infine, costituire un'efficiente barriera contro l'attacco da parte di fitofagi e patogeni.
Per consentire gli scambi gassosi tra l'interno e l'esterno l'epidermide, che è una barriera impermeabile, utilizza delle aperture denominate **stomi** o **apparati stomatici**, caratterizzate dalla presenza di due cellule in grado di aprirsi e creare una cavità attraverso la quale può passare il vapore acqueo necessario per la traspirazione [1].

Una delle caratteristiche più importanti delle pareti delle cellule epidermiche è la presenza di **cutina**, che impregna le pareti stesse (cutinizzazione) e costituisce uno strato superficiale (**cuticola**). Lo spessore della cuticola varia molto a seconda del

bisogno di protezione delle diverse piante: quelle acquatiche o di ambienti ombrosi hanno cuticole molto sottili, viceversa in quelle di ambienti desertici la cuticola è molto spessa. In entrambi i casi la cuticola riveste tutta la pianta, ad eccezione delle radici: essa si trova oltre che sull'epidermide dei fusti e delle foglie, anche su tutte le parti dei fiori, sui nettari e sui petali.

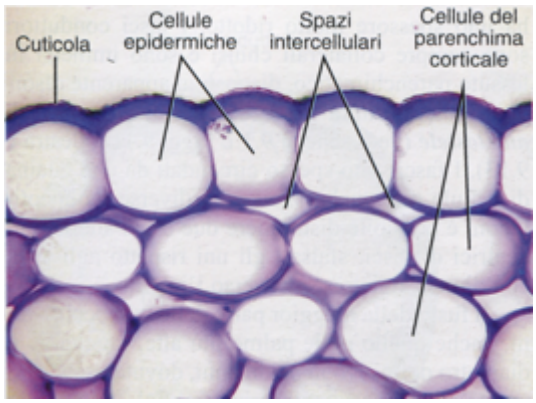

Figura 1.4 - Dettaglio della cuticola e delle cellule epidermiche [1]

Oltre alla cuticola, sono presenti i **rivestimenti cerosi**, molto importanti specialmente nelle piante che devono avere un rigido controllo delle risorse idriche, come pure nelle specie che devono difendersi dalla eccessiva penetrazione di acqua dell'esterno (ad esempio piante di habitat umidi) [1]. Se analizzate con il microscopio elettronico queste cere appaiono in forma microcristallina (talvolta sovrastante una parte amorfa), la cui struttura dipende dal tipo di composti presenti in maggior quantità, dalla temperatura, dall'intensità luminosa e dall'umidità. Alte temperature, ad esempio, favoriscono strutture parallele alla superficie della cuticola come piatti e scaglie, mentre basse temperature favoriscono strutture verticali come bacchette e tubi. Oltre al controllo delle risorse idriche, la presenza dei rivestimenti cerosi contribuisce alla difesa contro agenti patogeni e protegge le foglie dai raggi UV [5].

1.2 Torba

Le torbiere sono definite in base alla loro capacità di accumulare materiale organico, formando un suolo organico detto torba. Questo significa che nel tempo la produttività del sistema è maggiore rispetto alla sua velocità di decomposizione. Lo sviluppo delle torbiere è favorito in climi freddi e umidi, in siti con scarso drenaggio dell'acqua. Nonostante le loro peculiarità, la delineazione delle torbiere rispetto ad altri terreni acquitrinosi non è sempre facile.

Si può definire in linea generale la **torba** come un accumulo sedimentario (*in situ*) di materiale composto da più del 30% (sulla massa secca) di materiale organico morto e parzialmente decomposto; una **torbiera** invece è un'area con o senza vegetazione, con un accumulo naturale di torba di almeno 30 cm sulla superficie.

L'accumulo di torba può raggiungere considerevoli profondità, anche 11-15 metri, ma generalmente nelle regioni boreali si aggira intorno ad una profondità che va dai 2 ai 6 m. La profondità minima di 30 cm è spesso scelta come soglia di formazione della torba, ma è utile per classificare i diversi terreni su scala globale [6].

Per il NWWG (1988) [7] gli acquitrini si possono distinguere in minerali se l'accumulo di torba è inferiore ai 40 cm, e organici (o torbiere) se l'accumulo di torba è di almeno 40 cm. Sono distinti anche 4 principali tipologie di torba:

- **Cariceti**, torbiere simili a prati dominati da carici, erbe, giunchi, muschi marroni e cespugli. Vengono alimentate da soluzioni che percolano da suoli minerali.
- **Acquitrini**, acquitrini o torbiere spesso associati a corpi di acque; per questa ragione sono soggetti a periodiche o regolari inondazioni con acqua stagnante. Durante le inondazioni l'acqua porta detriti minerali che costituiscono un'abbondante fonte di nutrienti per le piante; di conseguenza le paludi possono essere caratterizzate da una vegetazione lussureggiante costituita da carici, erbe, giunchi e piante acquatiche nelle zone con acque aperte.
- **Paludi,** torbiere e/o acquitrini alberati. Come gli acquitrini sono soggette a periodiche o regolari inondazioni. In relazione al fatto che la maggior parte dell'acqua presente è percolata in precedenza attraverso i suoli minerali circostanti, è ricca di solidi disciolti. La vegetazione nelle paludi è caratterizzata da una copertura di alberi decidui o conifere, cespugli, erbe e muschi.
- **Sfagneti**, torbiere sopraelevate in cui gli strati superficiali sono idrologicamente isolati dall'influenza di acque sotterranee e superficiali. Gli sfagneti sono alimentati solamente dalle deposizioni atmosferiche, caratterizzate da scarsità di nutrienti [8].

Le torbiere coprono un'area stimata di 400 milioni di ettari, equivalenti al 3% della superficie terrestre. La maggior parte (350 milioni di ettari, corrispondenti 450 miliardi di tonnellate di carbonio circa) sono nell'emisfero nord e coprono ampie zone in Nord America, Russia ed Europa. La quantità di carbonio che si deposita nelle torbiere attualmente è di 100 milioni di tonnellate l'anno, ma il valore può variare nel corso dei millenni in base al clima e al livello dei mari.

La maggior parte delle torbiere moderne ha iniziato ad accumulare torba conseguentemente all'ultima glaciazione e ha continuato per tutto l'Olocene, quindi approssimativamente per gli ultimi 10000 anni. Alcune torbiere tropicali, nel sud est asiatico, hanno iniziato a formarsi dalla fine del Pleistocene, più di 20000 anni fa. La velocità di accumulo di carbonio dipende dalla velocità di sviluppo della torba e dal clima, ma mediamente l'accumulo di carbonio per le torbiere nordiche è di 20-30 g m^{-1} yr^{-1}, mentre per quelle tropicali è di 50 g m^{-1} yr^{-1} [9].

1.3 I lipidi nelle piante

1.3.1 FunzionI

Il termine lipidi si riferisce a un gruppo di molecole strutturalmente diverse che sono di preferenza solubili in solventi non acquosi. I lipidi includono un'ampia varietà di composti derivati dagli acidi grassi, come molti pigmenti e composti secondari che non sono correlati al metabolismo degli acidi grassi.

I lipidi assolvono a molte funzioni nelle piante. Come componenti maggiori delle membrane biologiche, i lipidi formano una barriera idrofobica essenziale per la vita. Le membrane non solo separano le cellule dall'ambiente circostante; esse inoltre separano il contenuto degli organelli, come i cloroplasti e i mitocondri, dal citoplasma. La compartimentazione cellulare è mantenuta da lipidi polari che formano un doppio strato, il quale impedisce la libera diffusione delle molecole idrofiliche tra l'interno e l'esterno delle cellule.

I lipidi rappresentano una importante riserva chimica di energia libera, inoltre alcuni acidi grassi possono giocare un ruolo principale in certe vie di trasduzione del segnale e altri ancora possono essere coinvolti nella regolazione di vari processi cellulari attraverso l'acilazione delle proteine.

Gli acidi grassi sono i precursori di altri costituenti significativi del metabolismo vegetale: le cere, che rivestono e proteggono le piante dall'ambiente, sono complesse miscele di idrocarburi a lunga catena, aldeidi, alcoli, acidi ed esteri derivati quasi completamente da acidi grassi. Gli strati di cutina e suberina delle cellule dell'epidermide sono composti anche da acidi grassi ossigenati, esterificati l'uno con l'altro per produrre una spessa pelle poliesterica. Così, nelle cellule dell'epidermide degli

organi aerei, la maggior parte della sintesi degli acidi grassi è dedicata alla produzione di cera e cutina di protezione [10].

Tabella 1.1 – Funzioni dei lipidi nelle piante superiori [10]

funzione	*tipi di lipidi coinvolti*
Componenti strutturali delle membrane	glicerolipidi
	sfingolipidi
	steroli
Composti di deposito	triacilgliceroli
	cere
Composti attivi nelle reazioni di trasferimento degli elettroni	clorofilla e altri pigmenti
	ubichinone, plastochinone
Fotoprotezione	carotenoidi (ciclo della xantofilla)
Protezione delle membrane dal danno causato dai radicali liberi	tocoferoli
Impermeabilizzazione e protezione di superficie	***acidi grassi a catena lunga e molto lunga e loro derivati (cutina, suberina e cere di superficie)***
	triterpeni
Modificazione delle proteine	
Addizione delle ancore di membrana	
acilazione	principalmente acidi grassi 14:0 e 16:0
prenilazione	farnesil e geranilgeranil pirofosfato
altri componenti ancora di membrana	fosfatilinositolo, cerammide
Glicosilazione	dolicolo
Segnalazione	
interno	acido abscissico, gibberelline, brassinosteroidi
	acidi grassi 18:3 precursori dello jasmonato
	inositol fosfati
	diacilgliceroli
esterno	jasmonato
	attrattori volatili degli insetti
composti di difesa e antinutrizionali	oli essenziali
	componenti del lattice (gomma, ecc.)
	componenti delle resine (terpeni)

1.3.2 Sintesi degli acidi grassi e derivati

La biosintesi degli acidi grassi nelle piante ha luogo all'interno dei plastidi. Il metabolismo è quindi molto simile a quello nei batteri, anche se la struttura degli enzimi è diversa. Tutte le reazioni del processo biosintetico, infatti, sono catalizzate da un complesso multienzimatico, chiamato acido grasso sintasi.

Il primo step della biosintesi è la carbossilazione ATP-dipendente dell'acetil-CoA per formare malonil-CoA:

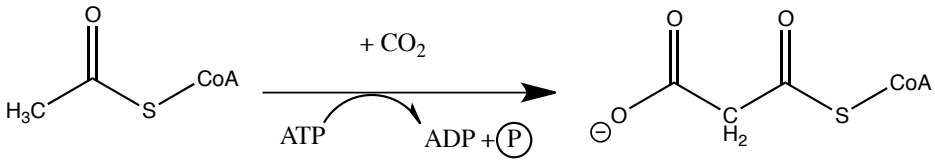

Figura 1.5 - Reazione di formazione del malonil-CoA

Il malonil-CoA prodotto si lega ad un residuo cisteinico dell'acido grasso sintasi, mentre un'altra molecola di acetil-CoA si lega ad un altro residuo cisteinico. La reazione sull'enzima inizia con l'attacco nucleofilo del carbonio in alfa ai gruppi carbonilici sul malonil-CoA sul carbonio carbonilico dell'acetil-CoA, in una reazione di condensazione in cui si libera una molecola di CO_2. Seguono la riduzione del gruppo carbonilico del residuo acetilico ad alcol ad opera di NADPH, la disidratazione dell'alcol e infine la riduzione del doppio legame formato nella disidratazione sempre ad opera di NADPH.

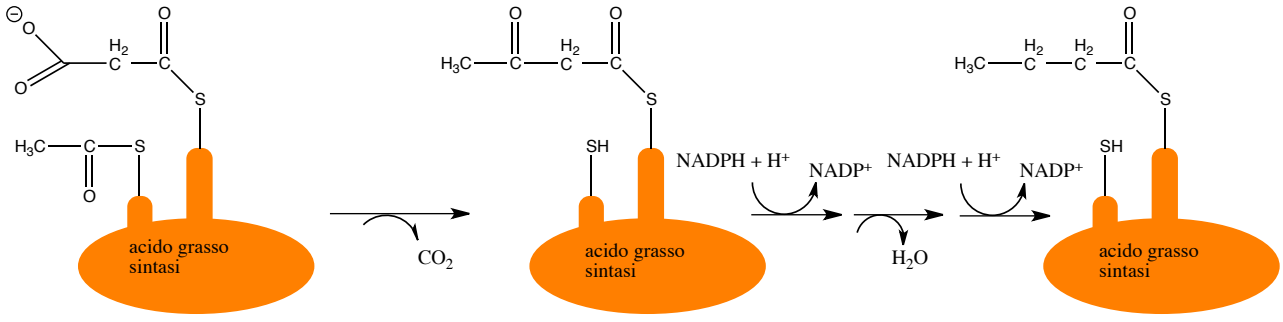

Figura 1.6 - Primo step della reazione di formazione degli acidi grassi

Il gruppo acilico saturo prodotto in questa serie di reazioni viene poi riutilizzato e diventa il substrato di un'altra reazione di condensazione con il gruppo malonico attivato. In ogni passaggio attraverso la via la catena dell'acido grasso si allunga di due

atomi di carbonio, fatto che spiega il perché gli acidi grassi prodotti in natura abbiano una forte prevalenza di numeri di catene pari. Quando la lunghezza della catena raggiunge i 16 atomi, il palmitato viene staccato tramite idrolisi dall'enzima. Gli atomi di carbonio metilico e carbossilico dell'acetil-CoA diventano rispettivamente gli atomi di carbonio 16 e 15 della molecola del palmitato, mentre gli atomi della parte satura derivano dal malonil-CoA.
In alcuni tipi di piante (ad esempio la palma), le catene vengono terminate a lunghezze minori.
La reazione complessiva è:
Acetil-CoA + 7 malonil-CoA + 14 NADPH + 14 H+ => palmitato + 8 CoA + 14 NADPH+ + $6H_2O$ [10, 11]

Le superfici aeree delle piante sono coperte da uno strato di lipidi non volatili cloroformio-solubili, chiamati collettivamente *cera*. Lo strato di cera riduce la perdita d'acqua di ordini di grandezza, rendendo quindi possibile la vita delle piante terrestri. I quantitativi e la composizione della cera depositata sono controllati dalla pianta in risposta a fattori ambientali come l'umidità relativa, l'umidità del suolo e l'intensità luminosa. La composizione della cera varia da una specie vegetale all'altra, ma la cera contiene generalmente una miscela di idrocarburi a lunga catena, acidi, alcoli, chetoni, aldeidi ed esteri. Il significato funzionale delle differenze interspecifiche di composizione della cera non è noto. Dallo studio di mutanti con la composizione della cera alterata, tuttavia, sembra che la composizione della cera alteri la struttura dei cristalli, che alcune piante producono in forma di filamenti, altre in forma di piatti, tubi o spirale. I meccanismi responsabili della forma dei cristalli non sono noti, strutture cristalline differenti si differenziano per la capacità di riflettere la luce, una proprietà che può essere utile nell'adattarsi a crescere a diverse intensità luminose. Fatto forse ancora più importante, alcuni patogeni e insetti erbivori sono attratti o respinti da specifiche composizioni cerose. Quindi la composizione della cera di una particolare pianta può riflettere il compromesso tra pressioni selettive su quella particolare specie.

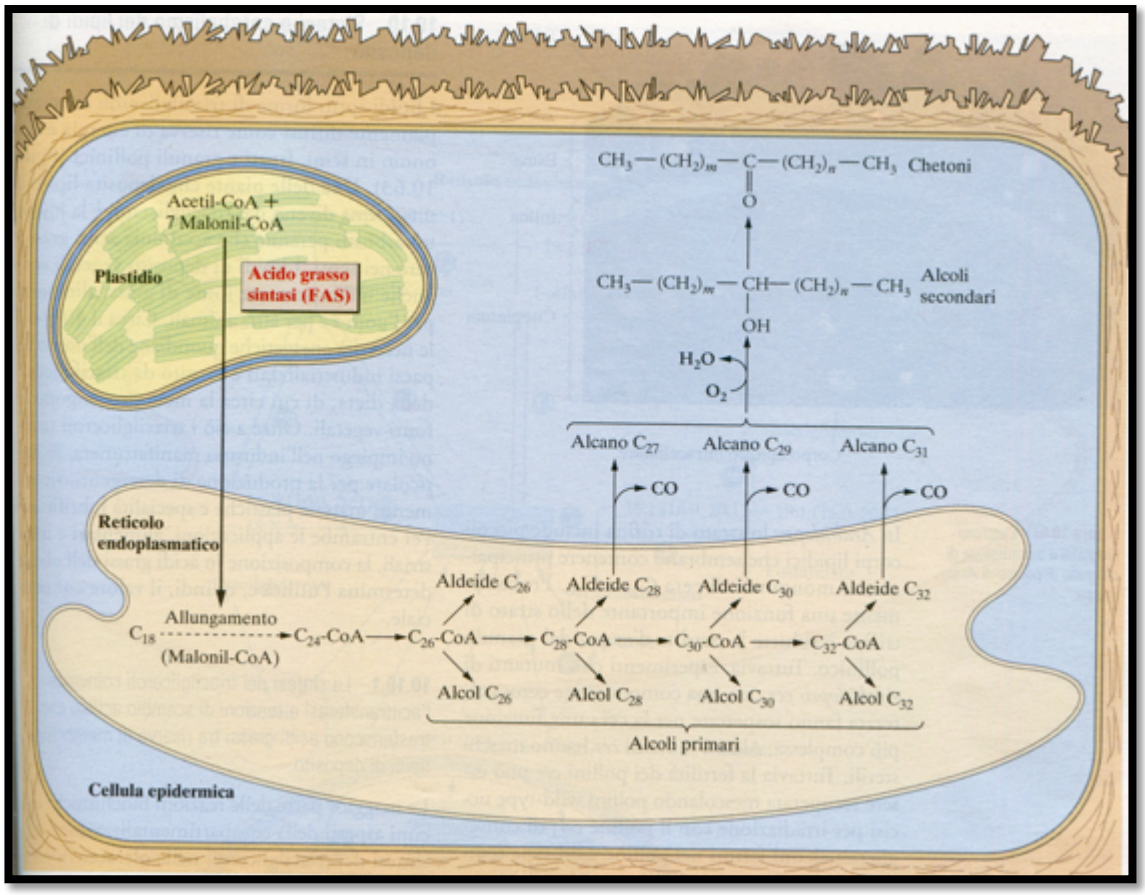

Figura 1.7 – Sintesi dei monomeri di cera nel reticolo endoplasmatico a partire da acido palmitico e acido stearico [10]

Come spiegato in precedenza, i precursori C_{16} o C_{18} della cera sono prodotti dalla via plastidica di sintesi *de novo* degli acidi grassi. Nell'immagine fig. 1.7 si vede che, queste catene aciliche sono allungate a catene aciliche grasse da C_{24} a C_{32} nel reticolo endoplasmatico. Gli acidi grassi (attaccati al coenzima A) possono essere ridotti ad alcoli o aldeidi, e le aldeidi possono essere decarbossilate per formare alcani con un numero dispari di atomi di carbonio. Le reazioni che formano alcoli secondari e chetoni non sono ancora state ben comprese. Nell'insieme i numerosi substrati a lunga catena inclusi gli alcoli primari, le aldeidi, gli alcani, gli alcoli secondari e i chetoni rappresentati qui, contribuiscono alla formazione della cera [10].

Riassumendo, possiamo dire che i composti alchilici lineari a catena lunga sono fra i maggiori componenti delle cere presenti sulla cuticola delle foglie delle piante vascolari. Questi composti includono n-alcani, acidi n-alcanoici, n-alcanoli e esteri.

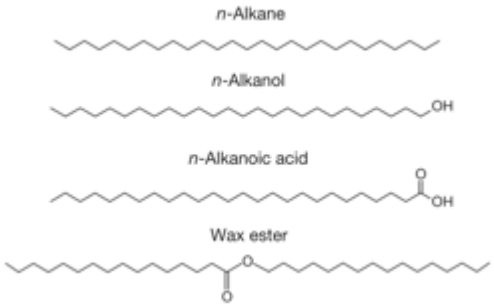

Figura 1.8 – Composti alchilici lineari nelle cere cuticolari

La cuticola ha svariate funzioni, prima fra tutte quella di impedire la disidratazione. Queste proprietà possono variare in base alla composizione e alle condizioni ambientali, come umidità e temperatura.

Gli n-alcani più comuni nelle foglie sono quelli da C_{25} a C_{33}, con una netta predominanza delle catene a numero dispari, dovuta al fatto che derivano dalla reazione di decarbossilazione di acidi alchilici a numero di carboni pari (a loro volta sintetizzati dall'acetilCoA) [12]. Piccole quantità di alcani lineari a numero dispari e isomeri ramificati possono essere presenti e derivano da differenti precursori [2, 10].

1.3.3 n-alcani

Gli alcani lineari sono alcani dalla formula generica C_xH_{2x+2}, a seconda del loro peso molecolare si presentano come gas, liquidi o solidi.
Il più semplice è il metano, di formula CH_4, presente in tutti i pianeti del sistema solare, sulla terra si trova principalmente in depositi di gas naturale, in clatrati nei sedimenti oceanici e, anche se in piccola percentuale, nell'atmosfera, dove costituisce uno dei principali gas serra.
La maggiore fonte a livello commerciale degli n-alcani più pesanti sono invece i depositi petroliferi, che si formano in seguito alla degradazione di zooplancton e fitoplancton sui fondali oceanici in condizioni anaerobiche, alte temperature e alte pressioni nel corso di migliaia di anni.
In natura gli alcani possono essere prodotti da batteri, funghi, animali e piante.

Gli alcani prodotti dai vegetali sono quelli presi in esame in questa tesi: si nota una forte predominanza di alcani a numero dispari e una o due lunghezze di catena predominanti.

Si è osservato che diverse tipologie di vegetali producono (in maniera preponderante) alcani a diverse lunghezze: le alghe producono principalmente alcani corti (nC<17), gli sfagni e le piante acquatiche lunghezze intermedie (C_{23} e C_{25}), mentre le piante terrestri producono alcani a catena lunga (C_{27}-C_{31}) [2–4]. Tra gli idrocarburi a catena lunga si è notato che, mentre le piante producono principalmente C_{27} e C_{29}, l'alcano C_{31} è prodotto in maggior quantità dalle specie erbacee, anche se la differenza non è estremamente marcata [2, 13]. La distribuzione degli alcani nelle piante grasse è invece quella che presenta gli alcani più lunghi, principalmente tra C_{29} e C_{33}, con piccole quantità di C_{35} [14].

Altri parametri utili per distinguere gli alcani prodotti dalle varie specie sono la lunghezza media ponderata delle catene (ACL, *Average Chain Length)* e il *Carbon Preference Index* CPI (che esprime il grado in cui le catene a nC dispari dominano su quelle a nC pari)

$$\text{ACL} = \sum(C_n \times n) / \sum(C_n)$$

Dove C_n è la concentrazione degli alcani con n atomi di carbonio.

$$\text{CPI} = [\sum_{odd}(C_{21-33}) + \sum_{odd}(C_{23-35})]/(2\sum_{even} C_{22-34})$$

Prendendo in considerazione questi parametri si è notato che:

Le piante succulente e l'erba tendono ad essere associate ad un alto ACL, mentre gli alberi e i cespugli vengono associati ad un minore ACL [14].
Gli alcani originati dalla cuticola delle piante hanno un grande CPI (>5), mentre quelli generati dai batteri e dalle alghe hanno CPI inferiori, circa 1. Spesso la diagenesi e il riarrangiamento microbico degli n-alcani sono responsabili dell'abbassamento del CPI (assieme al rilascio di alcani da altre fonti organiche). CPI uguali a 1 invece possono indicare che gli alcani provengono da sversamenti di petrolio o derivati e, se valutato direttamente su un deposito petrolifero, il CPI è utilizzato come indice della sua maturità [3, 15].
Studi recenti hanno dimostrato che non c'è una grossa differenza tra la distribuzione degli alcani nelle foglie esposte alla luce e in quelle più in ombra, come non c'è una forte

differenza tra le foglie estive e quelle autunnali, rendendo indipendente la distribuzione degli alcani rispetto alla posizione delle foglie e alle variazioni stagionali [3].
Fattore importante da tenere in considerazione è la differenza tra la produzione di alcani tra le angiosperme e le gimnosperme: le prime tendono infatti a produrre alcani in maniera molto maggiore rispetto alle seconde. Dal punto di vista paleoclimatologico questo significa che anche in un ecosistema con una minoranza di angiosperme e maggioranza di gimnosperme le angiosperme saranno la fonte dominante di alcani *in situ* [3, 16].

Un parametro che consente il confronto diretto tra la prevalenza della vegetazione boschiva rispetto alle specie erbacee è stato proposto da d'Anjou et al. [17] che, partendo dal presupposto che gli alcani prevalenti negli alberi hanno lunghezze di catena intorno a C_{25}, C_{27} e C_{29}, mentre nelle specie erbacee prevalgono C_{29} e C_{31}, propone il seguente rapporto:

$$\frac{C_{25} + C_{27} + C_{29}}{C_{29} + C_{31}}$$

Più alto risulterà il rapporto, maggiore sarà la prevalenza delle specie arboree sulle specie erbacee. Viceversa, rapporti bassi indicheranno la prevalenza delle specie erbacee.

1.3.4 Acidi n-alcanoici

Gli acidi n-alcanoici, o acidi grassi saturi, sono acidi grassi costituiti da una catena carboniosa satura, cioè formata da legami singoli C-C e da un gruppo acido terminale.

Come nel caso degli alcani, si può utilizzare come indicatore della preservazione delle molecole nella matrice il CPI. Nel caso degli acidi però si avrà una prevalenza delle catene a numero di C pari, quindi il CPI viene modificato. Separando gli acidi n-alcanoici a catena corta (C_{12}-C_{18}) e a catena lunga (C_{22}-C_{32}), si ha un'indicazione riguardo al possibile input di alghe, che producono acidi a catena corta, e piante terrestri, che producono acidi a catena lunga. Occorre però tenere sempre in considerazione i processi di diagenesi che interessano questi composti. Gli acidi n-alcanoici non sono

particolarmente stabili nel tempo, in particolar modo quelli a catena corta, tendono a diminuire notevolmente già nei primi strati di sedimento, in relazione principalmente alla loro maggior solubilità in acqua, che ne aumenta la biodisponibilità [18, 19].

1.3.5 Significato paleoclimatico

È stato dimostrato che lo strato di cera presente sulle foglie non ha una composizione univoca ma tende a variare tra le diverse specie, all'interno della stessa specie in risposta a fattori ambientali [5] o, in alcuni casi, anche durante i diversi stadi della crescita della pianta[10]. Da studi effettuati su piante moderne invece sembra che la posizione nella canopia, e quindi il fatto che le foglie siano esposte al sole o in ombra e le variazioni stagionali non influiscano sulla composizione delle cere [3].
I composti cerosi possono essere trasportati dal vento, dilavati dalle piogge o possono depositarsi nel terreno semplicemente a seguito della caduta delle foglie. Da analisi effettuate su piante odierne e sul territorio circostante è stata riscontrata una buona correlazione tra i composti delle cere e gli analoghi presenti nei sedimenti [14].

I composti costituenti la cera che derivano, come già accennato, dagli acidi n-alcanoici, presentano una diversa stabilità nel tempo tendendo a degradarsi nel seguente ordine:

n-alcani< alcan-2-oni< steroli (stenoli + stanoli) <acidi n-alcanoici< n-alcanoli<acidi n-alchenoici [20]

L'ordine di stabilità è da imputarsi principalmente alla solubilità in acqua: gli alcani, essendo i composti meno idrosolubili, rimangono più stabilmente ancorati al sedimento, dove non subiscono processi degradativi significativi. A riprova di questa ipotesi gli alcani a catena più corta, quindi meno idrofobi, vengono degradati in maniera più significativa rispetto a quelli a catena più lunga [2, 18, 20].
La buona stabilità degli alcani li rende adatti a studi paleoclimatici [18], gli acidi n-alcanoici invece presentano minore stabilità, ma sono comunque di interesse in quanto all'origine di tutti i composti cerosi.

1.4 Stanoli e steroli fecali

I *biomarker* fecali sono steroidi che includono stanoli e steroli, comunemente analizzati assieme come steroli fecali (FeSt) [21].

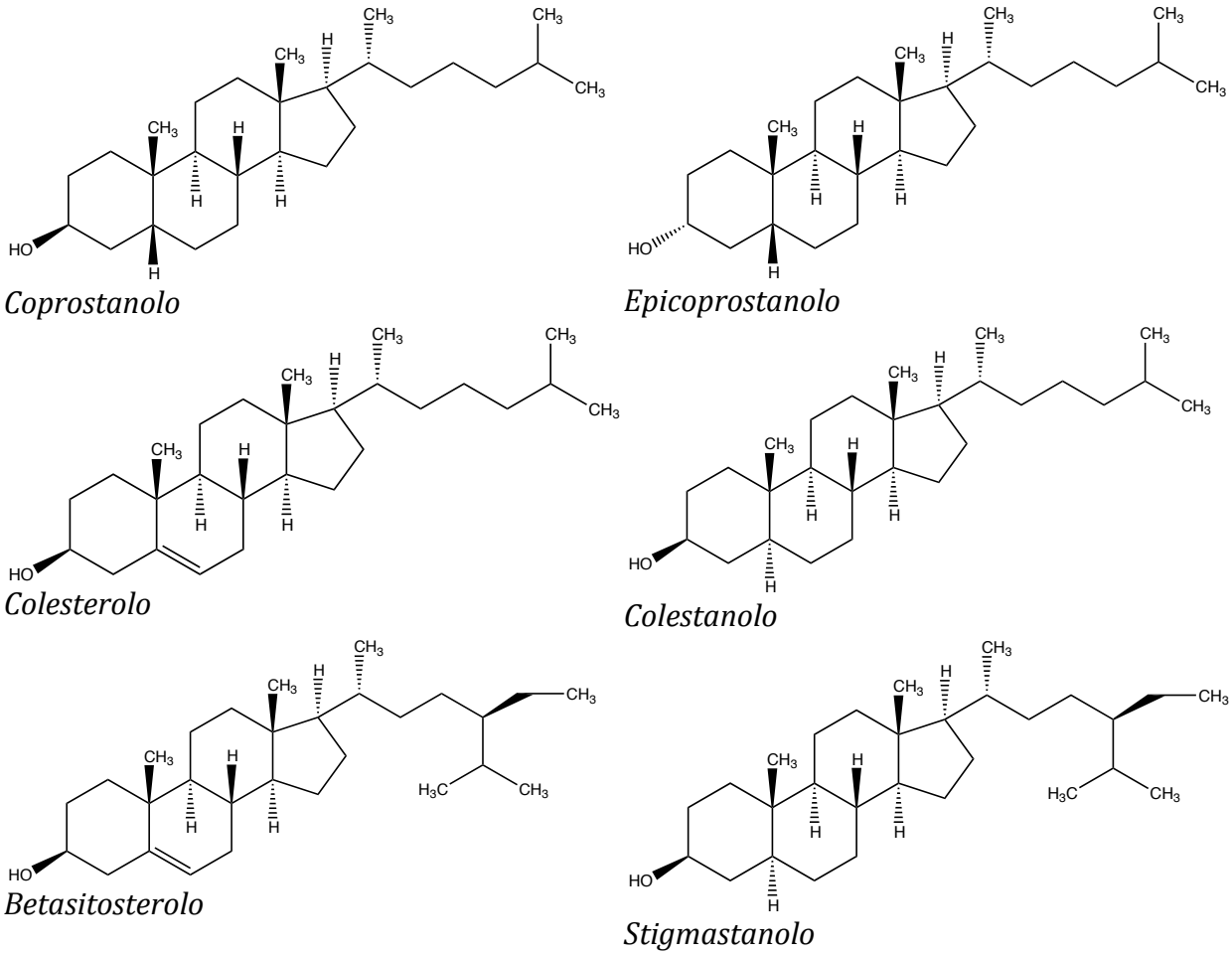

Figura 1.9 - Tabella riassuntiva degli steroli e degli stanoli analizzati

La loro importanza sta nel fatto che i 5β-stanoli come il coprostanolo non sono presenti nell'ambiente acquatico non contaminato, solamente batteri anaerobici, infatti, sono in grado di bioidrogenare il colesterolo nel coprostanolo e questo tipo di batteri sono in linea di massima assenti nelle acque ossigenate. La presenza di stanoli C_{27} in ambienti naturali incontaminati è costituita dall'isomero 5α colestanolo, che è termodinamicamente più stabile del coprostanolo. Piccole quantità di 5β-stanoli possono essere trovate in sedimenti anaerobici non contaminati da materiale fecale, ma il loro contributo relativo alla quantità totale di steroli è generalmente inferiore all'1-

2%. La presenza di 5β-coprostanolo in acqua o sedimento può quindi essere considerata come un chiaro indicatore di contaminazione da parte di materiale fecale.

Il coprostanolo è il 5β-stanolo più presente nelle feci umane e costituisce circa il 60% del contenuto totale di steroli, è stato rilevato anche nelle feci di alcuni altri mammiferi, come maiali e gatti, ma in quantità molto inferiori rispetto a quelle delle feci umane. Anche animali come mucche e pecore presentano nel loro intestino batteri in grado di ridurre Δ^5 steroli a 5β,3β(ol)-stanoli ma, siccome le loro fonti di cibo sono costituite principalmente da erba o altro materiale vegetale, gli steroli precursori sono principalmente C_{29}, come il 5β-stigmasterolo. Di conseguenza gli stanoli omologhi degli steroli C_{29} sono riscontrabili nelle feci di questi erbivori, rendendole distinguibili da quelle umane che contengono invece stanoli C_{27}. L'inquinamento fecale specifico delle pecore può essere riconosciuto grazie alla presenza del meno comune 24-etilepicoprostanolo. È quindi possibile stimare il contributo relativo dell'inquinamento da materiale fecale di animali erbivori e umani tramite la comparazione delle quantità relative di coprostanolo e di 24-etilcoprostanolo.La velocità di degradazione non presenta significative differenze tra steroliestanoli C_{27} e C_{29}, quindi il profilo degli steroli fecali rimane in linea di massima inalterato nel tempo [21].

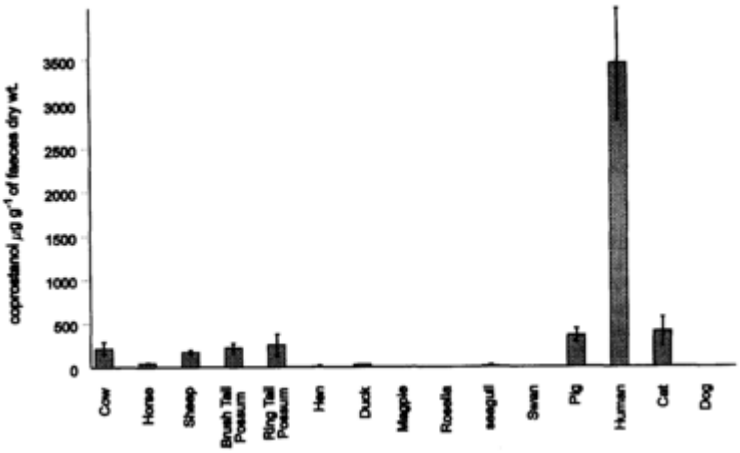

Figura 1.10 - Contenuto di coprosterolo in campioni fecali di varie specie

Anche se steroli e stanoli sono relativamente stabili nell'arco di migliaia di anni e in differenti condizioni ambientali e aerobiche[22–24], batteri aerobici possono degradare il coprostanolo in situ formando l'epimero 5β-colestan-3α-olo (epicoprostanolo). La velocità di degradazione diminuisce fortemente con l'aumentare della profondità in quanto l'assenza di ossigeno inibisce la degradazione. La maggiore velocità di biodegradazione si ha in sedimenti di acque costiere non aerate ed equivale a 0.438 µg g^{-1} day^{-1} [21]. Questa relativa stabilità suggerisce che questi composti possono essere impiegati con successo come traccianti molecolari in contesti archeologici o integrati in

ricostruzioni paleoclimatiche [17, 25–28]. Recentemente D'Anjou et al. [17] hanno utilizzato i *biomarker* fecali come indicatori dell'attività umana a supporto di altre informazioni climatiche ottenute da sedimenti lacustri. A causa della natura idrofobica di questi composti, i *biomarker* fecali si associano preferenzialmente al materiale particolato, che ostacola la loro rimozione in ambiente acquatico, di conseguenza vengono preservati nei sedimenti per millenni. Diversi studi dimostrano che, mediante i rapporti fra diversi FeST, come coprostanolo o fitostanolo, è possibile quindi discriminare tra la presenza umana e/o di altri mammiferi nel passato nelle aree che circondano i siti di campionamento dei sedimenti lacustri [21, 29–34].

Allo stato attuale dell'arte nessuno studio ha considerato gli steroli fecali nella torba ma, in considerazione del fatto che spesso le torbiere sono e sono state utilizzate come pascoli, questo tipo di dato può essere molto interessante per rintracciare la presenza umana e animale nei siti studiati.

1.5 Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono una classe di composti organici la cui struttura fondamentale è caratterizzata da uno o più anelli aromatici condensati (fig. 1.11), il composto più semplice appartenente a questa classe è il naftalene, costituito da due anelli aromatici condensati.

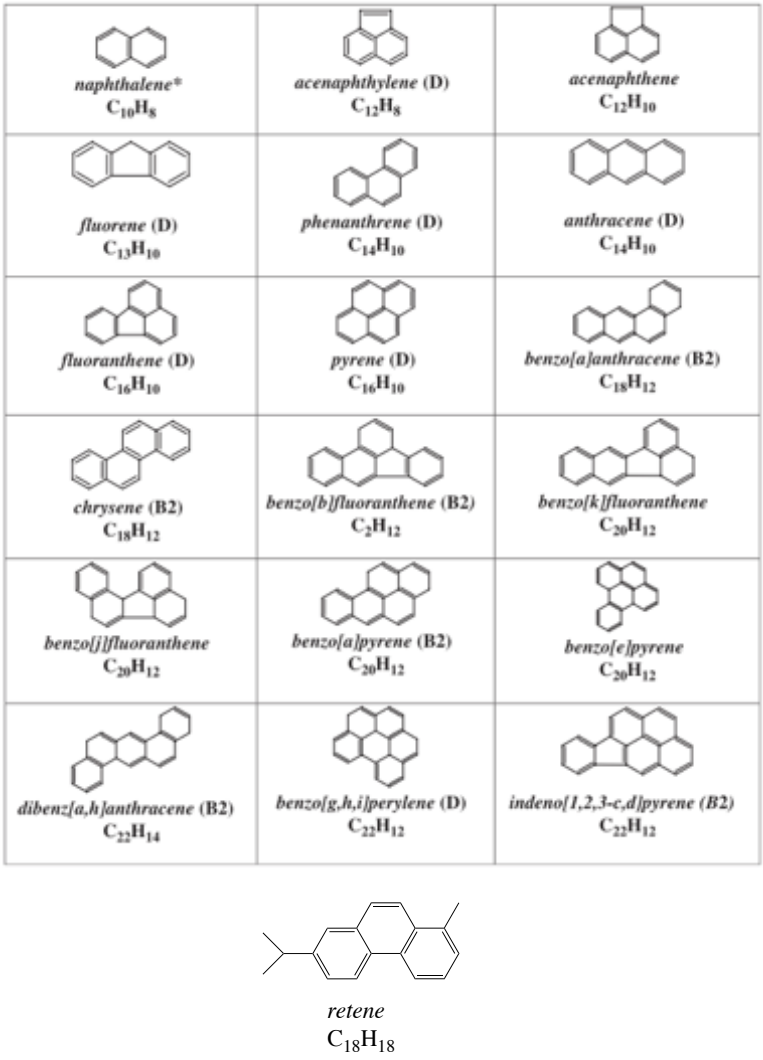

Figura 1.11 - Tabella riassuntiva di alcuni IPA comuni [35]

Per quanto riguarda le loro caratteristiche chimico-fisiche, gli IPA si presentano come solidi e hanno generalmente bassa tensione di vapore, che tende a diminuire al diminuire del peso molecolare, tanto che i composti a basso PM tendono a sublimare a temperatura ambiente [35]. Hanno una solubilità in acqua relativamente bassa (es 3.8 µg/L a 25°C per il benzo[*a*]pirene) ma sono fortemente lipofili e solubili nella maggior parte dei solventi organici, hanno generalmente alti punti di fusione ed ebollizione [36].

Le fonti di produzione degli IPA, così come il loro destino una volta immessi in ambiente, sono state studiati approfonditamente a causa delle elevate proprietà cancerogene e mutagene di alcuni composti, più elevate per i composti che presentano la cosiddetta "regione di recesso", come il benzo[*a*]pirene [37]; inoltre, la concentrazione e le fonti di questi composti sono attentamente monitorate.

Essendo presenti nel petrolio, possono essere rilasciati direttamente nell'ambiente, oppure possono essere generati da attività umane o processi naturali. Anche i processi di diagenesi possono generare alcuni IPA (come il perilene) a partire da precursori biologici [38–40], anche se i meccanismi non sono ancora del tutto noti. In generale, ad ogni modo, la biosintesi è considerata una fonte localizzata con modesto impatto su scala globale.

La più importante e ubiquitaria fonte di IPA è invece l'incompleta combustione di biomasse (come il legno) e combustibili fossili (petrolio e carbone), mediante l'ossidazione di idrocarburi saturi in condizioni di carenza di ossigeno [41].

I processi principali di reazione sono la pirosintesi e la pirolisi:

- La pirosintesisi ottiene principalmente da idrocarburi a catena corta. A 500°C i legami C-C e C-H subiscono rotture con formazione di radicali liberi, che ricombinandosi condensano in strutture aromatiche resistenti alla degradazione termica. Alla struttura così formata si possono addizionare altri radicali idrocarburici, formando IPA a più alto peso molecolare.
- La pirolisi invece è più comune per gli alcani più pesanti presenti nei combustibili e nel materiale vegetale: consiste in una combustione in carenza di ossigeno che porta ad un cracking termico degli idrocarburi di partenza [35].

Durante la combustione il meccanismo di formazione degli IPA e quello della cenere sono strettamente correlati in quanto gli IPA ad alto peso molecolare (~500–1000 u.m.a.), fungono da precursori delle particelle di cenere. Una correlazione inversa tra la quantità di IPA e quella di cenere è solitamente osservata nelle fiamme, si osserva che la decrescita nella concentrazione degli IPA è tipicamente accompagnata dall'inizio della formazione della cenere [42]. La quantità netta di IPA prodotti ed emessi durante la combustione è limitata dall'incorporazione degli IPA ad alto peso molecolare nella fase solida (cenere) e/o dalla loro distruzione attraverso la combustione diretta [42–44].

Dal momento in cui vengono emessi, gli IPA, che si ritrovano solitamente in miscele complesse piuttosto che come composti singoli [35], tendono a distribuirsi nell'ambiente in relazione al loro peso molecolare e tensione di vapore, alla loro concentrazione e alla quantità e al tipo di particelle fini presenti nell'atmosfera [45, 46]. In linea generale gli IPA a basso peso molecolare (due e tre anelli) si trovano in atmosfera principalmente in fase gassosa, quelli a peso molecolare maggiore (cinque o più anelli) si trovano principalmente allo stato solido, legati a particolato atmosferico, suoli o sedimenti, mentre quelli a peso molecolare intermedio possono ripartirsi tra la fase gassosa e il particolato in relazione alle condizioni atmosferiche (vedi tab. 1.2) [36, 41].

Tabella 1.2 - Ripartizione gas/particolato di alcuni IPA [35]

IPA	*Ripartizione gas/particolato*
Acenaftene	Fase gassosa
Acenaftilene	Fase gassosa
Antracene	Fase gassosa e particolata
Fenantrene	Fase gassosa e particolata
Pirene	Fase gassosa e particolata
Benzo[a]antracene	Fase particolata
Crisene	Fase particolata
Benzo[b]fluorantene	Fase particolata
Benzo[j]fluorantene[b]	Fase particolata
Benzo[k]fluorantene	Fase particolata
Benzo[a]pirene	Fase particolata
Benzo[e]pirene	Fase particolata
Fluorantene	Fase gassosa e particolata
Dibenzo[a,h]antracene	Fase particolata
Benzo[ghi]perilene	Fase particolata
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	Fase particolata

La deposizione umida degli IPA è relativamente semplice da valutare in quanto è funzione delle precipitazioni, che possono essere facilmente misurate [47]. Tipicamente gli IPA presenti in fase gas si dissolvono all'interno delle nuvole e delle gocce di pioggia, mentre gli IPA legati alle particelle sono lavati via dall'atmosfera tramite le precipitazioni [48]. La deposizione secca invece è causata dalla caduta diretta delle particelle sulle quali gli IPA sono adsorbiti e il meccanismo è strettamente correlato alle dimensioni delle particelle stesse [45, 49]. La misurazione della velocità della deposizione secca è complicata a causa della difficoltà di misurazione della velocità di deposizione delle particelle atmosferiche, che è in funzione prevalentemente di condizioni atmosferiche, come la velocità del vento e l'umidità [47].

Una volta depositati nei sedimenti, gli IPA presentano una buona stabilità nel tempo [41]. Nonostante ciò, si è notato che quelli a basso peso molecolare, come il naftalene, sono più soggetti a degradazione microbica rispetto a quelli ad alto peso molecolare. La suscettibilità alla biodegradazione decresce generalmente con il crescere del numero di anelli aromatici fusi assieme, è stato anche dimostrato che la sostituzione alchilica fa

diminuire la velocità di degradazione [50, 51]. Contrariamente a quanto si pensava in passato, la biodegradazione degli IPA può avvenire anche in sedimenti anossici, in condizioni che favoriscano la denitrificazione e la solfato-riduzione, come nella degradazione aerobica, gli IPA con più basso peso molecolare e quindi più solubili si degradano più velocemente rispetto ai composti a peso molecolare più alto [51, 52]. Oltretutto, comparando composti con lo stesso peso molecolare si evince che i batteri degradano più facilmente l'isomero più solubile. Partendo da queste considerazioni si può dedurre che i microorganismi assimilano di preferenza i substrati dalla fase acquosa [53]. Questo implica che gli IPA legati al particolato risultano meno suscettibili alla degradazione ad opera dei microorganismi. Come risultato gli IPA non alchilati risultano meno soggetti alla biodegradazione rispetto agli omologhi alchilati, che essendo più solubili si riscontrano in quantità molto inferiori nei sedimenti [54].

In linea generale, le fonti degli IPA che si trovano in ambiente possono essere distinte in cinque classi: domestica, industriale, agricola, da trasporto, naturale [35].

È possibile discriminare se la fonte degli IPA è pirogenica o petrogenica mediante i rapporti tra alcuni IPA, ad esempio mediante la somma del metilfenantrene e metilantracene su fenantrene, del fluorantrene sul pirene e del 4,5-dimetilfenantrene sulla somma del metilfenantrene e metil antracene [55–62]. In linea generale, gli IPA derivanti dal petrolio tendono ad essere molto alchilati, mentre quelli pirogenici risultano significativamente meno sostituiti [41].

L'analisi degli IPA in sedimenti consente di stimare in maniera accurata anche il tipo e la quantità dei diversi combustibili utilizzati nel tempo [41]. Numerosi studi, sfruttando il trend noto del consumo di combustibili negli USA, hanno determinato le fonti di IPA presenti in sedimenti marini e lacustri [63–67], in suoli [68, 69], e nella torba [70], ottenendo una buona correlazione tra il profilo di concentrazione degli IPA e il consumo di energia associato all'industrializzazione [41].

Diversi rapporti, come l'1,7-dimetilfenantrene sul 2,6-dimetilfenantrene, sono invece utilizzabili per stimare il contributo degli IPA pirogenici provenienti dalle combustioni di biomasse (maggiore quantità di 1,7-DMPhen) o da combustioni di combustibili fossili (maggiore quantità di 2,6-DMPhen) [71].

Alcuni studi hanno tentato di caratterizzare le emissioni generate dalla combustione di differenti tipi di biomasse. I dati disponibili in letteratura includono specie come: pini, querce, eucalipti, aceri rossi, querce rosse, betulle, pini bianchi, tsuga, abete balsamico, orzo, mais, riso, grano, mandorla, noce, pino giallo e abete di Douglas. Si è notato che l'emissione di IPA può variare anche di due ordini di grandezza in funzione solamente del tipo di vegetazione bruciato. Altri parametri come le condizioni di combustione, se il fuoco è o meno alimentato, e persino come la legna viene impilata, possono portare a differenti produzioni di questi composti [72–74].
Un esempio della quantità e del tipo di IPA che si possono ottenere dalla combustione del legno è riportato nella tab 1.3 realizzata da Jenkins et al. bruciando alcuni tipi di legname in diverse condizioni [75].

Tabella 1.3 - IPA prodotti dalla combustione di legame [75]

PAH Emission Factors (μg/kg) for Woods[a]

fuel	configuration	PM[b]	Nap (128)	2-mNap (142)	Acy (152)	Ace (154)	Fle (166)	Ph (178)	An (178)	Fla (202)	Py (202)	B[a]A (228)	Chr (228)	B[b]F (252)	B[k]F (252)	B[a]P (252)	B[e]P (252)	Per (252)	B[ghi]P (276)	Ind (276)	D[ah]A (278)	total	total less Nap, 2-mNap
almond	flaming	0.48	8 025	161	3 066	197	74	2 451	447	634	518	243	165	59	56	38	24		3			16 161	7 975
	stoked/flaming	0.62	6 590	128	2 268	159	18	1 627	192	415	376	185	248	27	45	18	10					12 306	5 588
	av		7 307	145	2 667	178	46	2 039	319	524	447	214	206	43	50	28	17		1			14 233	6 781
walnut	flaming	0.51	15 846	2 203	1 180	1 772	1 228	2 778	494	1 329	925	54	80			12	30					27 931	9 881
	stoked flaming	0.38	13 279	1 757	942	1 670	630	1 207	253	1 261	1 021	66	77				7					22 170	7 134
	av		14 563	1 980	1 061	1 721	929	1 993	374	1 295	973	60	78			6	18					25 050	8 508
fir	low flame	0.75	20 951	4 370	3 607	3 650	1 427	6 967	1 271	2 859	2 413	396	335	103	248	61	99					48 755	23 434
	high flame	0.43	6 184	779	1 229	1 387	288	908	175	673	525	104	99	9	25	8	9		5			12 406	5 443
	av		13 567	2 575	2 418	2 518	857	3 938	723	1 766	1 469	250	217	56	136	35	54		2			30 581	14 439
pine	flaming	0.36	8 931	1 316	775	1 224	428	1 934	325	843	613	93	80	48	50	24	27					16 711	6 464
	late flame/smolder	0.50	43 656	5 418	3 521	4 007	1 521	4 789	772	3 039	2 574	184	168				13					69 663	20 589
	mass av		16 960	2 265	1 410	1 868	680	2 594	429	1 351	1 066	114	100	37	39	19	24					28 956	9 731

[a] Blank indicates not detected, treated as zero for averaging. Mol wt given in parentheses. Abbreviations: Nap (naphthalene), 2-mNap (2-methylnaphthalene), Acy (acenaphthylene), Ace (acenaphthene), Fle (fluorene), Ph (phenanthrene), An (anthracene), Fla (fluoranthene), Py (pyrene), B[a]A [benz[a]anthracene), Chr (chrysene), B[b]f (benzo[b]fluoranthene) B[k]F (benzo[k]fluoranthene), B[a]P (benzo[a]pyrene), B[e]P (benzo[e]pyrene), Per (perylene), B[ghi]P (benzo[ghi]perylene), Ind (indeno[1,2,3-cd]pyrene), D[ah]A (dibenz[ah]anthracene). [b] Total particulate matter emission factor (% dry fuel).

Non tutti gli IPA presenti nei sedimenti sono di origine pirogenica o petrogenica: cadalene, retene e simonellite, ad esempio, possono essere utilizzati come *biomarker* per valutare l'input di piante superiori in ricostruzioni paleoclimatiche nel sedimento [38–40, 76–78].

Il retene in particolare è un derivato dell'acido abetico (comune nelle resine delle conifere) che si può formare per degradazione microbica [79] e per degradazione termica durante le combustioni [80].

2 MATERIALI E METODI

2.1 Materiali e strumentazione

2.1.1 Solventi, reagenti e standard

N-esano, diclorometano, metanolo, acetone, acetonitrile, iso-ottanoe toluene, con grado di purezza pesticidi, sono stati acquistati da *Romil Ltd.,* Cambridge, GB.

Come derivatizzante è stata utilizzata la miscela composta da N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetammide e da trimetilclorosilano (BSTFA + 1% TMCS), fornita da *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, MO, USA), alla quale si farà riferimento in seguito con l'abbreviazione BSTFA.

La terra di diatomee e la sabbia di Ottawa, impiegate per l'estrazione con PLE, sono state fornite da *Applied Separations Inc.* (Allentown, PA, USA)

Le soluzioni standard di IPA sono fornite da *CIL* (*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.,* Andover, Massachussets, USA) e *Dr. Ehrenstorfer GmbH* (Augsburg, Germania).
Gli standard di steroli sono fornita da *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, MO, USA).
Gli standard di n-alcani C_{10}-C_{35} sono forniti da *Dr. Ehrenstorfer GmbH* (Augsburg, Germania), mentre l'esatriacontano è fornito da *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, MO, USA).

Gli standard di acidi n-alcanoici nativi e di acido stearico ^{13}C sono stati preparati per pesata da solidi forniti da *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, MO, USA).

2.1.2 PLE (Pressurized Liquid Extraction)

L'estrazione degli analiti dalla matrice è realizzata in un estrattore solido-liquido ad alta pressione (PLE, *FMS, fluid managment sistem inc, Watertown, MA, USA*), che consente di effettuare un'estrazione simile a quella ottenuta in un *Soxhlet* ma ad alte pressioni e temperature, in cui il solvente raggiunge condizioni simili a quelle di un fluido supercritico,

Figura 2.1 - PLE

migliorando di molto l'efficienza e riducendo di conseguenza i tempi e le quantità di solvente richieste.

Il campione viene inserito in un supporto cilindrico in acciaio inossidabile (*vessel*) e disperso con terra di diatomee e sabbia di Ottawa. Ad esso vengono aggiunti gli standard interni e successivamente il solvente viene pompato all'interno della cella di estrazione e portato alla pressione e alla temperatura impostate: in questo caso 1000 psi e 100 °C. Alla fine di ogni ciclo l'estratto viene scaricato nella *vial* di raccolta e fatto seguire da un flusso di azoto che assicura l'uscita di tutto il solvente dal sistema.

2.1.3 Turbovap® II

Prima e dopo la fase di purificazione il volume del campione deve essere ridotto mediante evaporazione del solvente. La concentrazione viene effettuata in un *TurbovapII*® (*Caliper Life Science*, Hopkinton, MA, USA), che permette di effettuare il processo in condizioni controllate.

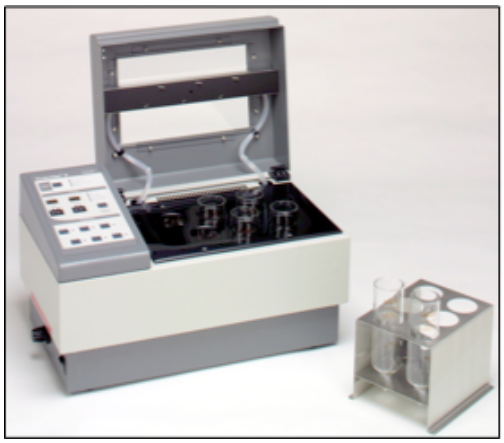

Figura 2.2 - Turbovap® II

Operativamente gli estratti sono trasferiti in ditali di vetro (*Zymark*®) di volume di 200 mL, immersi in un bagno a temperatura controllata, come da figura, alloggiandoli in sei postazioni corrispondenti ad altrettanti ugelli da cui viene erogato un leggero flusso di azoto per facilitare l'evaporazione. Il raggiungimento del volume finale desiderato (0.5 mL) è segnalato da un sensore ottico.

2.1.4 Visiprep e SPE

Dopo che i campioni sono stati estratti e il loro volume ridotto, si effettua una purificazione mediante cartucce *SPE* (*Solid Phase Extraction*). Le cartucce SPE consentono di alleggerire il carico di interferenti nel campione e di separare cromatograficamente le diverse classi di composti presenti nell'estratto;

Figura 2.3 - Cartucce monouso in gel di silice

sono costituite da un tubicino in teflon riempito per metà di un solido (in questo caso silice neutra, SupelcoDiscovery® SPE DSC-Si Silica Tube) che funge da fase stazionaria, mentre un solventeo una miscela costituiscono la fase mobile.

2.1.5 Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (gc-ms)

L'analisi di tutti gli analiti viene svolta attraverso un gascromatografo (*Agilent Technologies 7890A GC System*) accoppiato a un analizzatore di massa al quadrupolo (*Agilent Technologies 5975C inert MSD*) utilizzato in modalità SIM (*Single Ion Monitoring*).

Figura 2.4 – GC-MS

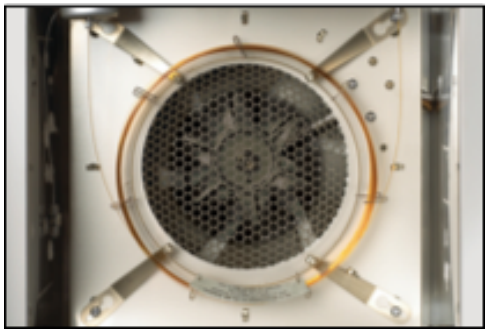

Figura 2.5 - Colonna capillare

La fase mobile è costituita da elio, che trasporta il campione vaporizzato lungo la colonna, al termine della quale si ha la ionizzazione mediante un fascio di elettroni prodotto dalla sorgente ad impatto elettronico (*EI*). Lo spettrometro di massa è programmato per lavorare in modalità positiva, ovvero per rivelare i frammenti positivi caratterizzati da un determinato rapporto massa/carica (*m/z*). La colonna capillare (*HP5-MS* da 60 m)è in silice fusa con fase stazionaria in (5%-fenil)-metilpolisilossano (*Agilent Technologies,* 0.250 mm·0.25 µm).

2.2 Quantificazione

Poiché a diversi analiti corrispondono diverse sensibilità strumentali, le concentrazioni trovate devono essere corrette mediante fattori di risposta. Queste correzioni vengono effettuate sottoponendo soluzioni di composti nativi e standard interni ad analisi gascromatografica nelle stesse condizioni dei campioni; dal confronto delle aree si calcolerà poi il fattore di risposta per ogni composto secondo la formula:

$$FR_i = \frac{[A_i C_{is}]}{[A_{is} C_i]}$$

in cui

A_i = area del picco del composto nativo

A_{is}= area del picco dello standard interno

C_i = concentrazione del composto nativo nella soluzione

C_{is} = concentrazione dello standard interno nella soluzione

Come standard interni sono stati utilizzati l'acido stearico marcato ^{13}C per gli acidi alcanoici, l'esatriacontano per gli n-alcani, il colesterolo marcato ^{13}C per gli steroli e stanoli, acenaftilene, fenantrene e benzo(a)pirene, tutti marcati ^{13}C, per gli IPA. I composti che fungono da standard interni devono dare segnali il più simili possibile a quelli degli analiti, sia per quanto riguarda l'intensità del segnale che per quanto riguarda il tempo di ritenzione, al tempo stesso però i segnali degli standard interni devono essere ben distinguibili da quelli degli analiti, onde evitare che si creino interferenze reciproche. L'esatriacontano è un n-alcano (C_{36}) che non viene prodotto in natura ma ha lunghezza e caratteristiche molto simili a quelle del range di alcani preso in esame (C_{10}-C_{35}) mentre i composti marcati presentano lo stesso tempo di ritenzione del relativo composto nativo, ma avendo una massa diversa sono facilmente distinguibili dallo spettro.

Per gli n-alcani e gli acidi n-alcanoici, il cui metodo gascromatografico è stato interamente sviluppato in questo lavoro, sono state fatte due rette di taratura. Le rette di taratura consentono di verificare la linearità tra l'aumento di concentrazione (variabile

indipendente) e l'aumento del relativo segnale (variabile dipendente), condizione essenziale per la quantificazione degli analiti.

La retta di taratura degli alcani è stata ottenuta da cinque soluzioni a concentrazione crescente nell'intervallo di concentrazione 0.1 ng – 6 ng μL^{-1} in *n*-esano, mentre la concentrazione di standard interno è mantenuta costante a 1 ng μL^{-1}. Per ogni soluzione sono state effettuate tre prove ripetute per calcolare la deviazione standard di ogni punto.
I rapporti tra aree e concentrazioni dei singoli composti nativi e standard interno, con le relative deviazioni standard, sono riportati in appendice per ogni soluzione.

Di seguito vengono riportate le rappresentazioni grafiche di alcune rette come esempio.

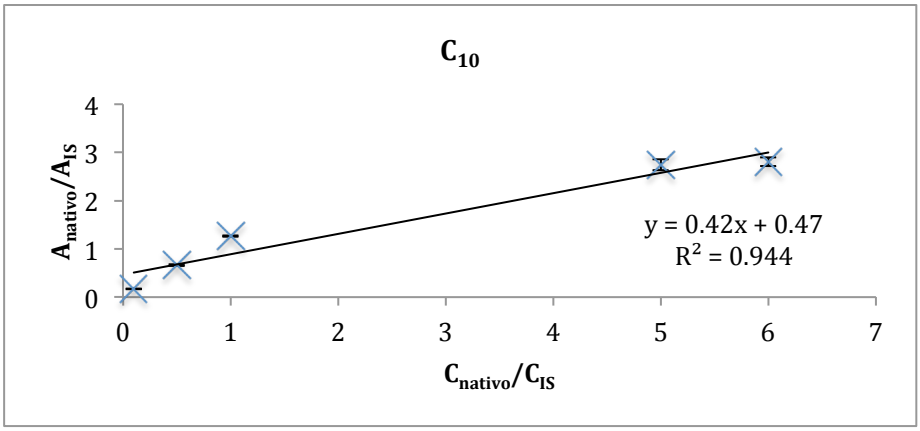

Figura 2.6 - Retta di taratura n-alcano C_{10}

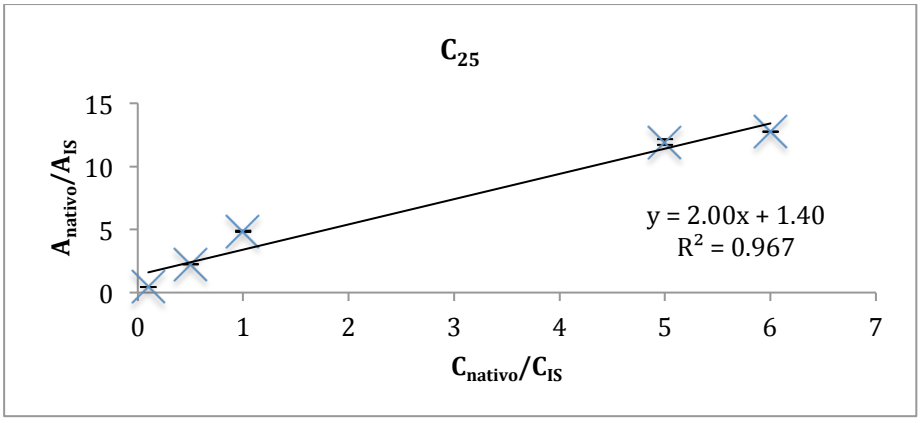

Figura 2.7 - Retta di taratura n-alcano C_{25}

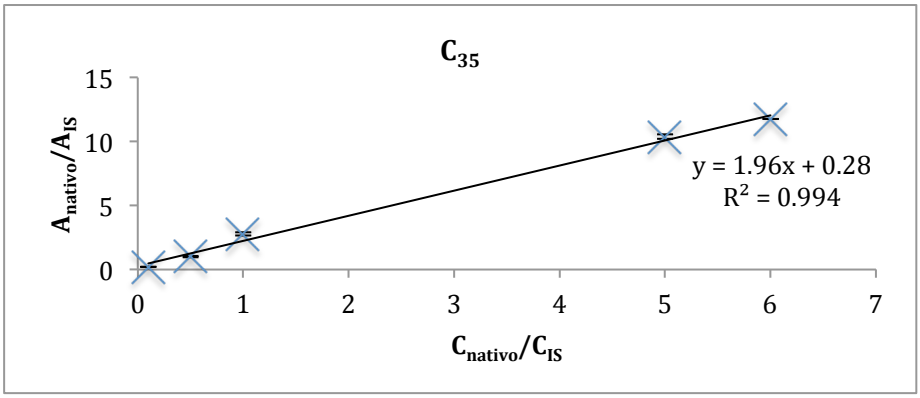

Figura 2.8 - Retta di taratura n-alcano C_{35}

I valori di pendenza, intercetta e del coefficiente di regressione lineare (r^2) delle rette di taratura per i singoli composti sono i seguenti:

Tabella 2.1 - Rette di taratura n-alcani

	pendenza	intercetta	r^2
C_{10}	0.42	0.47	0.944
C_{11}	0.42	0.43	0.941
C_{12}	0.49	0.54	0.934
C_{13}	0.63	0.74	0.926
C_{14}	0.84	1.03	0.922
C_{15}	1.08	1.33	0.921
C_{16}	1.30	1.61	0.919
C_{17}	1.47	1.77	0.923
C_{18}	1.62	1.93	0.923
C_{19}	1.74	1.99	0.925
C_{20}	1.93	2.16	0.926
C_{21}	1.92	1.87	0.938
C_{22}	1.96	1.74	0.952
C_{23}	1.98	1.58	0.959
C_{24}	1.98	1.57	0.961
C_{25}	2.00	1.40	0.967
C_{26}	2.01	1.31	0.970
C_{27}	1.96	1.14	0.975
C_{28}	1.90	1.10	0.977
C_{29}	2.10	1.20	0.976
C_{30}	2.21	1.05	0.980
C_{31}	2.25	0.93	0.983
C_{32}	2.31	0.80	0.986
C_{33}	2.33	0.65	0.989
C_{34}	2.29	0.50	0.992
C_{35}	1.96	0.28	0.995

Il valore medio di r^2 per gli n-alcani è 0.954.

La retta di taratura degli acidi alcanoici è stata ottenuta con cinque soluzioni a concentrazione crescente nell'intervallo 1 ng – 20 ng μL^{-1} in diclorometano, mentre la concentrazione dello standard interno è 10 ng μL^{-1} in tutte le soluzioni. Per ogni soluzione sono state effettuate tre prove ripetute per calcolare la deviazione standard di ogni punto, i dati sono riportati in appendice.

Di seguito vengono riportate le rappresentazioni grafiche di alcune rette come esempio.

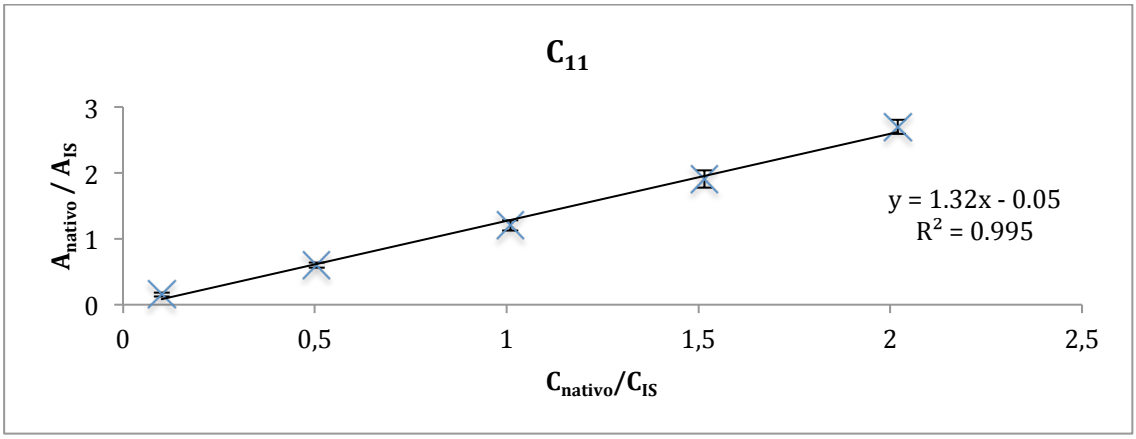

Figura 2.9 - Retta di taratura acido n-alcanoico C_{11}

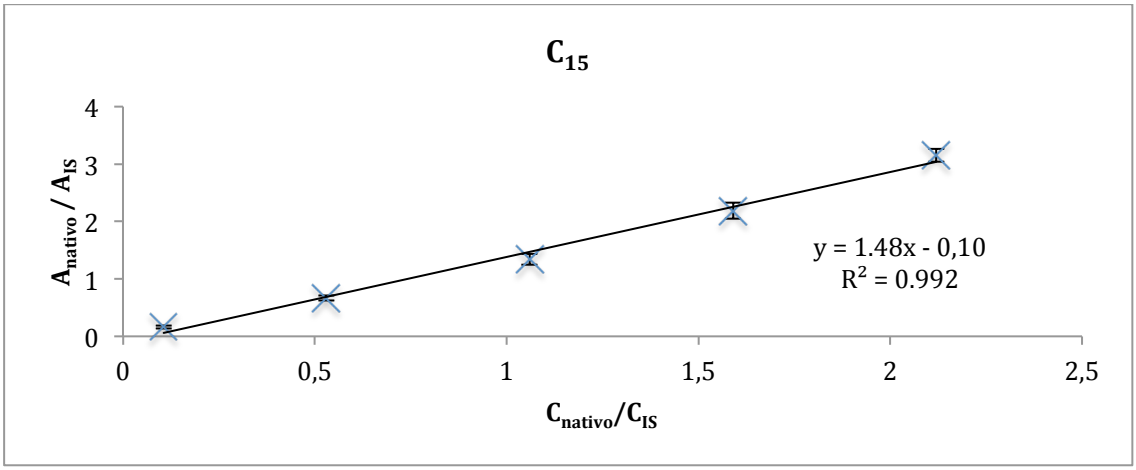

Figura 2.10 - Retta di taratura acido n-alcanoico C_{15}

I valori di pendenza, intercetta e del coefficiente di regressione lineare (r^2) delle rette di taratura per i singoli composti sono i seguenti:

Tabella 2.2 - Rette di taratura acidi n-alcanoici

	pendenza	intercetta	r^2
C_{11}	1.32	-0.05	0.995
C_{12}	1.21	-0.06	0.994
C_{13}	1.12	-0.06	0.994
C_{14}	1.06	-0.03	0.995
C_{15}	1.48	-0.10	0.992
C_{16}	1.60	0.74	0.746
C_{17}	1.42	-0.07	0.995
C_{18}	1.50	0.31	0.889
C_{19}	1.29	-0.13	0.988
C_{20}	1.12	-0.14	0.985
C_{21}	0.95	-0.11	0.983
C_{22}	0.86	-0.09	0.979
C_{23}	0.65	-0.08	0.977
C_{24}	0.53	-0.05	0.974

Il valore medio di r^2 per gli acidi alcanoici è 0.963.

La quantificazione degli analiti nei campioni può essere effettuata sia con la retta di taratura che con il fattore di risposta.

Con il fattore di risposta la formula da adottare è la seguente:

$$C_x = \frac{A_x \cdot Q_{is}}{A_{is} \cdot p \cdot FR_i}$$

dove

A_x = area del picco dell'analita

Q_{is} = quantità assoluta dello standard interno aggiunto prima dell'estrazione

A_{is} = area del picco del composto marcato aggiunto prima dell'estrazione (standard interno)

p = peso del campione di torba estratto

FR_i = fattore di risposta per il composto nativo

Con la retta di taratura la formula adottata è la seguente:

$$C_x = \frac{(A_x \cdot Q_{is}) - q}{A_{is} \cdot p \cdot m}$$

dove

A_x = area del picco dell'analita

Q_{is} = quantità assoluta dello standard interno aggiunto prima dell'estrazione

q = intercetta della retta di taratura

A_{is} = area del picco del composto marcato aggiunto prima dell'estrazione (standard interno)

p = peso del campione di torba estratto

m = pendenza della retta di taratura

Il calcolo con la retta di taratura è generalmente più preciso ma, a meno che non si analizzino tutti i punti della retta ogni volta che si analizza un campione, è necessario approssimare che la risposta strumentale per analiti e standard interno non cambi nel tempo.

Il fattore di risposta invece costituisce di fatto una pseudo retta di taratura, in cui l'intercetta è uguale a zero(approssimando che a concentrazione nulla sia nullo anche il segnale e viceversa) e l'unico punto è quello con le concentrazioni del fattore di risposta. Il vantaggio sta nel poter analizzare un fattore di risposta ogni volta che si analizza una serie di campioni, tenendo quindi conto degli eventuali cambiamenti nella risposta strumentale per analiti e standard interno, dovuti ad esempio all'usura della colonna cromatografica e della sorgente dello spettrometro di massa.

Per i composti derivatizzati, in virtù del fatto che il loro segnale non è stabile in tempi lunghi, l'accuratezza maggiore si ottiene con il fattore di risposta, che viene derivatizzato e iniettato con la medesima procedura e le medesime tempistiche dei campioni stessi.

Per gli IPA si è visto che l'approssimazione con il fattore di risposta permette di ottenere buoni livelli di precisione e accuratezza.

Per gli n-alcani invece si è notato che l'utilizzo del fattore di risposta portava a notevoli errori di quantificazione e ad una bassa accuratezza, pertanto si è deciso di analizzare i campioni immediatamente dopo l'analisi della retta di taratura.

2.3 Limite di rivelabilità strumentale

Il limite di rivelabilità strumentale, o *Instrumental detection Limit* (**IDL**), esprime la più bassa quantità di campione che può essere rivelata dallo strumento e viene calcolato sommando al valore di bianco strumentale tre deviazioni standard dello stesso [81].

I limiti di rilevabilità strumentale di n-alcani e acidi alcanoici sono i seguenti:

Tabella 2.3 - IDL n-alcani (ng)

n-alcani			
	C = 0	DEV ST	IDL
C_{10}	0.07	0.03	0.15
C_{11}	0.05	0.03	0.14
C_{12}	0.11	0.04	0.24
C_{13}	0.2	0.1	0.5
C_{14}	0.5	0.2	1.1
C_{15}	0.5	0.2	1.0
C_{16}	0.7	0.2	1.3
C_{17}	0.6	0.1	1.0
C_{18}	1.2	0.7	3.2
C_{19}	1.2	0.7	3.4
C_{20}	1.3	0.7	3.3
C_{21}	0.86	0.08	1.09
C_{22}	0.94	0.09	1.21
C_{23}	0.9	0.1	1.3
C_{24}	0.7	0.3	1.5
C_{25}	0.5	0.3	1.3
C_{26}	0.4	0.1	0.7
C_{27}	0.28	0.09	0.54
C_{28}	0.18	0.04	0.30
C_{29}	0.11	0.07	0.31
C_{30}	0	0	0
C_{31}	0	0	0
C_{32}	0	0	0
C_{33}	0	0	0
C_{34}	0	0	0
C_{35}	0	0	0
media n-alcani	0.4	0.2	0.9

Tabella 2.4 - IDL acidi n-alcanoici (pg)

acidi n-alcanoici			
	C = 0	DEV ST	IDL
C_{11}	1.1	0.1	1.6
C_{12}	23	1	27
C_{13}	1.1	0.1	1.5
C_{14}	3.7	0.6	5.5
C_{15}	4.6	0.4	5.7
C_{16}	1.6×10^{2}	0.3×10^{2}	2.6×10^{2}
C_{17}	5.5	0.5	7.1
C_{18}	2.0×10^{2}	0.2×10^{2}	2.7×10^{2}
C_{19}	3.1	0.2	3.9
C_{20}	5.4	0.3	6.1
C_{21}	1.20	0.09	1.46
C_{22}	3.7	0.2	4.3
C_{23}	1.93	0.05	2.08
C_{24}	7	2	13
media acidi alcanoici	30	5	44

I limiti di rivelabilità strumentali per IPA, steroli e stanoli sono stati determinati nei lavori di Battistel et al. [80] e Piazza et al. [38–40, 76–78] e vengono riportati in appendice.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Messa a punto del metodo

La messa a punto del metodo fa riferimento alle metodiche utilizzate per analizzare le singole classi di composti prese in esame in questa tesi:

- Per gli steroli si è preso in considerazione il metodo sviluppato da Battistel et al. [21] per l'analisi di *biomarker* fecali in sedimenti, che prevede un'estrazione con diclorometano tramite PLE e una purificazione su cartucce da 2 g di silice neutra con diclorometano. I campioni, una volta concentrati, vengono derivatizzati con BSTFA e analizzati tramite GC-MS e quantificati utilizzando colesterolo ^{13}C come standard interno.
- In relazione al loro potere cancerogeno e alla loro ubiquità come inquinanti, le metodiche per l'analisi degli IPA sono state sviluppate ampiamente. La metodica GC MS utilizzata in questo lavoro è quella sviluppata da Piazza et al. all'interno del gruppo di ricerca per l'analisi di IPA nell'aerosol antartico [82] e in quello della laguna di Venezia [83], il resto della metodica specifica per la torba è invece stato sviluppato in questo lavoro.
- Nel caso degli alcani le procedure di analisi che si possono trovare in letteratura sono molte, alcune delle quali sviluppate per la valutazione dei depositi petroliferi e dell'inquinamento causato da sversamenti di petrolio più che per ricostruzioni paleoclimatiche [84]. Nel corso degli anni sono state sviluppate svariate metodiche per l'analisi degli alcani in quanto *biomarker*, in genere accoppiate all'analisi di altri traccianti [4, 13, 85–97]. Le matrici sulle quali queste analisi sono state effettuate comprendono suoli [13, 92], torba [4, 89, 93, 97], sedimenti marini [84, 85, 87, 88, 90], lacustri [86, 91, 94–96] e fluviali [89].

  Le procedure in genere prevedono un'estrazione con miscele di diclorometano-metanolo [4, 13, 86, 88, 90, 92, 94, 96] in Soxhlet [13, 86, 88, 90, 94] o con ultrasuoni [4, 84, 87, 89, 96, 97]. Segue una purificazione su colonnine di silice neutra [4, 13, 92, 95–98] o silice mista ad allumina [85, 86, 94], utilizzando esano come solvente [4, 13, 85, 94, 95, 97].

  La quantificazione viene effettuata solitamente tramite gascromatografia con detector a ionizzazione di fiamma (GC-FID) [86, 94, 96] o gascromatografia accoppiata con spettrometria di massa (GC-MS) [13, 87, 88, 92, 97, 98]: in alcuni

casi lo spettrometro di massa è stato utilizzato per il riconoscimento dei picchi, utilizzando poi il FID per la quantificazione [4, 85, 95]. Gli standard interni più utilizzati sono esatriacontano [96, 99], squalene [98], esametilbenzene [86], docosene [95], fenantrene [87], tetracosano [89] oppure sono stati utilizzati standard deuterati come d_{42}-n-C_{20} [92].

- Anche gli acidi n-alcanoici, pur essendo trattati in maniera minore rispetto agli alcani, vengono generalmente analizzati assieme ad altri *biomarker* (spesso gli alcani stessi). Nel tempo sono state sviluppate svariate metodiche di analisi su varie matrici ambientali, tra cui torba [97, 100], sedimenti marini [90], lacustri [20, 86, 96, 99, 101, 102] e fluviali [100] e stalagmite [103].

  Le procedure in genere prevedono un'estrazione con miscele di diclorometano-metanolo [86, 90, 96, 102] in Soxhlet [20, 90, 99, 103] o con ultrasuoni [96, 97, 100–102]. Segue una purificazione su colonnine di silice neutra [20, 97, 99], silice mista allumina [86] o aminopropile [96, 102], utilizzando metanolo [97, 103], una miscela diclorometano-metanolo [86] o acido acetico in etere nel caso dell'aminopropile [96, 102] come solvente.

  Come per gli n-alcani, la quantificazione viene effettuata solitamente tramite GC-FID [96, 99] e/o GC-MS [20, 86, 97, 100, 104]. Prima dell'iniezione gli analiti vengono derivatizzati con BSTFA [86, 100, 103] o metilati [20, 90, 96, 97, 104].

  Gli standard interni più utilizzati sono androstano [104] ed acido esadecanoico [100].

3.1.1 Decontaminazione del materiale e degli strumenti

La vetreria è lavata con acqua e detergente Contrad® al 2-5% in volume, asciugata con acetone e decontaminata con tre aliquote di n-esano e tre di DCM. La medesima procedura di decontaminazione è eseguita anche sul materiale monouso, come *vial* e pipette Pasteur.

Prima di ogni estrazione con PLE la *vessel* in acciaio inossidabile e i tappi in teflon vengono lavati con acqua e detergente Contrad®, e decontaminati con una aliquota di n-esano e una DCM in bagno ad ultrasuoni per 6 minuti.

La decontaminazione della sabbia di Ottawa e della terra di diatomee, impiegate nella procedura estrattiva, prevede tre cicli estrattivi con miscela ESA : DCM = 1:1 (v/v). Temperatura e pressione del PLE durante i cicli di decontaminazione sono impostate rispettivamente a 100°C e 2300 psi. Con gli stessi parametri e solventi è eseguita la pulizia delle linee dello strumento.

L'anidrificante utilizzato durante l'estrazione (Na_2SO_4) viene posto, prima dell'utilizzo, per 24 ore in stufa alla temperatura di 150 °C e successivamente decontaminato con tre lavaggi in DCM e tre in n-esano in bagno a ultrasuoni, per essere poi conservato in n-esano.

3.1.2 Derivatizzazione

Steroli e acidi alcanoici hanno alti punti di ebollizione, che li renderebbero difficilmente analizzabili tramite gascromatografia. Per aumentare la loro volatilità generalmente si derivatizza tramite metilazione per gli acidi alcanoici [86, 100, 103] o sostituzione con gruppo TMS dell'idrogeno alcolico per gli steroli [21, 22, 105] o acido per gli acidi alcanoici [20, 90, 96, 97, 104].

La reazione con il BSTFA è la seguente:

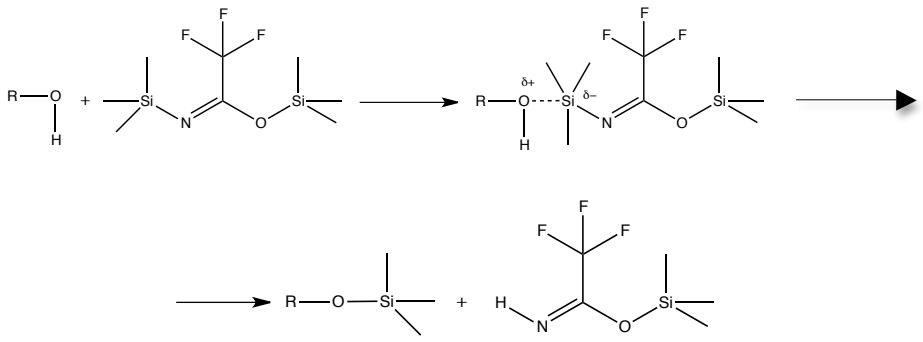

Figura 3.1 - Reazione di derivatizzazione con BSTFA

In cui a reagire è il gruppo acido per gli acidi alcanoici e alcolico per gli steroli.

La derivatizzazione degli steroli presi in esame è già stata ottimizzatada Battistel et al. e le condizioni migliori di reazione prevedono un rapporto BSTFA : campione=1:1 (v:v) 70 °C per 1 h.

La derivatizzazione degli acidi alcanoici è stata studiata in soluzioni di standard nativi e acido stearico marcato a 50 ng μL^{-1} in diclorometano, utilizzando le stesse condizioni (70°C per 1 h) impiegate per gli steroli. Per verificare l'efficacia della derivatizzazione e la sua stabilità nel tempo, un'aliquota da 100 µL di soluzione è stata derivatizzata con 100 µL di BSTFA: nella tabella e nel grafico seguente sono espresse le variazioni relative del segnale di ogni acido n-alcanoico nel tempo normalizzate rispetto all'area misurata al tempo 0.

Tabella 3.1– Variazione nel tempo delle aree degli acidi n-alcanoici derivatizzati

hh:mm	C_{11}	C_{12}	C_{13}	C_{14}	C_{15}	C_{16}	C_{17}	C_{18}	C_{19}	C_{20}	C_{21}	C_{22}	C_{23}	C_{24}	$^{13}C_{18}$	media acidi n-alcanoici
0:00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5:54	0.94	0.92	0.92	0.92	0.89	1.03	0.88	0.95	0.83	0.78	0.73	0.66	0.60	0.53	0.88	0.81
10:50	0.89	0.92	0.92	0.97	0.89	2.06	0.87	1.51	0.74	0.67	0.59	0.51	0.43	0.34	0.79	0.73
20:27	0.87	0.90	0.90	0.96	0.89	2.06	0.93	1.63	0.88	0.88	0.88	0.85	0.88	0.86	0.89	0.89
40:27	0.96	1.04	1.03	1.20	1.03	4.53	1.12	3.30	0.85	0.79	0.71	0.60	0.53	0.41	0.90	0.86
106:48	2.47	2.55	2.67	3.10	2.88	9.80	3.17	8.35	3.00	3.11	3.27	3.40	3.73	4.23	2.81	3.11

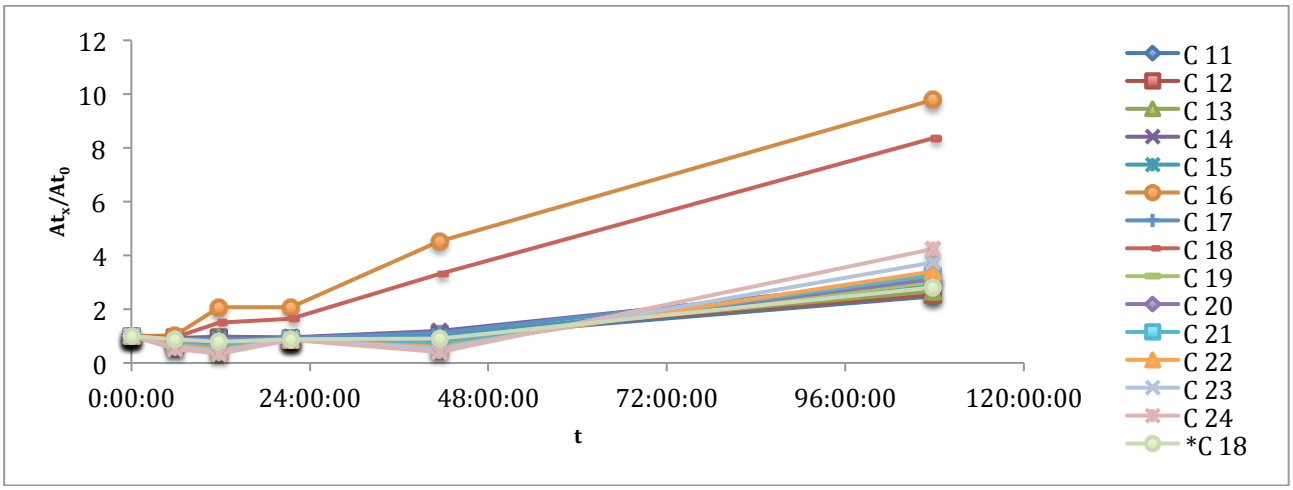

Figura 3.2 – Variazione nel tempo delle aree degli acidi alcanoici derivatizzati

Rispetto al tempo zero, corrispondente alla prima iniezione fatta immediatamente dopo la derivatizzazione, il segnale tende a diminuire leggermente per le prime quaranta ore, con valori che oscillano tra il 70 e il 90 % del valore iniziale, salvo poi aumentare di tre

volte dopo 107 ore (circa 4 giorni e mezzo) dalla derivatizzazione. Fanno eccezione l'acido stearico e l'acido palmitico (esclusi dalla media), il cui segnale rimane stabile per le prime sei ore, per poi aumentare fino a 8 e 10 volte rispettivamente il valore iniziale.

Nel grafico seguente invece viene riportato il fattore di risposta per gli acidi n-alcanoici nel tempo.

Tabella 3.2 – Variazione nel tempo del fr degli acidi alcanoici derivatizzati

hh:mm:ss	C_{11}	C_{12}	C_{13}	C_{14}	C_{15}	C_{16}	C_{17}	C_{18}	C_{19}	C_{20}	C_{21}	C_{22}	C_{23}	C_{24}
0:00:00	1.12	1.45	0.97	0.96	1.28	1.35	1.17	1.30	1.07	1.10	0.82	0.83	0.63	0.56
5:54:00	1.20	1.52	1.01	1.00	1.30	1.58	1.18	1.41	1.01	0.98	0.68	0.62	0.43	0.34
10:50:00	1.28	1.71	1.14	1.18	1.44	3.55	1.29	2.50	1.00	0.94	0.62	0.53	0.35	0.24
20:27:00	1.10	1.48	0.99	1.04	1.29	3.14	1.23	2.40	1.06	1.09	0.82	0.80	0.62	0.54
40:27:00	1.20	1.68	1.11	1.28	1.46	6.79	1.46	4.79	1.01	0.96	0.65	0.55	0.37	0.25
106:48:00	0.99	1.31	0.92	1.06	1.31	4.70	1.32	3.87	1.14	1.22	0.96	1.00	0.84	0.84

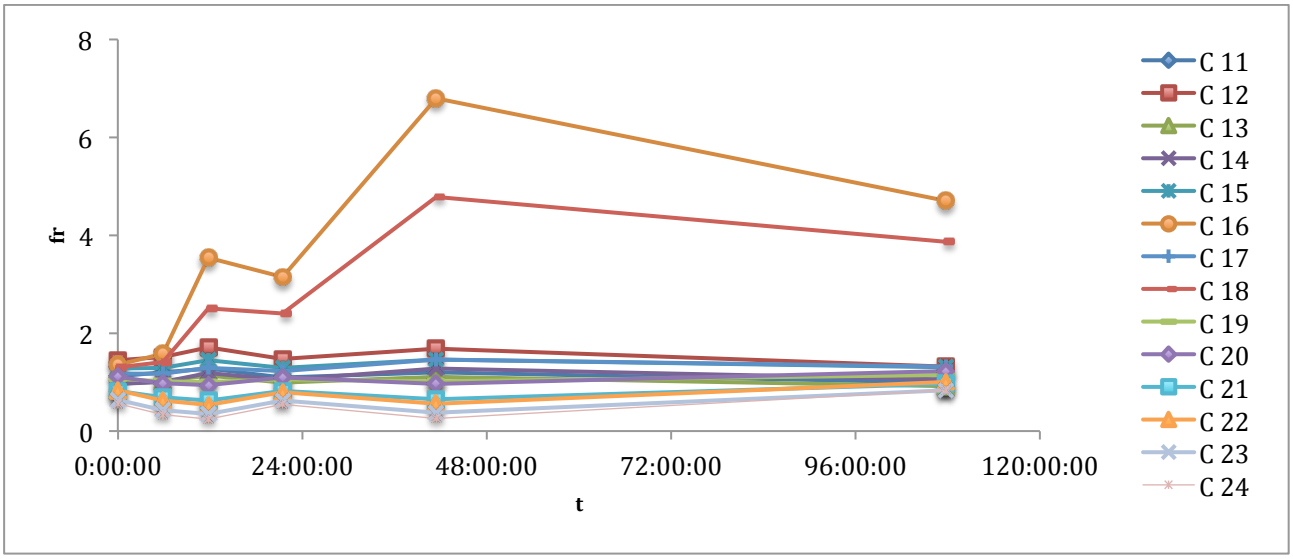

Figura 3.3 - Variazione nel tempo del fr degli acidi alcanoici derivatizzati

Essendo composti nativi e standard marcato circa alla stessa concentrazione (vedi appendice), il rapporto tra le aree dovrebbe essere il più possibile costante nel tempo e vicino a 1. Ciò accade per tutti i composti (i cui fattori di risposta variano da un minimo 0.24 a un massimo di 1.71) ad eccezione di acido stearico e palmitico, che presentano rapporti estremamente variabili nel tempo.

In base alle osservazioni fatte sull'andamento della reazione di derivatizzazione, in relazione al fatto che per la maggior parte degli acidi alcanoici non si osserva un

aumento significativo del segnale nel tempo se non dopo 4 giorni e che invece per l'acido palmitico e l'acido stearico il forte aumento del segnale è accompagnato da un forte e scostante aumento del fattore di risposta, si è ritenuto opportuno analizzare i campioni derivatizzati nelle sei ore successive alla derivatizzazione, arco di tempo in cui i segnali e i fattori di risposta presentano maggiore stabilità.

3.1.3 Metodo gascromatografico

I metodi cromatografici utilizzati per l'analisi di IPA [82] e steroidi [21] fanno riferimento ai metodi già in adozione presso il gruppo di ricerca e sono riportati in appendice. I metodi per l'analisi di n-alcani e acidi n-alcanoici invece sono stati sviluppati in questo lavoro di tesi e la loro messa a punto è riportata di seguito.

n-alcani

Allo scopo di separare cromatograficamente gli n-alcani compresi tra C_{10} e C_{36}, è stata analizzata una soluzione stadard contenente tutti gli analiti e l'esatriacontano a 1 ng μL^{-1} in iso-ottano.

Gli n-alcani presentano tutti lo stesso *pattern* di frammentazione, di seguito viene riportato lo spettro di massa ottenuto in modalità *full scan* del C_{16} come esempio:

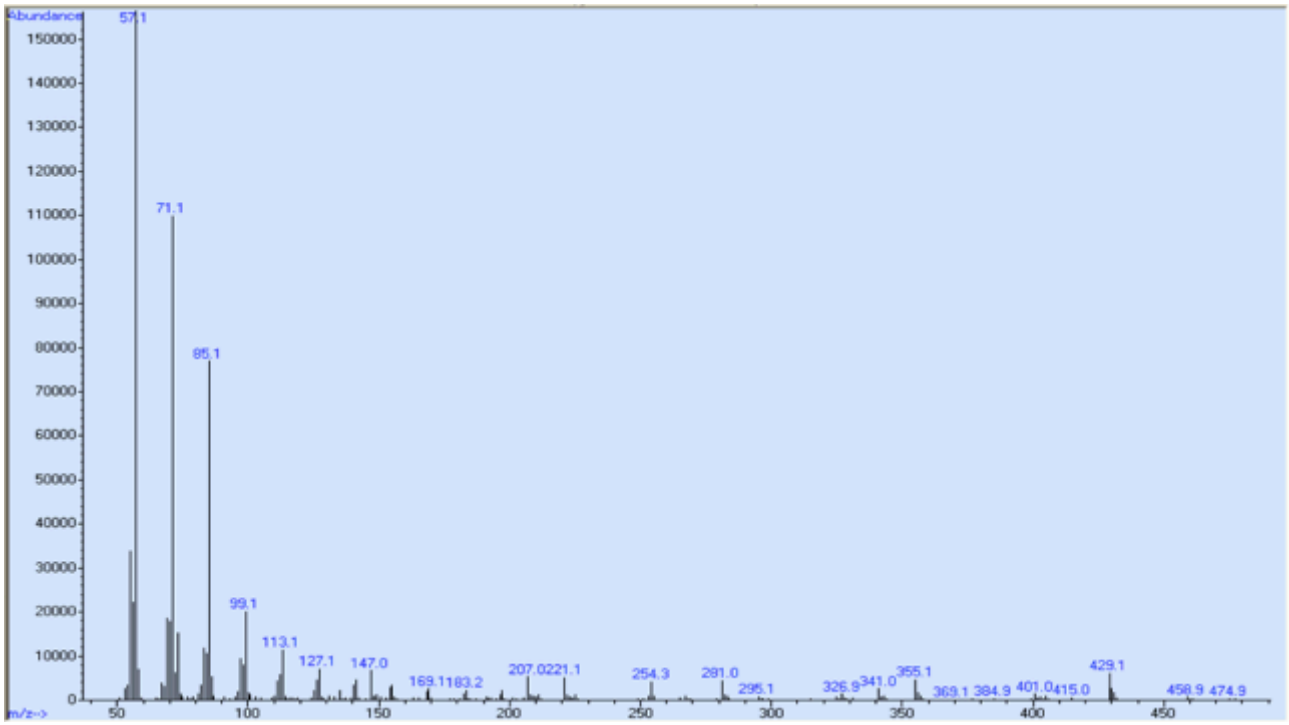

Figura 3.4 – Spettro di massa C_{16}

Il rapporto massa/carica che restituisce il segnale più abbondante è m/z 57, corrispondente al frammento $(C_4H_9)^+$, seguono m/z 71 corrispondente a $(C_5H_{11})^+$, m/z 85 corrispondente a $(C_6H_{13})^+$, m/z 99 corrispondente a $(C_7H_{15})^+$, m/z 113 corrispondente a $(C_8H_{17})^+$ e m/z 127 corrispondente a $(C_9H_{19})^+$.
Tutti questi ioni sono stati selezionati per la modalità SIM (*selected ion monitoring*) dello spettrometro di massa, che consente di ottenere la minor distanza temporale possibile tra le misure degli ioni selezionati e quindi un maggior numero di punti che compongono il cromatogramma TIC (*total ion current*), migliorando accuratezza e precisione dell'analisi quantitativa.

Basandosi sulle corse cromatografiche riportate in letteratura [4, 13, 85–88, 92, 94–98] sono state testate diverse rampe di temperatura, tutte in grado di separare efficacemente gli n-alcani, che hanno tempi di ritenzione crescenti in maniera regolare in base al loro peso molecolare. La rampa migliore, che consente di ottenere un'alta risoluzione nel minor tempo possibile, prevede una statica iniziale a 50 °C per 5 minuti, seguita da una rampa a 18 °C min^{-1}fino a 315 °C, che vengono mantenuti per 20 minuti.

Di seguito viene riportato un cromatogramma ottenuto in modalità SIM con la rampa descritta.

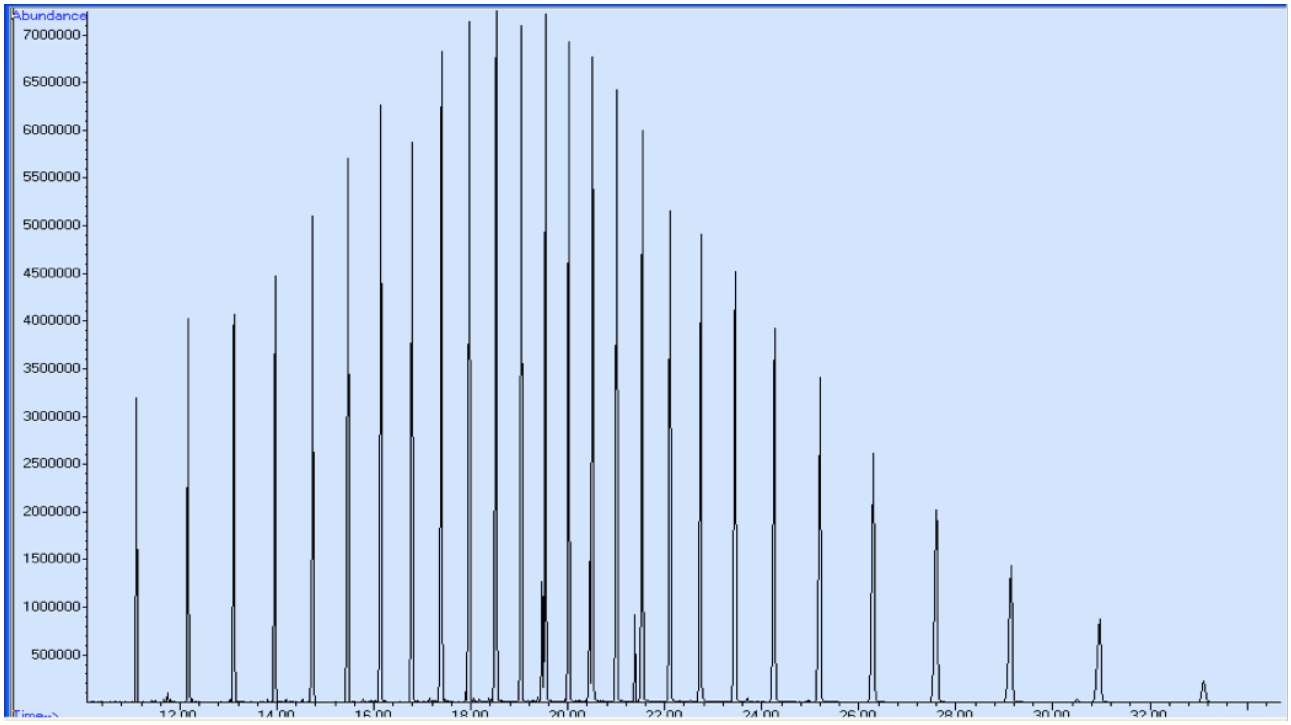

Figura 3.5 – Cromatogramma TIC n-alcani C_{10}– C_{36}

Il primo picco a 11.1 min è quello dell'alcano C_{10}, l'ultimo a 33.1 min è quello dello standard interno C_{36}. Si può notare come gli ultimi picchi tendano ad essere più larghi e meno intensi dei primi, il fenomeno è dovuto probabilmente al maggior tempo di ritenzione in colonna di questi analiti, che tende ad aumentare la loro dispersione longitudinale. Considerato che i picchi risultano ben distanziati tra loro e non si hanno problemi di risoluzione, per diminuire la loro dispersione longitudinale ed aumentarne l'intensità si potrebbe prevedere una rampa che aumenti la temperatura alla fine della corsa. La colonna cromatografica utilizzata però ha una temperatura massima di utilizzo di 325 °C, pertanto la statica finale di 20 minuti a 315 °C è la soluzione migliore che si è potuto adottare.
Lo standard interno, essendo l'alcano più pesante, è quello più soggetto a dispersione longitudinale. L'esatiacontano è stato ritenuto il miglior standard interno a disposizione e nonostante dia un'intensità di segnale sensibilmente diversa dagli altri alcani i livelli di precisione e accuratezza delle misure si sono rivelati soddisfacenti.

Eseguendo analisi ripetute su una stessa *vial* da autocampionatore contenente un fattore di risposta a 100 pg μL^{-1} si sono notate forti interferenze costituite da un picco a 18.3 min, uno a 19.2 min e una serie di picchi compresi tra 20.5 min e 22.0 min, che tendevano ad aumentare di intensità in iniezioni successive fino a superare di molto l'intensità dei picchi degli analiti (fig. 3.6).

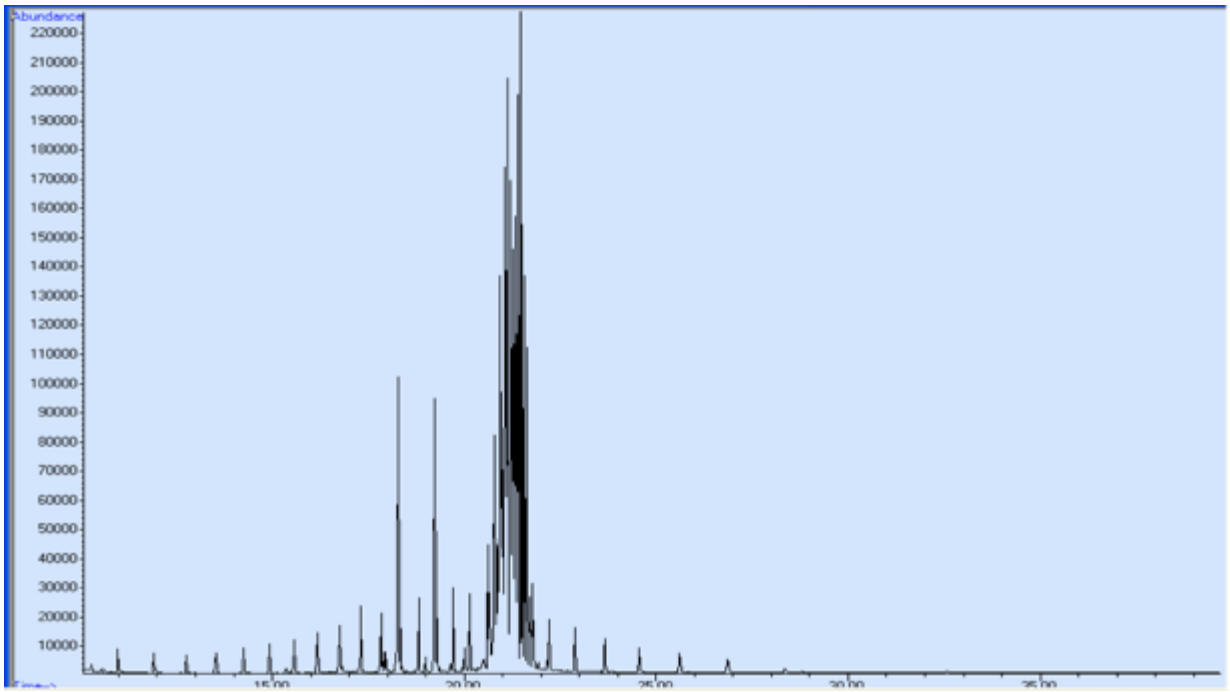

Figura 3.6 – Cromatogramma TIC n-alcani con interferenza

Analizzando lo stesso fattore di risposta conservato in *vial* con tappo a vite e iniettato manualmente, si è notato che queste interferenze non erano presenti.

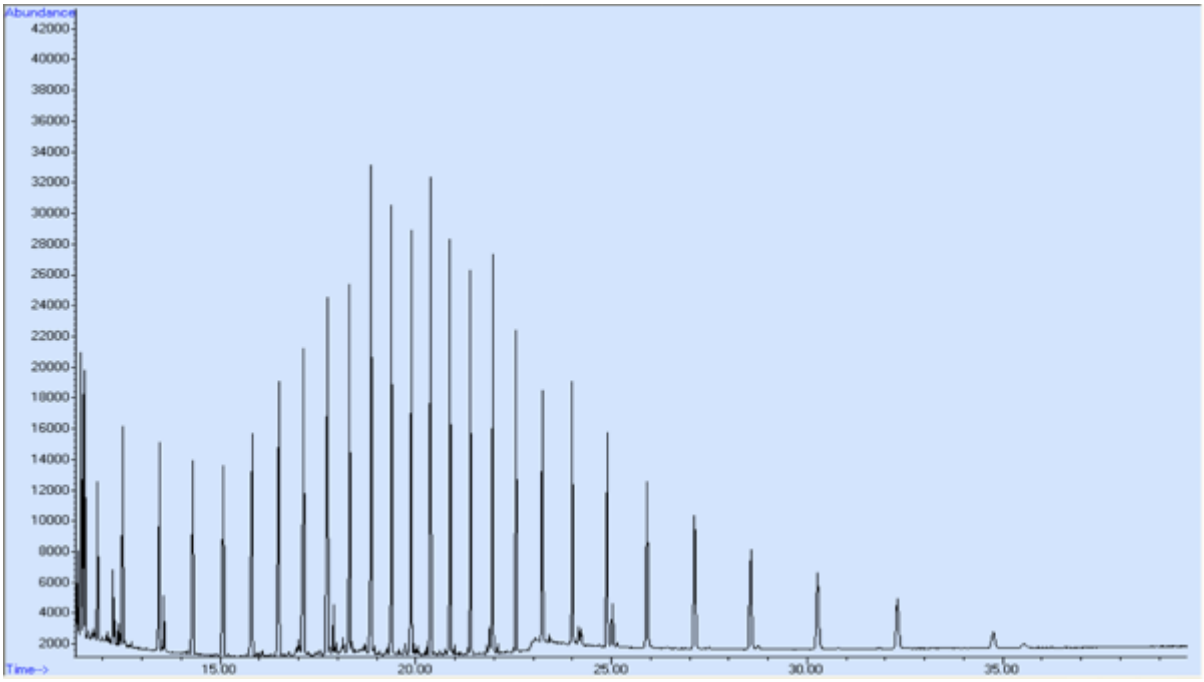

Figura 3.7 - Cromatogramma TIC n-alcani non interferito

I picchi interferenti, identificati come ftalati dalla ricerca nella libreria NIST, sono stati attribuiti al rilascio di sostanze plastificanti contenute nel materiale di cui sono fatti i tappi (*VITON*®), nonostante siano garantiti anche per l'analisi di idrocarburi.

Esaminando i singoli ioni misurati in modalità SIM nel cromatogramma riportato in fig. 3.7, si è visto che lo ione $(C_7H_{15})^+$ (m/z=99) e lo ione $(C_8H_{17})^+$ (m/z=113) sono significativamente meno interferiti degli altri, anche se presentano un'intensità di segnale molto più bassa.

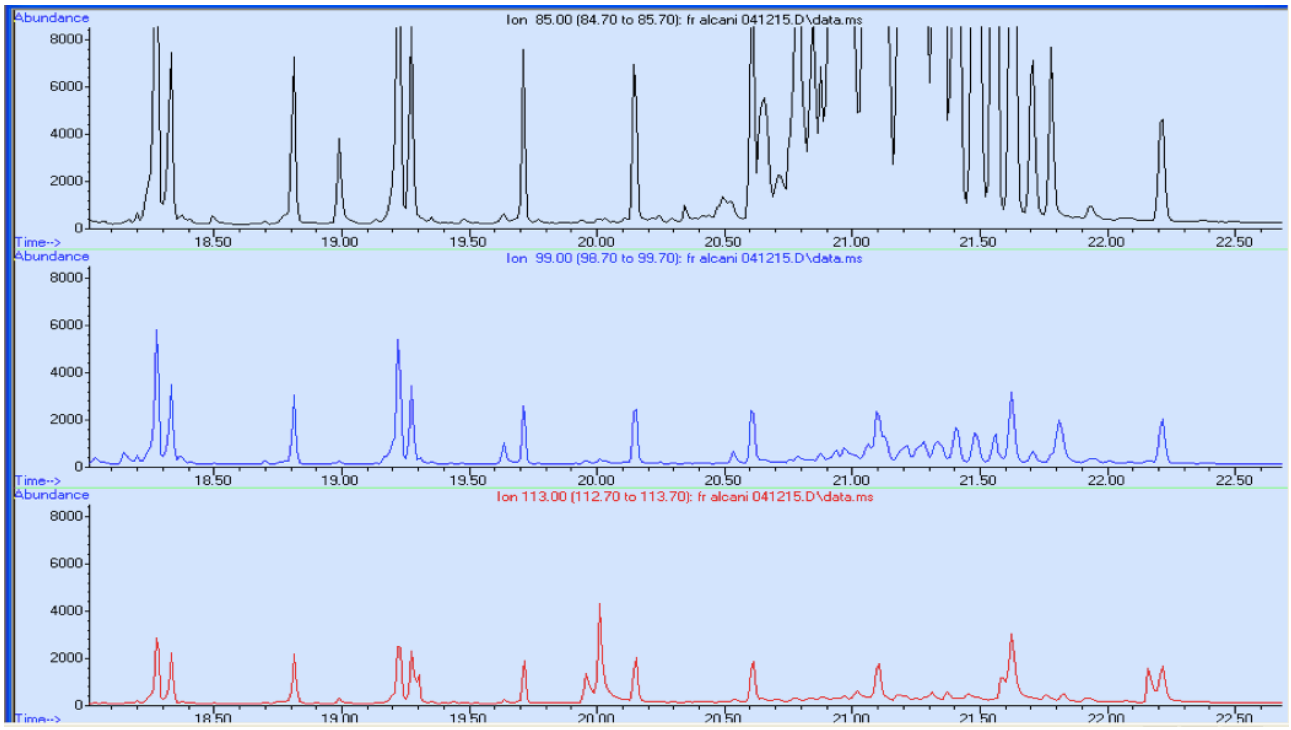

Figura 3.8 - Ioni singoli del cromatogramma TIC di fig 28

Si è quindi deciso di utilizzare solo questi due ioni per integrare i cromatogrammi, mantenendo anche lo ione $(C_6H_{13})^+$ (m/z=85) tra gli ioni misurati in SIM.

Acidi n-alcanoici

Allo scopo di determinare i tempi di ritenzione e identificare gli ioni caratteristici degli acidi n-alcanoici compresi tra C_{10} e C_{24} sono state analizzate le soluzioni standard a 5 ng μL^{-1}in toluene di ogni singolo composto, seguendo la procedura di derivatizzazione descritta nel capitolo 4.2.

La determinazione degli ioni è stata effettuata con lo spettrometro di massa in modalità *full scan* per visualizzare tutti gli ioni derivanti dalla frammentazione dei composti. Di seguito viene riportato lo spettro di massa dell'acido alcanoico C_{17} come esempio.

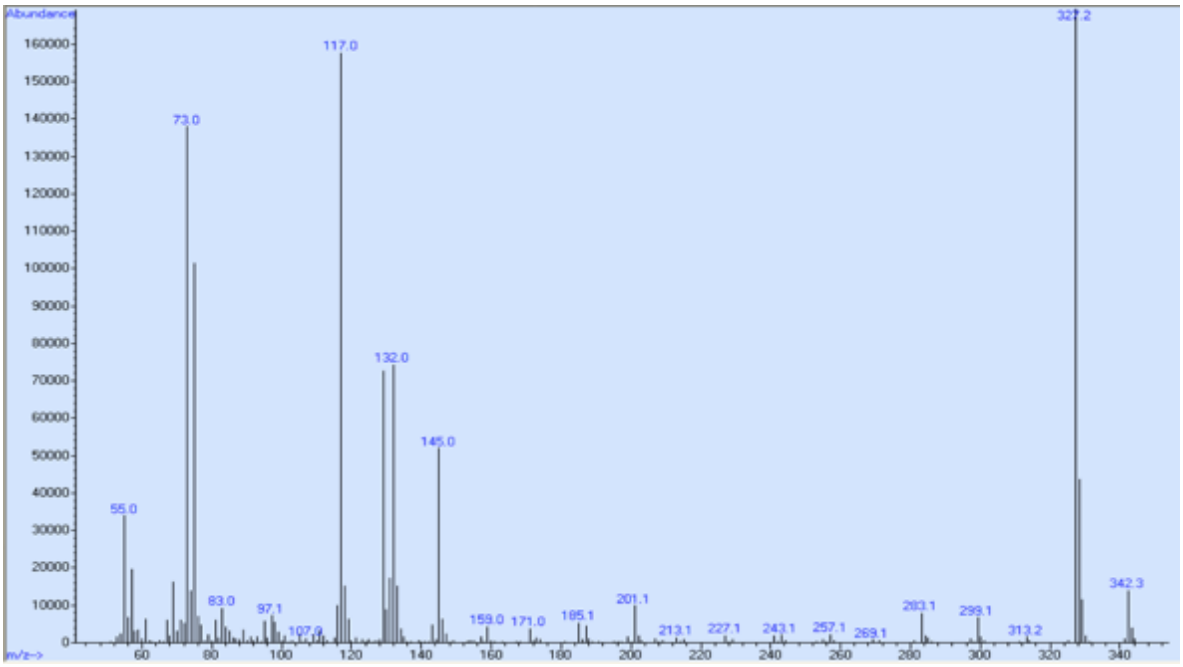

Figura 3.9 - Spettro di massa dell'acido n-alcanoico C_{17}

Dall'analisi di tutti i composti si è visto che ogni analita presenta un picco caratteristico dovuto alla perdita di un gruppo $-CH_3$ dal TMS.

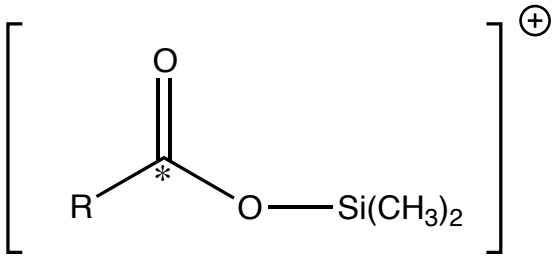

Figura 3.10 - Ione caratteristico degli acidi n-alcanoici

^{13}C per acido palmitico marcato, ^{12}C per tutti gli altri composti

Tabella 3.3 - Rapporto m/z degli ioni caratteristici degli acidi in esame

	m/z	R =
C_{11}	243.2	$-(CH_2)_9CH_3$
C_{12}	257.1	$-(CH_2)_{10}CH_3$
C_{13}	271.1	$-(CH_2)_{11}CH_3$
C_{14}	285.1	$-(CH_2)_{12}CH_3$
C_{15}	299.1	$-(CH_2)_{13}CH_3$
C_{16}	313.3	$-(CH_2)_{14}CH_3$
C_{17}	327.2	$-(CH_2)_{15}CH_3$
C_{18}	341.3	$-(CH_2)_{16}CH_3$
C_{19}	355.3	$-(CH_2)_{17}CH_3$
C_{20}	369.3	$-(CH_2)_{18}CH_3$
C_{21}	383.3	$-(CH_2)_{19}CH_3$
C_{22}	397.3	$-(CH_2)_{20}CH_3$
C_{23}	411.3	$-(CH_2)_{21}CH_3$
C_{24}	425.4	$-(CH_2)_{22}CH_3$
$^{13}C_{18}$	359.4	$-(^{13}CH_2)_{16}{}^{13}CH_3$

Uno ione caratteristico di tutti i composti invece si ha a m/z 117 ed è dovuto alla perdita della catena idrocarburica.

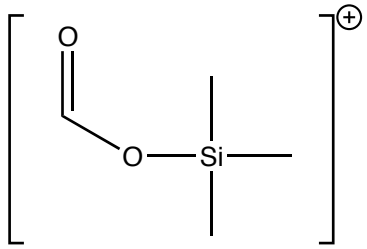

Figura 3.11 - Ione comune a tutti gli acidi analizzati

Lo ione a m/z 73 si ha invece in seguito alla perdita della catena idrocarburica e di tutti i gruppi metilici legati al silicio $(CHO_2Si)^+$.

Per l'analisi quantitativa dei composti lo spettrometro di massa è stato utilizzato in modalità SIM (*selected ion monitoring*), che consente di ottenere la minor distanza temporale possibile tra le misure degli ioni selezionati e quindi un maggior numero di punti che compongono il cromatogramma TIC (*total ion current*). Basandosi sulle corse cromatografiche trovate in letteratura [96, 97, 99, 100, 104] sono state provate diverse rampe di temperatura, tutte in grado di separare efficacemente gli acidi alcanoici, che hanno tempi di ritenzione crescenti in maniera regolare in base al loro peso molecolare. La rampa migliore, che consente di ottenere un'alta risoluzione nel minor tempo possibile, prevede una statica iniziale di 3 minuti a 100 °C, una prima rampa da 10 °C min^{-1} fino a 180 °C, seguita immediatamente da una seconda rampa da 5 °C min^{-1} fino a 300 °C, che vengono mantenuti per 5 minuti, per una corsa lunga complessivamente 40 minuti.

Di seguito viene riportato un cromatogramma in SIM con la rampa descritta.

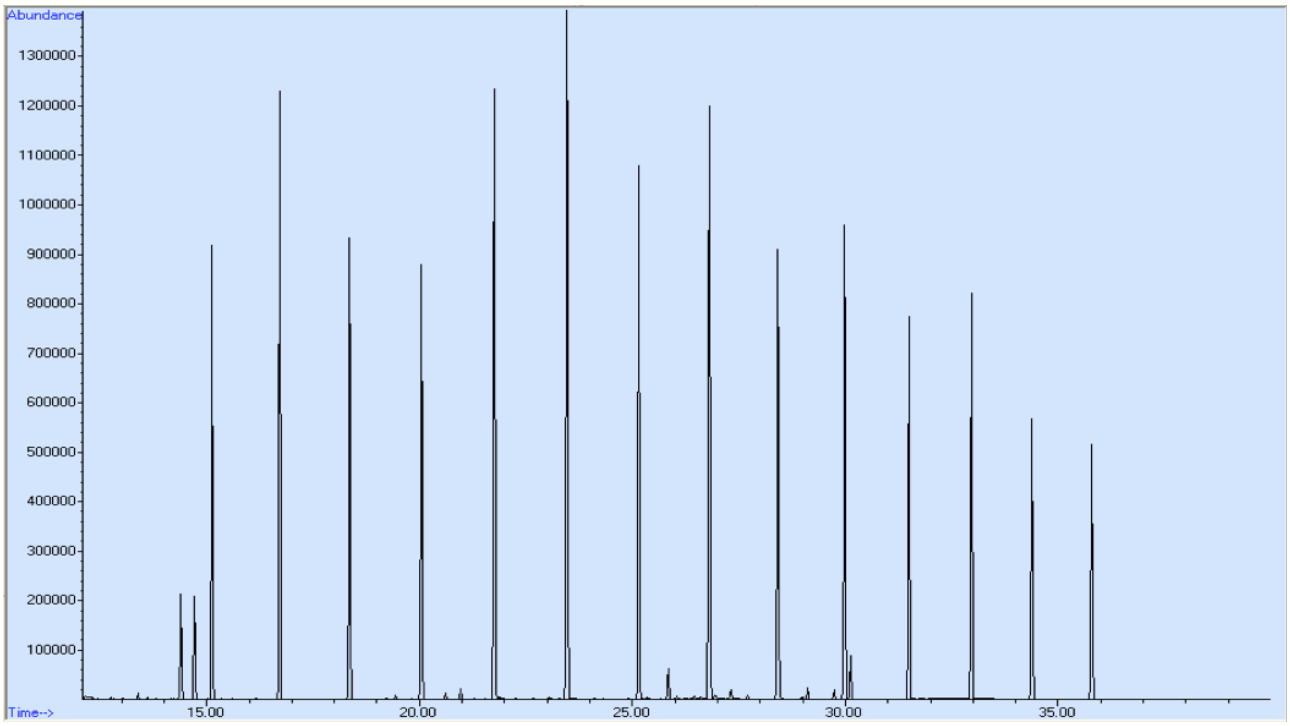

Figura 3.12 - Cromatogramma TIC degli acidi n-alcanoici

3.1.4 Purificazione

La fase di purificazione consente di separare gli analiti dagli eventuali interferenti che possono ostacolarne l'identificazione e la quantificazione. Nel caso specifico, durante la purificazione si opera anche una separazione tra le quattro classi di analiti, raccogliendo una prima frazione con alcani e IPA e una seconda con acidi n-alcanoici e steroli, che verranno poi trattate diversamente al fine di ottimizzarne l'analisi.

Per determinare la migliore metodologia di purificazione in termini di efficienza, riproducibilità e costi, oltre che per stabilire il tipo e i volumi di solventi da impiegare, la metodica di purificazione è stata applicata a soluzioni di riferimento (vedi paragrafo 2.2.1)

Confronto tra diverse colonne e fasi stazionarie

Da ricerche bibliografiche è emerso che gli acidi n-alcanoici e in particolare l'acido palmitico (C_{16}) e l'acido stearico (C_{18}), prodotti dal metabolismo degli acidi grassi negli esseri viventi, sono contaminanti ubiquitari presenti in grosse quantità anche nel materiale da laboratorio. Russel et al. [104] hanno trattato in modo specifico il problema

delle contaminazioni dovute a questi due composti durante la purificazione degli acidi grassi, confrontando le quantità di contaminanti in diverse cartucce SPE con aminopropile, come riportato in tabella.

Tabella 3.4 – Confronto tra le quantità di C_{16} e C_{18} in alcuni tipi di colonne [104]

	C_{16} (ng)	C_{18} (ng)
HDPE ditta A	1016	2585
HDPE ditta B	225	354
HDPE con frit in teflon	1898	4262
FP-HDPE ditta C	23	39
FP-HDPE ditta D	26	32
colonna di vetro con aminopropile impaccato	8	12

In relazione a questi dati si è deciso di sperimentare l'utilizzo di diverse colonne cromatografiche al fine di determinare quale fosse la migliore per ridurre i problemi di contaminazione, oltre a garantire una buona separazione degli analiti dagli interferenti.

Le colonne in aminopropile non sono state utilizzate nonostante vengano impiegate spesso nell'analisi degli acidi n-alcanoici perché non consentono di frazionare gli altri analiti presi in esame. Nelle metodologie in cui si utilizza questo tipo di fase stazionaria è necessario infatti operare una seconda cromatografia con un'altra fase stazionaria per purificare gli altri analiti [96, 102]. Questo procedimento avrebbe impedito di raccogliere acidi n-alcanoici e steroli in un'unica frazione, avrebbe allungato notevolmente i tempi richiesti per ogni analisi e avrebbe comportato l'utilizzo di maggiori quantità di solventi e consumabili.
Inoltre, per eluire gli acidi n-alcanoici adsorbiti sull'aminopropile viene generalmente utilizzato acido acetico in etere [96, 102] che, avendo un protone acido, può causare problemi in fase di derivatizzazione con BSTFA, oltre ad essere difficilmente compatibile con la gascromatografia. L'utilizzo dell'acido acetico implicherebbe quindi un diverso tipo di derivatizzazione (incompatibile con gli steroli) o un cambio di solvente, realizzabile tramite evaporazione dello stesso, ma considerata la sua alta tensione di vapore l'operazione comporterebbe un'eccessiva perdita di analiti.

Silice neutra - HDPE

Prendendo in considerazione le metodiche utilizzate in letteratura e quelle sviluppate per steroli e IPA all'interno del gruppo di ricerca, si è deciso di sperimentare innanzitutto l'utilizzo di cartucce SPE monouso di silice neutra con supporto in HDPE (Supelco Discovery® DSC-Si SPE Tube).

I bianchi effettuati sulle colonne non hanno rivelato particolari contaminazioni da parte di alcani, IPA e steroli (presenti solo in tracce) mentre, in accordo con i dati di Russel et al. [104], sono state riscontrate significative quantità di acido palmitico (C_{16}) e acido stearico (C_{18}). Gli altri acidi n-alcanoici nel *range* preso in esame (C_{11}-C_{24}) non presentano invece contaminazioni particolarmente rilevanti.

Tabella 3.5 – Contenuto di acidi n-alcanoici

	ng in 2 g di silice
C_{11}	45
C_{12}	590
C_{13}	92
C_{14}	1041
C_{15}	774
C_{16}	2603
C_{17}	64
C_{18}	1150
C_{19}	nd
C_{20}	nd
C_{21}	nd
C_{22}	nd
C_{23}	nd
C_{24}	nd

L'eluzione della colonna è stata effettuata con 20 mL di miscela DCM:MeOH=9:1, seguiti da 40 mL di n-esano, 20 mL di miscela ESA:DCM=9:1 e due frazioni (30 e 10 mL) nuovamente di miscela DCM:MeOH. Si è notato che la quantità di acidi alcanoici nelle frazioni successive tende progressivamente a diminuire, ma non è nulla nell'ultima frazione, segno che il volume di solvente utilizzato (115 mL) non è sufficiente a rimuovere totalmente gli acidi n-alcanoici dalla colonna.

La purificazione degli analiti e la loro separazione in due frazioni (apolare e polare) è risultata invece molto efficace con questo tipo di colonna (vedi *confronto fra solventi)*.

Silice neutra - vetro

2 g di silice neutra (silica gel high purity grades fornita da *Sigma Aldrich*) sono stati impaccati a mano all'interno di una colonna in vetro precedentemente decontaminata. Anche in questo caso alcani, IPA e steroli sono stati rilevati solo in tracce, mentre la contaminazione da acido palmitico e acido stearico è risultata molto forte.

Tabella 3.6 - Contenuto di acidi n-alcanoici

	ng in 2 g di silice
C_{11}	43
C_{12}	202
C_{13}	35
C_{14}	231
C_{15}	0
C_{16}	2305
C_{17}	4
C_{18}	2074
C_{19}	5
C_{20}	17
C_{21}	1974
C_{22}	nd
C_{23}	6
C_{24}	10

L'eluizione della colonna è stata effettata con gli stessi volumi e gli stessi solventi della prova precedente.

Le quantità di acido palmitico e stearico risultano paragonabili a quelle riscontrate con la colonna in polietilene, ma comunque molto elevate. Anche in questo caso si è notato che la quantità di acidi n-alcanoici nelle frazioni successive tende progressivamente a diminuire, senza però essere nulla nell'ultima frazione. Il volume di solvente utilizzato non è in grado quindi di decontaminare completamente nemmeno questo tipo di colonna.

La capacità della colonna di purificare e separare gli analiti in due frazioni è paragonabile a quella delle colonne commerciali, che inoltre hanno il vantaggio di aumentare sicuramente la riproducibilità e la rapidità dell'analisi.

Forisil

I valori dei bianchi sono stati testati anche per le cartucce con 1 g di florisl impaccato in HDPE, riscontrando, anche in questo caso, notevoli quantità di acido palmitico e acido stearico.

Tabella 3.7 - Contenuto di acidi n-alcanoici

	ng in 1 g di florisil
C_{11}	20
C_{12}	103
C_{13}	16
C_{14}	239
C_{15}	nd
C_{16}	2633
C_{17}	65
C_{18}	2456
C_{19}	7
C_{20}	23
C_{21}	90
C_{22}	nd
C_{23}	12
C_{24}	41

La colonna è stata eluita con 25 mL di miscela DCM:MeOH=1:1, seguiti da 20 mL di n-esano, 10 mL di miscela ESA:DCM=9:1 e due frazioni (15 e 5 mL) di miscela DCM:MeOH=9:1.

Nonostante il considerevole volume di solvente impiegato (75 mL per 1 g di fase stazionaria), la quantità di C_{16} e C_{18} non è diminuita nelle frazioni successive, come accade invece per gli altri acidi grassi, facendo pensare che la colonna contenesse ancora i due acidi in quantità significative.

In relazione alle quantità rilevate di acidi e al minor quantitativo di fase stazionaria, la colonna in florisil si è rivelata molto più contaminata rispetto a quelle in silice.

Oasis

La purificazione è stata sperimentata anche su cartucce Oasis HLB (WaterOasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm Particle Size, 30/pk), la cui fase stazionaria è costituita da un polimero a fase inversa.
La colonna è stata condizionata con 10 mL di diclorometano e 10 mL di esano, analizzando i solventi in uscita dalla colonna per verificare la presenza di contaminanti. Dopo il condizionamento sono stati posti sulla colonna 50 µL di miscele di n-alcani, IPA e acidi alcanoici nativi rispettivamente a 50, 1 e 50 ng μL^{-1} e 100 µL di miscela di steroli nativi a 10 ng μL^{-1}. È stata eluita una prima frazione con 20 mL di miscela ESA:DCM=9:1 e una seconda con 30 mL di diclorometano, le due frazioni sono state raccolte e ad entrambe sono stati aggiunti 20 µL di esatriacontano a 100 ng μL^{-1}, miscela di IPA marcati a 1 ng μL^{-1}, acido stearico ^{13}C a 50 ng μL^{-1} e colesterolo ^{13}C a 50 ng μL^{-1}. Il volume delle frazioni è stato ridotto fino a circa 200 µL tramite *TurbovapII*® ed entrambe le frazioni sono state divise in due. Una parte è stata posta in una *vial* da autocampionatore ed è stata addizionata a 100 µL di iso-ottano, per l'analisi di alcani e IPA, l'altra parte è stata derivatizzata con 100 µL di BSTFA a 70°C per 1 h, per poi essere a sua volta trasferita in una *vial* da autocampionatore e analizzata.

L'analisi dei solventi di condizionamento ha rivelato la presenza di 735 ng e 393 ng di acido palmitico e acido stearico rispettivamente, mentre gli altri analiti sono stati riscontrati solo in tracce o quantità non rilevabili.

L'analisi delle frazioni eluite invece ha dato i risultati riportati in tabella:

Tabella 3.8 – Frazionamento in colonna Oasis

% di analiti nelle frazioni		
	frazione 1	frazione 2
n-alcani	100	0
IPA	100	0
acidi alcanoici	57	43
steroli e stanoli	99	1

Ad eccezione degli acidi n-alcanoici, che si distribuiscono tra la prima e la seconda frazione, gli altri analiti vengono eluiti completamente con la prima aliquota di solvente, segno che questo tipo di fase stazionaria non è in grado di operare una separazione tra le varie classi.

Scelta della colonna e della fase stazionaria

La colonna OASIS è quella che si è rivelata meno contaminata tra quelle provate ma non essendo in grado di eluire selettivamente le classi di analiti non può essere utilizzata in questa metodica.

Le quantità di acidi n-alcanoici presenti nel florisil sono risultate significativamente maggiori rispetto a quelle presenti nella silice e il suo utilizzo è stato escluso.

La fase stazionaria migliore per quel che riguarda la purificazione e la separazione degli analiti tra quelle provate è la silice neutra.
Sia la silice in SPE monouso che quella impaccata in vetro sono risultate contaminate da acido palmitico e acido stearico; condizionando la colonna tali contaminazioni possono essere ridotte, ma elevati volumi di solvente comporterebbero un aumento eccessivo del costo delle analisi in relazione all'utilità del dato finale di questa classe di analiti. Il miglior compromesso tra decontaminazione e volume di solvente è stato ritenuto essere il condizionamento con due aliquote da 40 mL, la prima di diclorometano e la seconda di n-esano, comunque cautelativo poiché superiore al volume consigliato dal produttore.
Infine, le colonne di silice in HDPE sono state preferite a quelle in vetro impaccato a mano. I livelli di acidi n-alcanoici sono risultati paragonabili con i due diversi supporti e l'utilizzo di colonne impaccate a mano ridurrebbe notevolmente la riproducibilità della metodica rispetto all'utilizzo di colonne usa e getta.

Per queste ragioni, in considerazione delle prove effettuate, le colonne di silice neutra in HDPE sono risultate le migliori per questa metodica, nonostante la notevole contaminazione da acido palmitico e acido stearico riscontrata.

Determinazione dei solventi e dei loro volumi

Poiché la fase stazionaria selezionata è la silice neutra di seguito si descrive la messa a punto della procedura di frazionamento del campione e la selezione dei solventi e dei volumi ottimali per l'eluizione degli analiti su questa fase stazionaria.

L'obiettivo della purificazione, oltre a separare gli analiti dagli interferenti, è stato anche quello di separarli tra loro in due frazioni.

- *Frazione apolare*: eluita per prima, contiene le due classi di analiti meno polari, cioè gli n-alcani e gli IPA. Questa frazione, dopo essere stata concentrata fino a circa 100 μL, verrà analizzata talquale tramite GC-MS.
- *Frazione polare*: eluita per seconda, contiene le due classi di analiti più polari, cioè gli acidi alcanoici e gli steroli. Questa frazione, dopo essere stata concentrata fino a 100 μL, verrà derivatizzata con BSTFA prima di essere analizzata tramite GC-MS.

Frazione apolare

La prima prova è stata effettuata aggiungendo 100 μL della miscela di alcani C_{10}-C_{35}a 50 ng μL^{-1}in testa ad una colonna precedentemente condizionata con 40 mL di n-esano. Sono state raccolte 6 frazioni da 5 mL di n-esano ciascuna, ad ogni frazione sono stati aggiunti 20 μL di esatriacontano a 100 ng μL^{-1} come standard interno e il loro volume è stato ridotto tramite *TurbovapII*® fino a 100 μL. Le soluzioni sono state trasferite all'interno di *vial* da autocampionatore e sono stati aggiunti 100 μL di iso-ottano.

In tab. 3.9 sono riportate le percentuali dei singoli n-alcani rispetto al totale del loro segnale in tutte le frazioni raccolte.

Tabella 3.9 – Frazionamento n-alcani

	% n-alcani nelle frazioni					
n-alcano	frazione 1	frazione 2	frazione 3	frazione 4	frazione 5	frazione 6
C_{10}	84	9	1	2	2	2
C_{11}	88	11	1	0	0	0
C_{12}	88	11	1	0	0	0
C_{13}	88	11	1	0	0	0
C_{14}	88	11	1	0	0	0
C_{15}	88	11	1	0	0	0
C_{16}	89	10	1	0	0	0
C_{17}	88	10	1	0	0	0
C_{18}	89	10	1	0	0	0
C_{19}	89	10	1	0	0	0
C_{20}	89	9	1	0	0	0
C_{21}	89	9	1	0	0	0
C_{22}	90	9	1	0	0	0
C_{23}	90	9	1	0	0	0
C_{24}	90	9	1	0	0	0
C_{25}	90	9	1	0	0	0
C_{26}	89	9	1	0	0	0
C_{27}	89	9	1	0	0	0
C_{28}	89	10	1	0	0	0
C_{29}	89	10	1	0	0	0
C_{30}	89	10	1	0	0	0
C_{31}	89	10	1	0	0	0
C_{32}	89	10	1	0	0	0
C_{33}	89	10	1	0	0	0
C_{34}	89	10	1	0	0	0
C_{35}	88	11	1	0	0	0
C_{10}-C_{35}	89	10	1	0	0	0

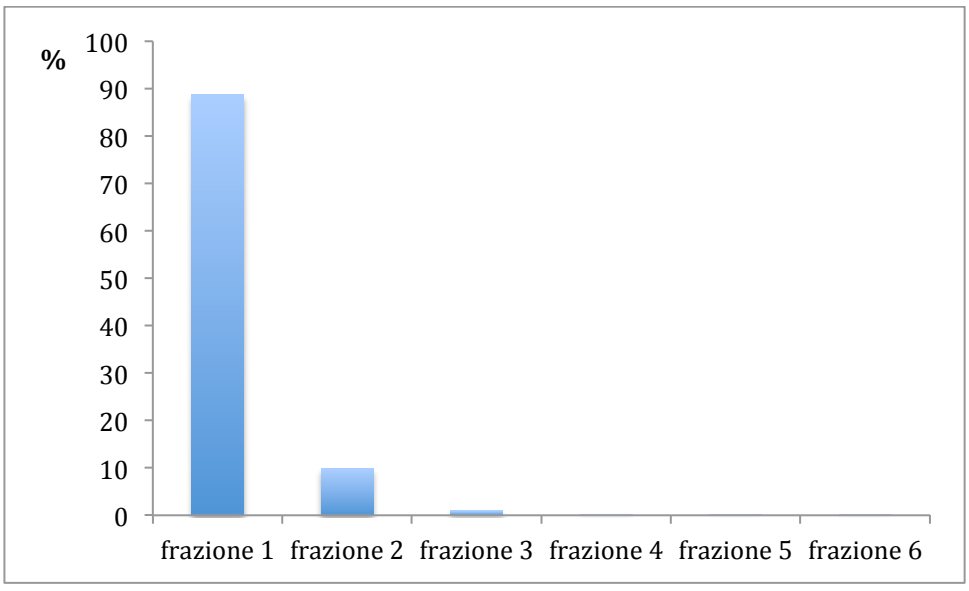

Figura 3.13 – Frazionamento n-alcani

Dalla tab. 3.9 si deduce che tutti gli alcani si distribuiscono allo stesso modo nelle frazioni, eluendo per il 90 % con i primi 5 mL di esano. Il miglior compromesso tra recupero quantitativo degli analiti e minor quantità di solvente utilizzato è stato ritenuto essere l'utilizzo di 15 mL di esano, che contengono il 100 % degli alcani eluiti.

La seconda prova è stata effettuata aggiungendo 50 μL di miscela di IPA nativi a 1 ng μL^{-1} in testa a una colonna precedentemente condizionata con 40 mL di esano. Sono state raccolte tre frazioni, la prima con 15 mL di esano (necessari per eluire gli n-alcani), la seconda con 5 mL di una miscela ESA:DCM=1:1 e la terza con 15 mL di diclorometano. Alle frazioni sono stati aggiunti 20 μL di miscela di IPA marcati a 1 ng μL^{-1} e sono state trattate come nella prova precedente per l'analisi al GC.

In tab. 3.10 sono riportate le percentuali dei singoli IPA rispetto al totale del loro segnale in tutte le frazioni raccolte.

Tabella 3.10 - Frazionamento IPA

	% IPA nelle frazioni		
	frazione 1	frazione 2	frazione 3
Naftalene	86	13	1
Acenaftilene	87	13	0
Acenaftene	89	11	0
Fluorene	88	12	0
Fenantrene	85	15	0
Antracene	86	14	0
Fluorantene	70	30	0
Pirene	78	22	0
Retene	90	10	0
Benzo(a)Antracene	16	84	0
Crisene	14	86	0
Benzo(b)Fluorantene	6	94	0
Benzo(k)Fluorantene	0	100	0
Benzo(a)Pirene	9	91	0
Benzo(ghi)Perilene	0	100	0
Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	0	100	0
Dibenzo(A,H)Antracene	0	100	0
totale IPA	47	53	0

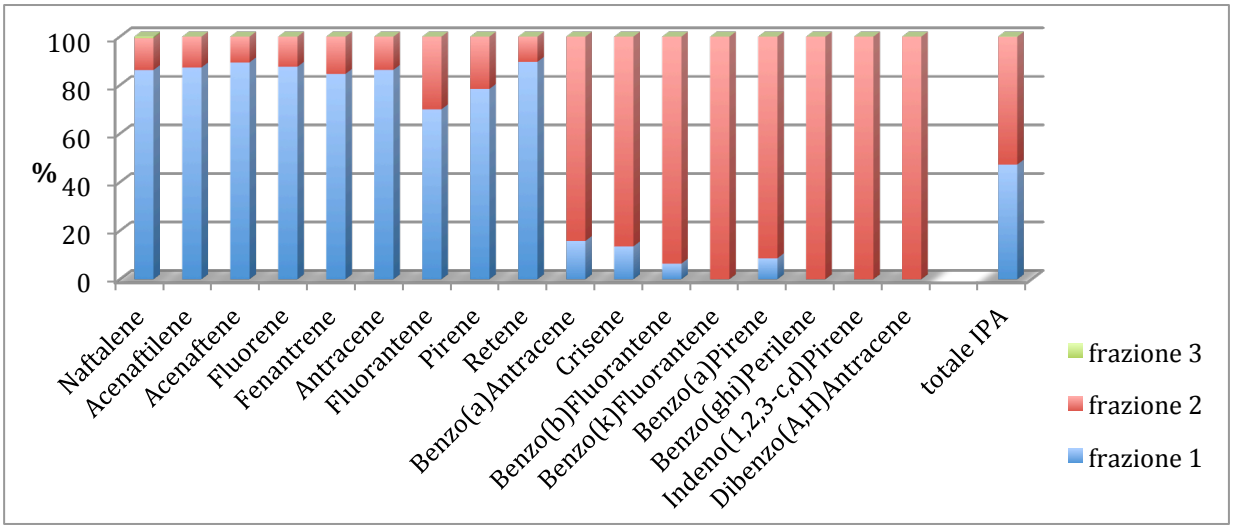

Figura 3.14 - Frazionamento IPA

Dalla tabella si deduce che gli IPA tendono a ripartirsi più o meno a metà tra la prima frazione di n-esano e la seconda frazione della miscela ESA:DCM. Come verificato da Piazza et al. [82], è richiesto un considerevole volume di n-esano per eluire gli IPA, mentre aumentando la polarità dell'eluente con del diclorometano si può velocizzare notevolmente l'uscita dalla colonna degli analiti.

Dai dati ottenuti si evince che 15 mL di esano, seguiti da 5 mL di ESA:DCM= 1:1 sono sufficienti ad eluire gli IPA in maniera quantitativa dalla colonna.
Per questioni di praticità del metodo si è ritenuto opportuno riunire le due frazioni di esano e miscela ESA:DCM = 1:1 in un'unica frazione da 20 mL dimiscela ESA:DCM = 9:1.
La bontà di questa operazione è stata verificata in una terza prova in cui sono stati posti 50 μL di miscele di n-alcani e IPA nativi rispettivamente a 50 e 1 ng μL^{-1} sopra una colonna precedentemente condizionata con 40 mL di esano. Sono state raccolte due frazioni, la prima di 20 mL di miscela ESA:DCM = 9:1 e la seconda di 30 mL di miscela di diclorometano : metanolo = 9:1. Ad entrambe sono stati aggiunti 20 μL di esatriacontano a 100 ng μL^{-1} e 20 μL miscela di IPA marcati a 1 ng μL^{-1} e il loro volume è stato ridotto fino a circa 100 μL tramite *TurbovapII*®. Le soluzioni, infine, sono state trasferite all'interno di *vial* da autocampionatore e sono stati aggiunti 100 μL di iso-ottano.

In tab. 3.11 sono riportate le percentuali degli alcani e degli IPA rispetto al totale del loro segnale in tutte le frazioni raccolte.

Tabella 3.11 - Eluizione analiti apolari

	frazione 1	frazione 2
C_{10} - C_{35}	93	7
tot IPA	99	1

Dai dati riportati in tabella si vede come, con 20 mL di miscela ESA:DCM = 9:1 si raccolgono il 99 % degli IPA eluiti, riunendo efficacemente le frazioni 1 e 2 della seconda prova di eluizione. Il recupero degli alcani è leggermente inferiore rispetto a quello che si aveva utilizzando solo n-esano, ma è comunque del 93 % e può essere considerato soddisfacente nell'ottica di una metodica multianalita.

Frazione polare

Osservando le metodiche di letteratura si è visto che gli steroli vengono in genere eluiti con diclorometano [21] e gli acidi alcanoici con metanolo [97, 103] o miscele diclorometano-metanolo [86].

Le prime prove di eluizione sono pertanto state effettuate utilizzando una miscela diclorometano:metanolo = 9:1, seguendo metodiche analoghe a quelle descritte nel capitolo precedente e derivatizzando i campioni con BSTFA a 70 °C per 1 h. Si è visto che con 40 mL di miscela DCM:MeOH 9:1 (preceduti dalla frazione apolare precedentemente determinata) venivano eluiti il 52% degli acidi posti in colonna. Oltre allo scarso recupero si è anche notato che durante l'evaporazione del solvente i campioni tendevano a dare separazione di fase e la riduzione del volume fino ai 100 μL desiderati era resa difficoltosa dall'alta tensione di vapore del metanolo, implicando possibili perdite di analita per evaporazione. I problemi più consistenti sono stati riscontrati durante la derivatizzazione con BSTFA: in diverse prove non si è stati in grado di identificare né i picchi degli acidi n-alcanoici nativi derivatizzati, né quelli dello standard marcato aggiunto prima della riduzione del volume. La non ripetibilità della derivatizzazione è stata attribuita ad una possibile reazione del BSTFA con il protone alcolico del metanolo stesso che, essendo presente in quantità variabile a causa del processo di evaporazione difficilmente controllabile, ed essendo più reattivo del gruppo carbossilico secondo quanto riportato nelle specifiche del BSTFA, entrava in competizione con la sostituzione del protone acido da parte del gruppo TMS.

Le possibili alternative sono:

- Utilizzare la stessa procedura ed effettuare un cambio di solvente alla fine evaporando completamente il metanolo. In relazione alle problematiche riscontrate in fase di evaporazione e al rischio di perdere significative quantità di analiti, però, si è deciso di non applicare questa metodica.
- Utilizzare il metanolo e cambiare il processo di derivatizzazione. Da quanto riportato in letteratura [20, 90, 96, 97, 104] una valida alternativa alla derivatizzazione con BSTFA è la metilazione del gruppo acido che, essendo una reazione di esterificazione, è perfettamente compatibile con l'uso del metanolo. Questa metodologia però non avrebbe risolto i problemi riscontrati durante la riduzione del volume e, soprattutto, non sarebbe stata applicabile agli steroli in cui, mancando un gruppo acido, viene derivatizzato il gruppo alcolico. Si è deciso pertanto di non utilizzare nemmeno questa metodica.
- Mantenere inalterato il processo di derivatizzazione e sostituire il metanolo con un altro solvente, in modo da risolvere sia i problemi di derivatizzazione che quelli di evaporazione.

Per sostituire il metanolo con un solvente senza protoni alcolici ma con polarità il più simile possibile si è sperimentato innanzitutto l'acetonitrile. Per compensare la sua minore polarità è stato utilizzato in miscela 1:1 con il diclorometano, mentre il metanolo era stato utilizzato in miscela 9:1 = DCM:MeOH. La tensione di vapore dell'acetonitrile è però leggermente più alta di quella del metanolo, i tempi richiesti per l'evaporazione sono di conseguenza leggermente aumentati e anche in questo caso si ha avuto la separazione in due fasi di alcuni campioni durante la concentrazione. Da quanto riportato sulle specifiche del BSTFA i solventi polari senza idrogeni attivi, quale è il caso dell'acetonitrile, facilitano la reazione di derivatizzazione. Si è notato infatti che aggiungendo il BSTFA alle frazioni con acetonitrile si sviluppa calore, segno che la reazione inizia già nel momento in cui il derivatizzante viene aggiunto. Analizzando i campioni però non si è riusciti ad identificare i picchi degli acidi alcanoici nemmeno in questo caso pertanto, in considerazione del fatto che non si sono riscontrati sensibili miglioramenti né in fase di riduzione del volume né in fase di derivatizzazione, l'uso dell'acetonitrile è stato escluso.

Per provare a migliorare la fase di riduzione del volume è stata fatta una prova di concentrazione e derivatizzazione con una miscela acetone:diclorometano=3:7, i tempi evaporazione sono sensibilmente diminuiti e non si è osservata separazione di fase, ma anche in questo caso la derivatizzazione non è stata efficace.

Si è deciso, in relazione a tutte le problematiche riscontrate con i solventi testati, di utilizzare solamente diclorometano per eluire la frazione polare, come fatto da Battistel et al. [21] in cui vengono utilizzati 70 mL di diclorometano per l'eluizione degli steroli sulla stessa tipologia di colonna cromatografica utilizzata in questo lavoro. Le prove di derivatizzazione con diclorometano non hanno mai dato esiti negativi e la sua bassa tensione di vapore lo rende un solvente facilmente evaporabile mediante *TurbovapII*®.
La prova di eluizione è stata eseguita ponendo su una colonna precedentemente condizionata con 40 mL di esano e 40 mL di diclorometano 50 μL di miscela di acidi n-alcanoici nativi a 50 ng μL^{-1} e 100 μL di miscela di steroli nativi a 10 ng μL^{-1}. Sono state raccolte tre frazioni, la prima costituita da 20 mL di miscela ESA:DCM = 9:1 (fase apolare), la seconda e la terza con 100 mL e 20 mL rispettivamente di diclorometano. Alle frazioni eluite sono stati aggiunti 20 μL di acido palmitico ^{13}C a 50 ng μL^{-1} e colesterolo ^{13}C a 50 ng μL^{-1} e il loro volume è stato ridotto tramite *TurbovapII*® fino a circa 100 μL. Le frazioni sono prima state trasferite in *vial* con tappo a vite e derivatizzate con 100 μL di BSTFA a 70 °C per 1 h e successivamente trasferite in *vial* da autocampionatore per essere analizzate tramite GC-MS.

In tab 3.12 sono riportate le percentuali dei singoli acidi n-alcanoici rispetto al totale del loro segnale in tutte le frazioni raccolte.

Tabella 3.12 - Frazionamento acidi n-alcanoici

	% acidi n-alcanoici nelle frazioni		
	frazione 1	frazione 2	frazione 3
C_{11}	1	98	1
C_{12}	5	86	9
C_{13}	7	92	1
C_{14}	6	92	2
C_{15}	4	94	2
C_{16}	7	90	3
C_{17}	2	98	1
C_{18}	9	86	5
C_{19}	9	88	3
C_{20}	5	93	2
C_{21}	3	95	2
C_{22}	2	98	1
C_{23}	1	98	1
C_{24}	1	98	1
C_{11} - C_{24}	4	93	2

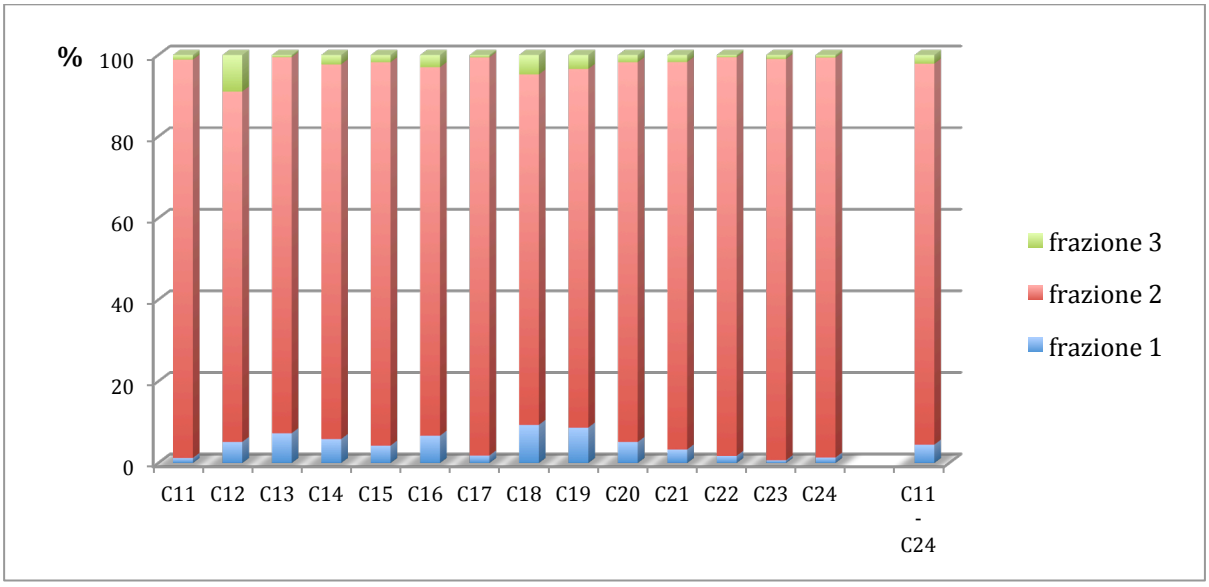

Figura 3.15 - Frazionamento acidi n-alcanoici

Dai dati ottenuti si vede come gli acidi alcanoici vengano eluiti solo in minima parte con la prima frazione, mentre vengono eluiti quasi interamente con 100 mL di diclorometano.

In tab 3.13 sono riportate le percentuali dei singoli steroli e stanoli rispetto al totale del loro segnale in tutte le frazioni raccolte.

Tabella 3.13 - Frazionamento steroli e stanoli

	% steroli e stanoli nelle frazioni		
	frazione 1	frazione 2	frazione 3
coprostanolo	0	100	0
epicoprostanolo	0	100	0
colesterolo	5	75	20
colestanolo	0	100	0
betasitosterolo	6	9	85
stigmastanolo	11	14	75
tot steroli e stanoli	8	62	30

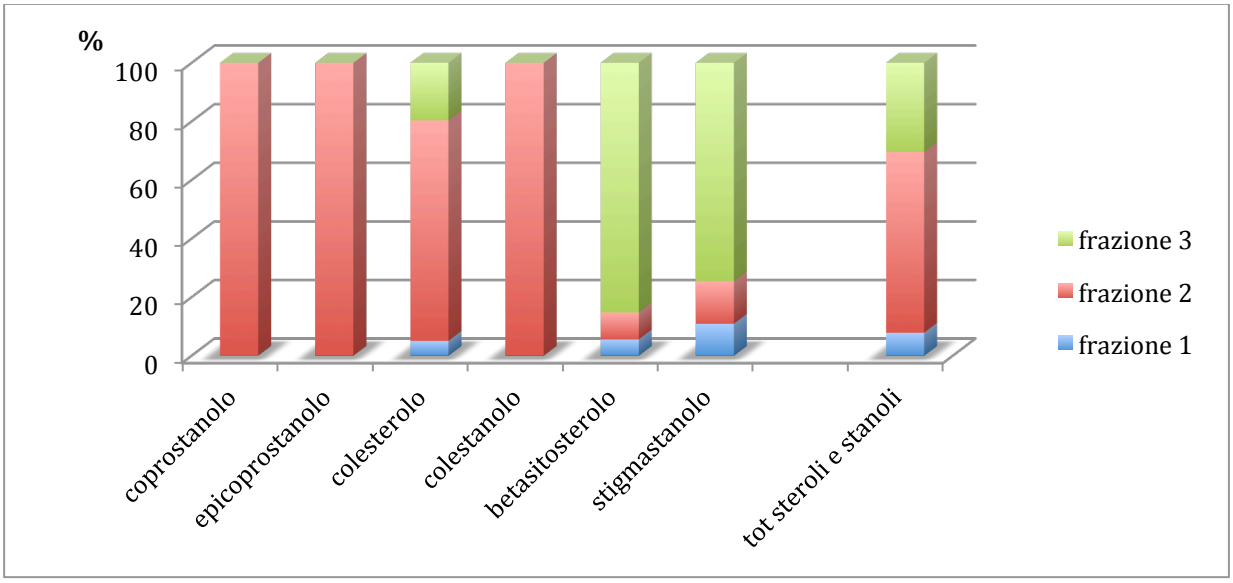

Figura 3.16 - Frazionamento steroli e stanoli

Dai dati ottenuti si vede come gli steroli siano quasi totalmente assenti dalla prima frazione apolare (le modeste quantità di betasitosterolo e stigmastanolo vengono attribuite a valori di bianco che verranno poi quantificati) e si distribuiscano tra la prima e la seconda frazione di diclorometano. Il fenomeno è simile a quello riscontrato con gli IPA: i composti a più alto peso molecolare tendono ad uscire per ultimi dalla colonna cromatografica, esattamente come accade in GC.

Coprostanolo, epi-coprostanolo, colesterolo e colestanolo si trovano quasi interamente nella seconda frazione, costituita da 100 mL di diclorometano, mentre betasitosterolo e stigmastanolo vengono eluiti per la maggior parte con i successivi 20 mL di diclorometano.

Dai dati ottenuti emerge che il miglior solvente per eluire la frazione polare sia il diclorometano e che il volume ideale di tale frazione sia 120 mL. Usare quantità inferiori comporterebbe perdite significative di steroli, in particolare, utilizzando solo il 17 % di solvente in meno (20 mL) si perderebbero quasi interamente il betasitosterolo e lo stigmastanolo.

Metodo di purificazione complessivo e rese di purificazione

In base alle prove effettuate e alle considerazioni fatte, il metodo di purificazione che si è deciso di adottare prevede l'utilizzo di colonne monouso di silice neutra in HDPE, condizionate con 40 mL di diclorometano e 40 mL di esano a seguire. Gli analiti vengono eluiti con due frazioni: la prima costituita da 20 mL di ESA:DCM = 9:1 per raccogliere n-alcani e IPA e la seconda costituita da 120 mL di diclorometano per raccogliere acidi n-alcanoici e steroli.

Il metodo è stato testato ponendo su una colonna già condizionata aliquote da 50 μL di miscele di n-alcani, IPA e acidi n-alcanoici nativi rispettivamente a 50, 1 e 50 ng μL^{-1} e 100 μL di miscela di steroli nativi a 10 ng μL^{-1}. Le due frazioni sono state raccolte e ad entrambe sono stati aggiunti 20 μL di esatriacontano a 100 ng μL^{-1}, miscela di IPA marcati a 1 ng μL^{-1}, acido stearico ^{13}C a 50 ng μL^{-1} e colesterolo ^{13}C a 50 ng μL^{-1}. Il volume delle frazioni è stato ridotto fino a circa 200 μL tramite *TurbovapII*® ed entrambe le frazioni sono state divise in due. Una parte è stata posta in una *vial* da autocampionatore ed è stata addizionata a 100 μL di iso-ottano, per l'analisi di alcani e IPA, l'altra parte è stata derivatizzata con 100 μL di BSTFA a 70°C per 1 h, per poi essere a sua volta trasferita in una *vial* da autocampionatore e analizzata.

Nella tabella seguente sono riportate le rese percentuali delle classi di analiti nelle due frazioni.

Tabella 3.14 - Rese di purificazione

	resa % frazione apolare	resa % frazione polare
n-alcani	85	17
IPA	122	9
acidi alcanoici	7	81
steroli	9	85

Il recupero degli analiti dalla colonna risulta quindi buono, con rese che superano l'80 % nelle rispettive frazioni desiderate: apolare per n–alcani e IPA, polare per acidi n-alcanoici e steroli.
Dal calcolo delle rese si vede che la quantità degli IPA tende ad essere sovrastimata, i valori di bianco, non calcolati in questa fase, verranno stimati successivamente per la metodica complessiva.

3.1.5 Estrazione

Per testare i solventi, il loro volume e le condizioni di estrazione è stata effettuata una prova in cui sono stati posti tot 100 μL di miscela di IPA e steroli nativi a 1 ng μL^{-1} e 10 ng μL^{-1}rispettivamente, con 50 μL di miscele di acidi n-alcanoici e n-alcani a 50 ng μL^{-1}in una *vessel* riempita con terra di diatomee, sabbia di Ottawa e solfato di sodio. Il contenuto della *vessel* è stato estratto con PLE in tre cicli a 100 °C 1000 PSI 20 mL min^{-1} con una miscela ESA:DCM=1:1, agli estratti riuniti sono stati aggiunti 100 μL di una soluzione contenente IPA marcati, colesterolo ^{13}C, acido stearico ^{13}C e esatriacontano, rispettivamente a 1 ng μL^{-1}, 2 ng μL^{-1}, 10 ng μL^{-1} e 40 ng μL^{-1}e, dopo concentrazione al *TurbovapII*®, sono stati purificati e analizzati con la metodica descritta nel capitolo precedente.

Nella tabella seguente vengono riportate le rese di estrazione ottenute riunendo i tre estratti. Sono stati esclusi l'acido palmitico e l'acido stearico dalla media degli acidi n-alcanoici perché i loro valori si allontanavano troppo da quelli degli altri analiti di questa classe e non risultavano verosimili (rispettivamente 663 % e 583 %).

Tabella 3.15 - Rese di Estrazione

	resa di estrazione (%)
n-alcani	101
IPA	98
acidi alcanoici	50
steroli e stanoli	105

Tre cicli si dimostrano sufficienti per estrarre la quasi totalità degli n-alcani, degli IPA, degli steroli e degli stanoli, mentre viene estratto solo il 50 % degli acidi n-alcanoici.

3.1.6 Qualità del dato analitico

Data la mancanza di materiale certificato sul quale validare la metodica, la qualità del dato analitico è stata valutata mediante prove ripetute in cui aliquote delle soluzioni di nativi sono state disperse in terra di diatomee, estratte, purificate e analizzate con la stessa metodica che verrà applicata ai campioni.

Bianchi strumentali

Al fine di stimare la contaminazione degli analiti, l'intera procedura analitica è stata ripetuta per tre volte in assenza dei composti nativi.
Sono stati quindi posti 100 μL di una soluzione contenente IPA marcati, colesterolo ^{13}C, acido stearico ^{13}C e esatriacontano, rispettivamente a 1 ng μL^{-1}, 2 ng μL^{-1}, 10 ng μL^{-1} e 40 ng μL^{-1} in una *vessel* contenente sabbia di Ottawa, sodio solfato e terra di diatomee. Il contenuto della *vessel* è stato estratto tramite PLE, in tre cicli a 100 °C 1000 PSI 20 mL min^{-1} con una miscela ESA:DCM=1:1. Una volta concentrato fino a 500 μL tramite *TurbovapII*®, l'estratto è stato purificato su colonne SPE in silice neutra (decontaminate con 40 mL di diclorometano e 40 mL di esano), raccogliendo una prima frazione con 20 mL di miscela ESA:DCM=9:1 e una seconda con 120 mL di diclorometano. Entrambe le frazioni vengono concentrate tramite *TurbovapII*® fino a circa 100 μL, la prima frazione viene posta in *vial* da autocampionatore e vi vengono addizionati 100 μL di iso-ottano, la seconda viene derivatizzata con 100 μL di BSTFA a 70 °C per 1 h in *vial* con tappo a vite e successivamente trasferita in *vial* da autocampionatore. Sulla prima frazione, apolare, viene eseguita l'analisi al GC MS con i metodi sviluppati per n-alcani e IPA, sulla seconda frazione, polare, viene eseguita l'analisi GC MS con i metodi sviluppati per acidi n-alcanoici e steroli.

I valori riscontrati per la frazione apolare sono i seguenti:

Tabella 3.16 - Bianchi frazione apolare

BIANCHI n-alcani			
	ng	dev st	dev st %
C_{10}	63	28	44
C_{11}	192	13	7
C_{12}	158	33	21
C_{13}	154	12	8
C_{14}	170	1	1
C_{15}	1052	73	7
C_{16}	361	21	6
C_{17}	72	13	18
C_{18}	460	39	8
C_{19}	33	7	20
C_{20}	211	76	36
C_{21}	31	2	6
C_{22}	413	45	11
C_{23}	82	7	8
C_{24}	196	14	7
C_{25}	165	4	2
C_{26}	202	24	11
C_{27}	185	2	1
C_{28}	224	34	15
C_{29}	143	5	4
C_{30}	168	11	7
C_{31}	111	3	3
C_{32}	97	14	14
C_{33}	84	11	13
C_{34}	58	11	18
C_{35}	80	6	8
media alcani	199	22	11

Tabella 3.17 - Bianchi frazione apolare

BIANCHI IPA			
	ng	dev st	dev st %
Naftalene	14	1	10
Acenaftilene	1.09	0.09	8
Acenaftene	4.4	0.7	16
Fluorene	0.70	0.01	2
Fenantrene	9.7	0.4	5
Antracene	nd	nd	nd
Fluorantene	16	3	16
Pirene	39	9	24
Benzo(a)Antracene	0.362	0.006	2
Crisene	0.9	0.2	21
Retene	0.8	0.2	28
Benzo(b)Fluorantene	nd	nd	nd
Benzo(k)Fluorantene	nd	nd	nd
Benzo(a)Pirene	11	1	10
Benzo(ghi)Perilene	nd	nd	nd
Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	97	15	15
Dibenzo(A,H)Antracene	nd	nd	nd
media IPA	12	2	16

Le quantità di alcani rilevate nella strumentazione del laboratorio sono mediamente abbastanza basse (199±22 ng), variando molto da specie a specie, da 1.05±0.07 μg del C_{15} a 31±2 ng del C_{21}.

Gli IPA presentano invece valori di bianco molto bassi, mediamente di 12±2 ng, arrivando ad un massimo di 97±15 ng per l'indeno(1,2,3-c,d)pirene.

I valori riscontrati per la frazione polare sono i seguenti:

Tabella 3.18 - Bianchi frazione polare

BIANCHI acidi n-alcanoici	ng	dev st	dev st %
C_{11}	321	133	41
C_{12}	2624	1464	56
C_{13}	278	32	11
C_{14}	4260	1539	36
C_{15}	1003	101	10
C_{16}	40792	12750	31
C_{17}	712	232	32
C_{18}	51249	15082	29
C_{19}	115	5	5
C_{20}	659	89	14
C_{21}	41	3	7
C_{22}	224	44	20
C_{23}	142	41	29
C_{24}	1055	340	32
media acidi	953	335	35

Tabella 3.19 - Bianchi frazione polare

BIANCHI steroli e stanoli	ng	dev st	dev st %
Coprostanolo	2	1	62
Epicoprostanolo	3	3	114
Colesterolo	73	37	50
Colestanolo	5	7	149
Betasitostanolo	15	12	77
Stigmastanolo	31	31	102
media steroli e stanoli	21	15	71

Come già intuibile in fase di messa a punto della metodica, gli acidi alcanoici sono i composti che presentano i più alti valori di bianco tra quelli in analisi. Di acido palmitico e acido stearico, in particolare, vengono rilevati 41±12 e 51±15 μg, quantità decisamente elevate nell'ottica di una quantificazione accurata dei due composti in campioni reali. La media dei valori di bianco degli altri acidi n-alcanoici è invece di 1±0.3 μg, quantità comunque elevata ma accettabile per una metodica multianalita.

Steroli e stanoli invece presentano valori di bianco molto bassi, da un massimo di 73±37 ng per il colesterolo ad un minimo di 2±1 ng per il coprostanolo, con un valore medio per gli analiti in esame di 21±15 ng.

Limite di rivelabilità strumentale

Il limite di rivelabilità della metodica, o *method detection limit* (**MDL**), esprime la più bassa quantità di campione che può essere rivelata mediante la metodica sviluppata e viene calcolato sommando al valore di bianco tre deviazioni standard.

I limiti di rilevabilità degli analiti della frazione apolare sono i seguenti:

Tabella 3.20 - MDL frazione apolare

n-alcani	ng	dev st	MDL (ng)
C_{10}	63	28	146
C_{11}	192	13	233
C_{12}	158	33	257
C_{13}	154	12	190
C_{14}	170	1	173
C_{15}	1052	73	1272
C_{16}	361	21	424
C_{17}	72	13	110
C_{18}	460	39	576
C_{19}	33	7	53
C_{20}	211	76	438
C_{21}	31	2	37
C_{22}	413	45	548
C_{23}	82	7	102
C_{24}	196	14	238
C_{25}	165	4	175
C_{26}	202	24	272
C_{27}	185	2	190
C_{28}	224	34	326
C_{29}	143	5	158
C_{30}	168	11	203
C_{31}	111	3	121
C_{32}	97	14	138
C_{33}	84	11	117
C_{34}	58	11	90
C_{35}	80	6	98
media alcani	199	22	257

Tabella 3.21 - MDL frazione apolare

IPA	ng	dev st	MDL (ng)
Naftalene	14	1	19
Acenaftilene	1	0	1
Acenaftene	4	1	7
Fluorene	1	0	1
Fenantrene	10	0	11
Antracene	0	0	0
Fluorantene	16	3	24
Pirene	39	9	68
Benzo(a)Antracene	0	0	0
Crisene	1	0	1
Retene	1	0	1
Benzo(b)Fluorantene	0	0	0
Benzo(k)Fluorantene	0	0	0
Benzo(a)Pirene	11	1	15
Benzo(ghi)Perilene	0	0	0
Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	97	15	142
Dibenzo(A,H)Antracene	0	0	0
media IPA	12	2	17

Il limite di rivelabilità degli alcani, mediamente di 257 ng assoluti, varia da un massimo di 1.27 μg assoluti per il C_{15} ad un minimo di 37 ng per il C_{21}. Nell'intervallo di interesse per le ricostruzioni paleoclimatiche alle quali questo metodo è rivolto (C_{21}-C_{35}) il limite di rivelabilità medio scende a 188 ng assoluti.

Il limite di rilevabilità degli IPA è mediamente di 17 ng assoluti, ma varia molto in base alle specie, passando da un massimo di 142 ng per l'indeno(1,2,3-c,d)pirene ad un minimo di 0 ng per antracene, benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(ghi)perilene e dibenzo(A,H)antracene.

I limiti di rilevabilità degli analiti della frazione polare sono i seguenti:

Tabella 3.22 - MDL frazione polare

acidi n-alcanoici			
	ng	dev st	LOD (ng)
C_{11}	321	133	720
C_{12}	2624	1464	7018
C_{13}	278	32	373
C_{14}	4260	1539	8876
C_{15}	1003	101	1307
C_{16}	40792	12750	79041
C_{17}	712	232	1407
C_{18}	51249	15082	96496
C_{19}	115	5	130
C_{20}	659	89	927
C_{21}	41	3	50
C_{22}	224	44	356
C_{23}	142	41	265
C_{24}	1055	340	2075
media acidi	953	335	1959

Tabella 3.23 - MDL frazione polare

steroli e stanoli			
	B medi	dev st	LOD (ng)
coprostanolo	2	1	6
epicoprostanolo	3	3	13
colesterolo	73	37	185
colestanolo	5	7	26
betasitosterolo	15	12	50
stigmastanolo	31	31	125
media steroli e stanoli	21	15	67

Gli acidi alcanoici sono i composti che presentano i limiti di rivelabilità strumentale più alti tra quelli in analisi. Di acido palmitico e acido stearico, in particolare, si ritrovano LOD di 79.0 e 96.5 μg, quantità decisamente elevate nell'ottica di una quantificazione accurata dei due composti in campioni reali. La media dei limiti degli altri acidi n-alcanoici (escludendo quindi C_{16} e C_{18}) è invece di 2.0 μg.

Steroli e stanoli presentano invece valori di bianco molto bassi, da un massimo di 185 ng per il colesterolo ad un minimo di 6 ng per il coprostanolo, con un valore medio di 67 ng.

Precisioni e accuratezze

Le accuratezze sono state valutate ponendo in una *vessel* sabbia di Ottawa, sodio solfato e terra di diatomee, sulla quale vengono poste aliquote da 100 μL di miscela di IPA e steroli nativi a 1 ng μL^{-1} e 10 ng μL^{-1} rispettivamente e 50 μL di miscele di acidi alcanoici e n-alcani a 50 ng μL^{-1}, con i rispettivi standard interni aggiunti tramite un aliquota da 100 μL di una soluzione contenente IPA marcati, colesterolo ^{13}C, acido stearico ^{13}C e esatriacontano, rispettivamente a 1 ng μL^{-1}, 2 ng μL^{-1}, 10 ng μL^{-1} e 40 ng μL^{-1}. Gli pseudo-campioni così ottenuti sono stati estratti tramite PLE, intre cicli a 100 °C 1000 PSI 20 mL min^{-1} con una miscela ESA:DCM=1:1. Una volta concentrati fino a 500 μL tramite *TurbovapII*®, gli estratti sono stati purificati su colonne SPE in silice neutra (decontaminate con 40 mL di diclorometano e 40 mL di esano), raccogliendo una prima frazione con 20 mL di miscela esano : diclorometano 9:1 e una seconda con 120 mL di diclorometano. Entrambe le frazioni vengono concentrate tramite *TurbovapII*® fino a circa 100 μL, la prima frazione viene posta in *vial* da autocampionatore e vi vengono addizionati 100 μL di iso-ottano, la seconda viene derivatizzata con 100 μL di BSTFA a 70 °C per 1 h in *vial* con tappo a vite e successivamente trasferita in *vial* da autocampionatore. Sulla prima frazione, apolare, viene eseguita l'analisi al GC MS con i metodi sviluppati per n-alcani e IPA, sulla seconda frazione, polare, viene eseguita l'analisi GC MS con i metodi sviluppati per acidi alcanoici e steroli.

n-alcani

Nella tabella seguente vengono riportati i valori ottenuti (in μg) in quattro prove ripetute con la metodica descritta ad inizio capitolo.

Tabella 3.24 - Prove di precisione e accuratezza per n-alcani

	media prove	Dev. St.	% dev st	errore %
C_{10}	2.3	0.5	20	4
C_{11}	1.9	0.4	23	14
C_{12}	2.3	0.3	14	4
C_{13}	2.7	0.8	30	4
C_{14}	2.9	0.5	17	8
C_{15}	5	1	30	33
C_{16}	3.0	0.6	20	9
C_{17}	2.4	0.7	30	2
C_{18}	3.1	0.4	13	11
C_{19}	2.3	0.8	33	4
C_{20}	2.5	0.4	17	0
C_{21}	2.2	0.7	33	6
C_{22}	2.6	0.4	15	2
C_{23}	2.3	0.5	21	4
C_{24}	2.3	0.5	22	5
C_{25}	2.2	0.4	16	5
C_{26}	2.6	0.4	16	3
C_{27}	2.1	0.4	19	8
C_{28}	3	1	33	9
C_{29}	2.1	0.6	28	8
C_{30}	2.9	0.6	19	7
C_{31}	2.1	0.6	28	8
C_{32}	2.8	0.5	17	5
C_{33}	2.3	0.4	18	4
C_{34}	2.6	0.2	9	2
C_{35}	2.5	0.3	11	1
media alcani	2.6	0.6	21	2

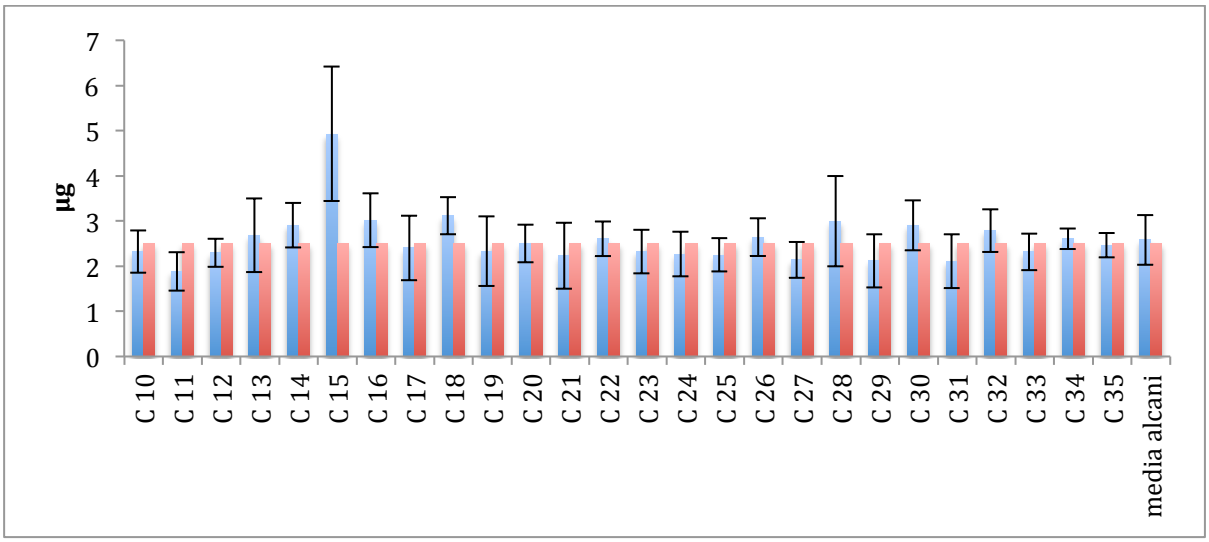

Figura 3.17 - Prove di precisione e accuratezza per n-alcani

L'accuratezza del metodo varia molto in base ai singoli analiti, gli errori rispetto al valore vero vanno dal 0 % del C_{20} al 33 % del C_{15}, ma in linea generale il metodo presenta una buona accuratezza con un errore sulla media degli alcani del 7 %, che scende al 5 % nell'intervallo di interesse per le ricostruzioni paleoclimatiche per le quali questo metodo è stato sviluppato (C_{21}-C_{35}).

Anche la precisione varia molto in base ai singoli analiti, con la deviazione standard percentuale che va da un minimo di 9 % per C_{34} ad un massimo di 33 % per C_{28}. Il valore medio per tutti gli alcani è 21 % e non varia molto nell'intervallo C_{21}-C_{35} (20 %).

Idrocarburi Policiclici Aromatici

Nella tabella seguente vengono riportati i valori ottenuti (in µg) in quattro prove ripetute con la metodica descritta ad inizio capitolo.

Tabella 3.25 - Prove di precisione e accuratezza per IPA

	media prove	DEV. ST.	dev st %	Errore %
Naftalene	0.10	0.01	10	0
Acenaftilene	0.11	0.02	13	7
Acenaftene	0.12	0.02	18	7
Fluorene	0.12	0.02	13	7
Fenantrene	0.10	0.01	15	2
Antracene	0.13	0.02	15	14
Fluorantene	0.13	0.02	14	13
Pirene	0.10	0.01	11	0
Benzo(a)Antracene	0.15	0.02	16	19
Crisene	0.11	0.01	12	3
Retene	0.20	0.01	4	34
Benzo(b)Fluorantene	0.07	0.01	13	17
Benzo(k)Fluorantene	0.07	0.01	16	17
Benzo(a)Pirene	0.05	0.01	12	30
Benzo(ghi)Perilene	0.13	0.02	17	15
Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	0.060	0.005	8	25
Dibenzo(A,H)Antracene	0.10	0.02	19	1
media IPA	0.11	0.01	13	12

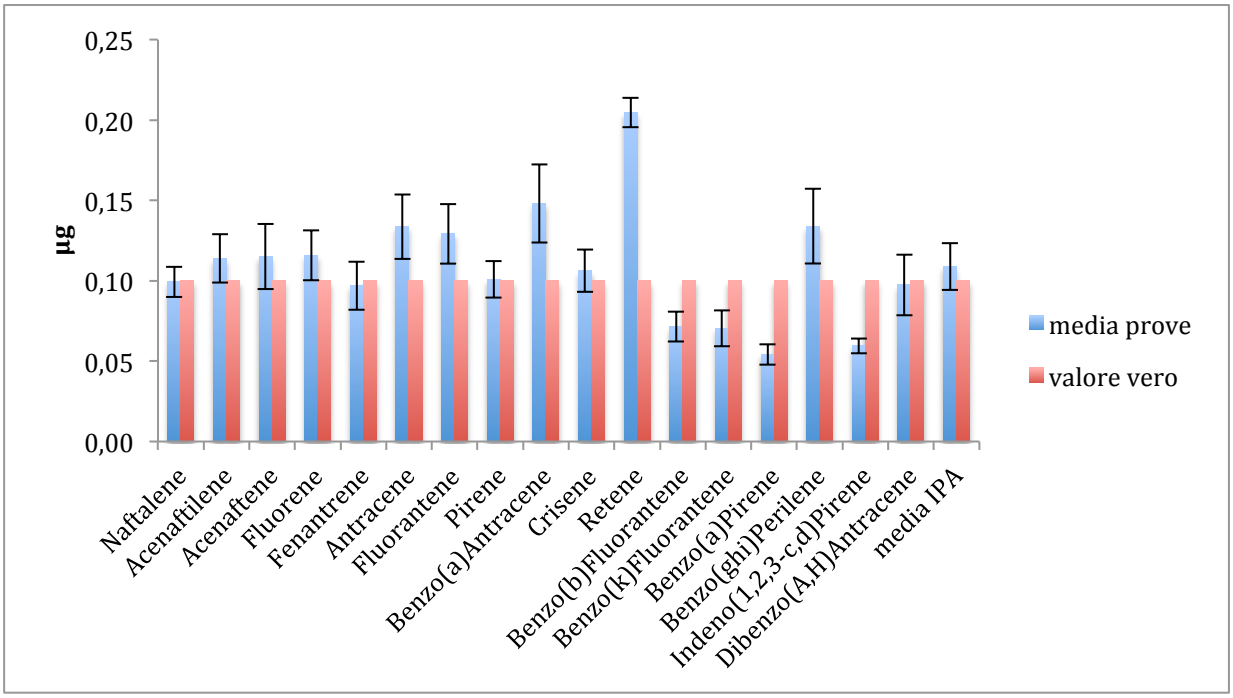

Figura 3.18 - Prove di precisione e accuratezza per IPA

In base ai dati ottenuti si vede come sia l'accuratezza che la precisione siano mediamente buone per questa classe di analiti, l'errore rispetto al valore vero è del 13 % e la deviazione standard delle prove corrisponde al 13 % dei valori ottenuti.

Esaminando gli IPA singolarmente, per quanto riguarda la precisione si hanno valori di deviazione standard percentuale che vanno da un minimo di 5 % per il retene ad un massimo di 20 % per il dibenzo-(A,H)-antracene, le accuratezze invece mostrano che la metodica tende a sottostimare le quantità di benzo(z)fluorantrene, benzo(k)fluorantrene, benzo(a)pirene e indeno(1,2,3-c,d)pirene, mentre la quantità di retene è fortemente sovrastimata.

La metodica da un errore del 34 % rispetto al valore vero per il retene, mostrandosi non particolarmente efficace nella misurazione della quantità assoluta di questo IPA. La precisione della misura però è molto elevata, con una deviazione standard del 5 %, consentendo di applicare la metodica a ricostruzioni paleoclimatiche in cui, più che i valori assoluti degli analiti, sono rilevanti le loro variazioni nel tempo.

Acidi n-alcanoici

Nella tabella seguente vengono riportati i valori ottenuti (in µg) in quattro prove ripetute con la metodica descritta ad inizio capitolo.

Tabella 3.26 - Prove di precisione e accuratezza per acidi n-alcanoici

	media prove	dev st	dev st %	errore %
C_{11}	3	2	55	16
C_{12}	8	2	25	37
C_{13}	4	2	56	22
C_{14}	0.2×10^2	0.2×10^2	75	78
C_{15}	0.3×10^2	0.3×10^2	120	83
C_{16}	0.8×10^2	0.9×10^2	105	94
C_{17}	7	3	38	50
C_{18}	0.7×10^2	0.7×10^2	97	93
C_{19}	4	3	65	25
C_{20}	11	5	51	57
C_{21}	4	3	81	23
C_{22}	6	3	62	38
C_{23}	4	3	78	26
C_{24}	10	8	85	60
media acidi	8	5	61	39

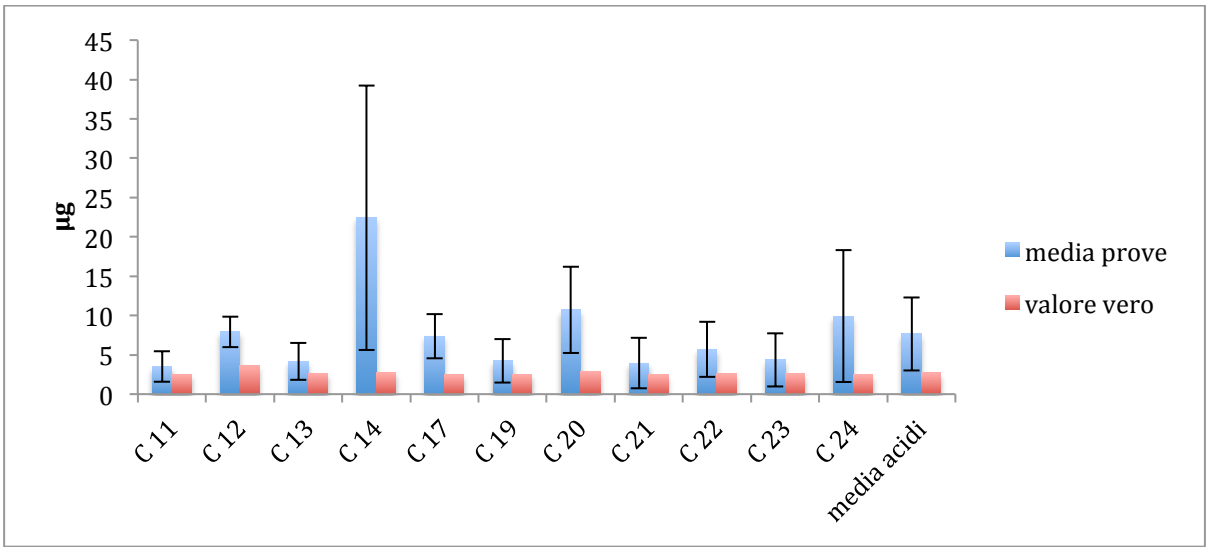

Figura 3.19 - Prove di precisione e accuratezza per acidi n-alcanoici

Dal grafico e dalla media degli acidi sono stati esclusi gli acidi C_{15}, C_{16} e C_{18}; per questi acidi, oltre ad una bassa accuratezza con errori rispetto al valore vero dell'83, 94 e 93 %, si ha anche una bassissima precisione, con deviazioni standard percentuali intorno al

100 % se non superiori. Il metodo non si è quindi rivelato efficace per l'analisi di questi analiti.

Gli altri acidi mostrano basse accuratezze, con un errore medio rispetto al valore vero del 35 % e basse precisioni, con una deviazione standard percentuale del 61 %.

Steroli e stanoli

Nella tabella seguente vengono riportati i valori ottenuti (in µg) in quattro prove ripetute con la metodica descritta ad inizio capitolo.

Tabella 3.27 - Prove di precisione e accuratezza per steroli e stanoli

	media prove	dev st	dev st %	errore %
coprostanolo	0.8	0.2	19	8
epicoprostanolo	0.9	0.1	15	8
colesterolo	0.96	0.04	5	2
colestanolo	0.99	0.06	6	1
betasitosterolo	1.72	0.09	5	26
stigmastanolo	1.06	0.07	6	3
Media steroli e stanoli	1.07	0.09	9	8

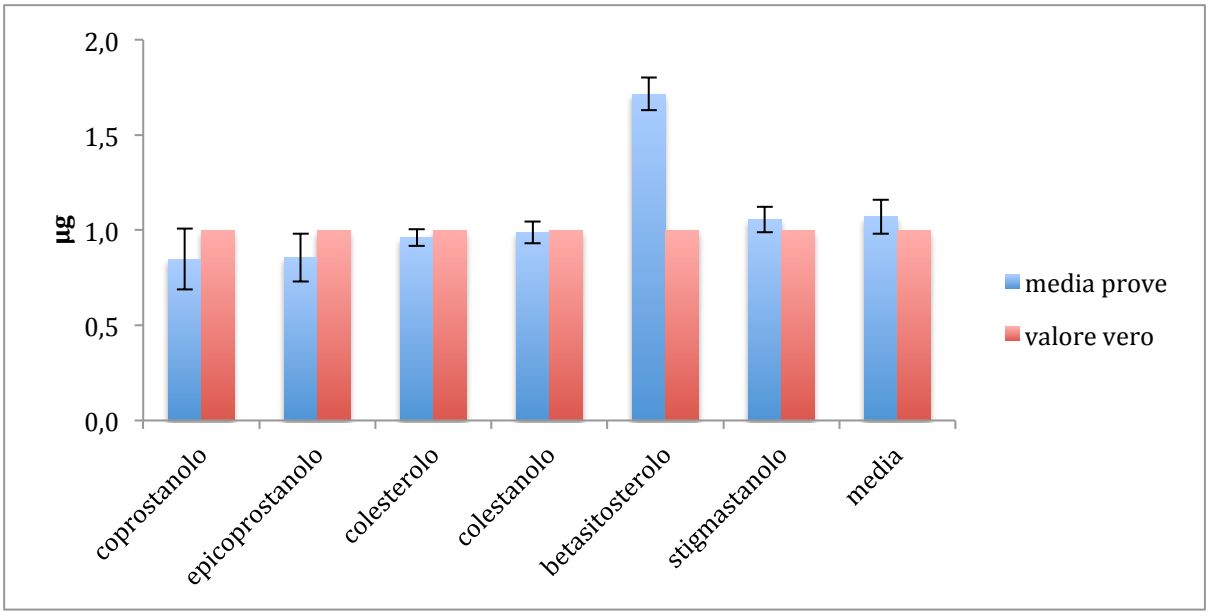

Figura 3.20 - Prove di precisione e accuratezza per steroli e stanoli

La metodica sviluppata per l'analisi di steroli e stanoli presenta un'ottima accuratezza, con un errore medio del 8 % rispetto al valore vero e una buona precisione, con una deviazione standard percentuale del 9 %.

È da notare però che la quantità del betasitosterolo viene sovrastimata, con un errore del 26 %, ma la misura risulta comunque precisa. Escludendo il betasitosterolo, l'errore percentuale medio degli altri composti è del 4 %.

Rese

Per il calcolo delle rese totali del metodo è stata applicata la metodica descritta per il calcolo delle accuratezze, con la differenza che i marcati non sono stati aggiunti con i nativi all'inizio, ma solo alla fine della concentrazione delle frazioni eluite.

n-alcani

Nella tabella seguente sono riportate le rese percentuali ottenute dalla media di tre prove ripetute.

Tabella 3.28 - Rese n-alcani

	resa %	dev st %
C_{10}	62	3
C_{11}	50	4
C_{12}	55	2
C_{13}	68	2
C_{14}	65	3
C_{15}	92	18
C_{16}	67	6
C_{17}	71	4
C_{18}	73	6
C_{19}	78	4
C_{20}	75	7
C_{21}	76	4
C_{22}	77	5
C_{23}	76	5
C_{24}	83	7
C_{25}	76	4
C_{26}	82	10
C_{27}	76	4
C_{28}	88	9
C_{29}	78	5
C_{30}	88	4
C_{31}	80	5
C_{32}	86	6
C_{33}	84	4
C_{34}	87	4
C_{35}	88	4
media alcani	76	5

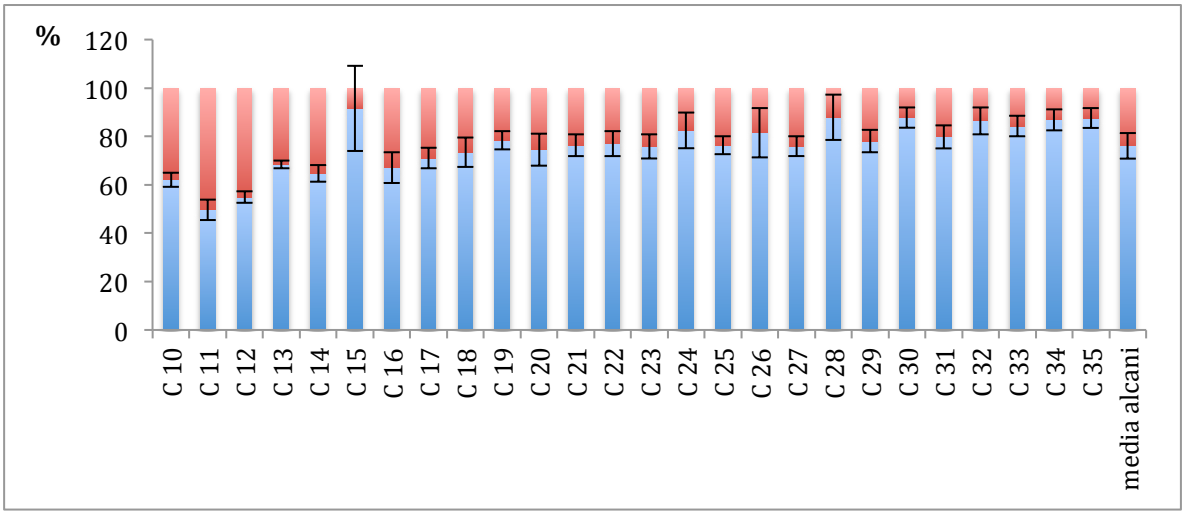

Figura 3.21 - Rese n-alcani

La resa media degli alcani è in 76 % (± 5), tendendo ad essere leggermente più elevata per gli alcani a catena lunga rispetto a quelli a catena corta, la media nell'intervallo (C_{21}-C_{35}) è 82 % (± 5).

Idrocarburi Policiclici Aromatici

Nella tabella seguente sono riportate le rese percentuali ottenute dalla media di tre prove ripetute.

Tabella 3.29 - Rese IPA

	Resa %	dev st
Naftalene	57	9
Acenaftilene	89	1
Acenaftene	140	33
Fluorene	127	36
Fenantrene	77	1
Antracene	119	3
Fluorantene	109	3
Pirene	77	4
Benzo(a)Antracene	139	6
Crisene	90	3
Retene	145	15
Benzo(b)Fluorantene	69	1
Benzo(k)Fluorantene	61	1
Benzo(a)Pirene	51	0
Benzo(ghi)Perilene	149	0
Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	46	2
Dibenzo(A,H)Antracene	108	2
media IPA	97	6

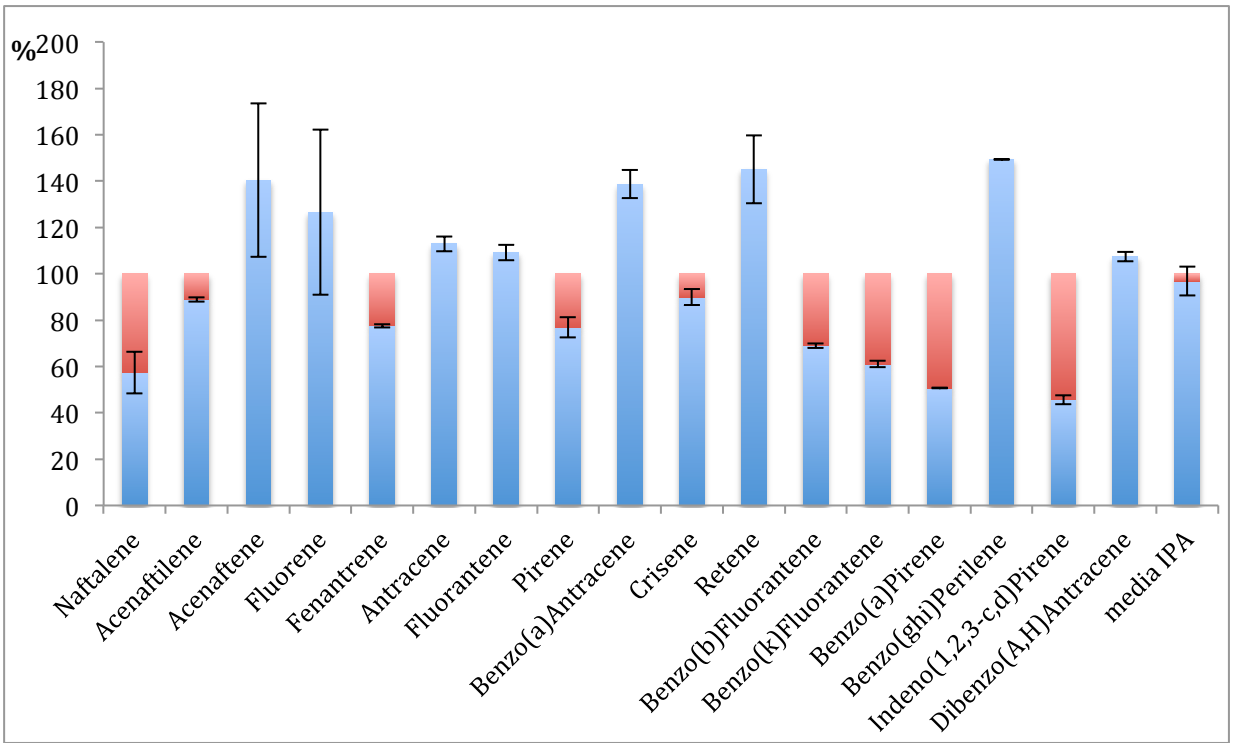

Figura 3.22 - Rese IPA

La resa media è molto alta, alla fine della metodica si ritrovano il 96 % (± 8) degli IPA introdotti all'inizio. Come già riscontrato nelle prove di accuratezza e precisione, le quantità di acenaftene, fluorene, antracene, fluorantrene, benzo(a)antracene, retene e benzo(ghi)perilene vengono sovrastimate.

Acidi n-alcanoici

Nella tabella seguente sono riportate le rese percentuali ottenute dalla media di tre prove ripetute.

Tabella 3.30 - Rese acidi n-alcanoici

	resa %	dev st
C_{11}	2	1
C_{12}	5	2
C_{13}	3	1
C_{14}	14	6
C_{15}	5	2
C_{16}	108	46
C_{17}	7	2
C_{18}	113	33
C_{19}	3	1
C_{20}	7	2
C_{21}	3	1
C_{22}	4	2
C_{23}	3	2
C_{24}	10	5
media acidi	20	8

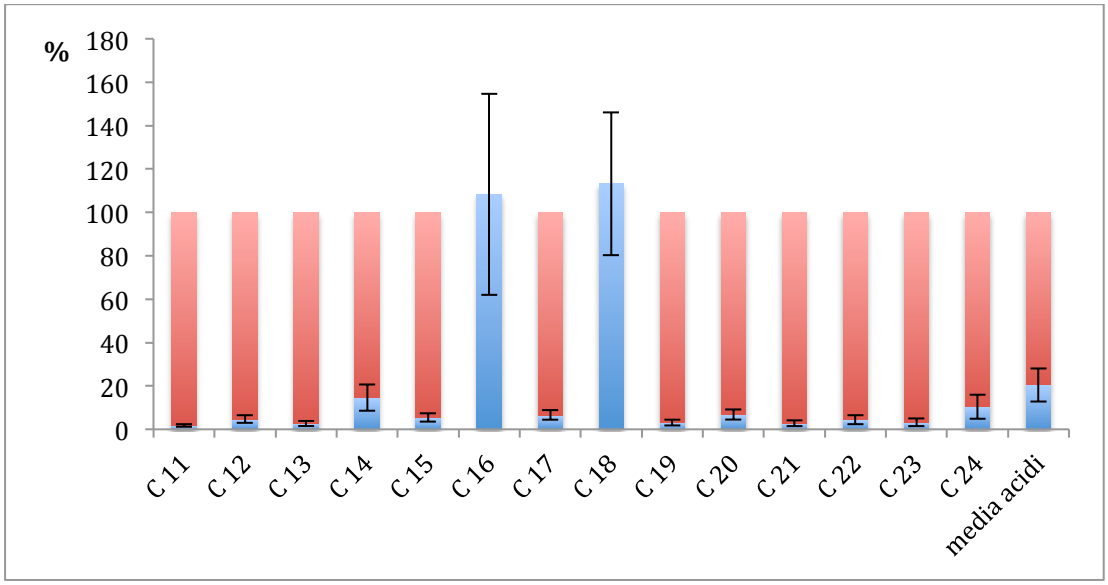

Figura 3.23 - Rese acidi n-alcanoici

La resa media di tutti gli acidi n-alcanoici è del 20 % ma, se si escludono l'acido palmitico e l'acido stearico, la resa media scende al 6 %, dato che può spiegare la bassa precisione e la bassa accuratezza del metodo e che conferma il fatto che la procedura adottata non sia adatta all'analisi di questa classe di analiti.

Steroli e stanoli

Nella tabella seguente sono riportate le rese percentuali ottenute dalla media di tre prove ripetute.

Tabella 3.31 - Rese steroli e stanoli

	resa %	dev st
coprostanolo	58	7
epicoprostanolo	60	7
colesterolo	70	8
colestanolo	76	9
betasitosterolo	129	14
stigmastanolo	79	9
media	79	9

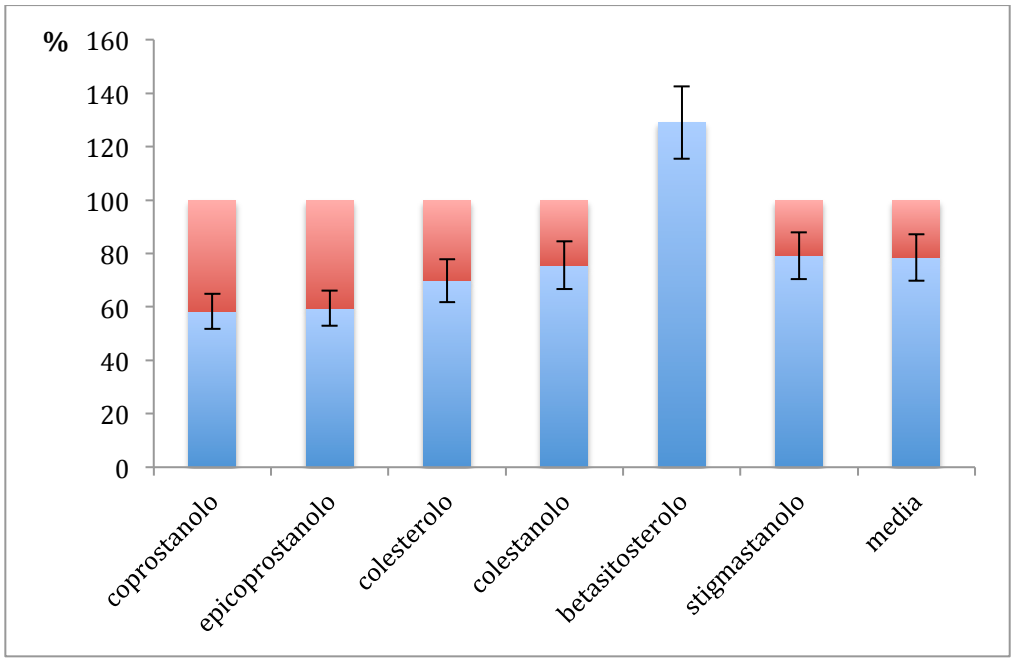

Figura 3.24 - Rese steroli e stanoli

Le rese degli steroli e degli stanoli sono buone, con un valore medio del 79 % (± 9), il betasitosterolo, come già visto nelle prove di accuratezza e precisione, tende ad essere sovrastimato.

3.1.7 Struttura finale della metodica

Scopo del lavoro descritto fino a questo punto è stato ricercare le migliori condizioni per ottenere una metodica valida e applicabile a campioni reali. Nella prossima parte verranno illustrati i risultati ottenuti dall'utilizzo della procedura su campioni di torba.

La metodica prevedrà quindi i passaggi seguenti.

1. Aggiunta degli standard interni al campione macinato e disperso con terra di diatomee.
2. 3 cicli di estrazione con miscela n-esano : diclorometano 1 : 1 a 100 °C 1000 psi.
3. Concentrazione del campione fino a 500 μL.
4. Purificazione del campione e suddivisione in due frazioni: apolare contenente n-alcani e IPA in n-esano : diclorometano 9:1 e polare contenente acidi alcanoici e steroli in diclorometano.
5. Concentrazione di entrambe le frazioni fino a 100 μL
6. Aggiunta di 100 μL di iso-ottano nella frazione apolare e derivatizzazione con BSTFA (70 °C 1 h) per la frazione polare.
7. Analisi gascromatografica GC MS.

3.2 Applicazione su campioni reali

3.2.1 La torbiera di Coltrondo

La torbiera dalla quale sono stati prelevati i campioni analizzati si trova a Coltrondo, in provincia di Belluno, sotto il comune di Comelico Superiore, vicino al confine italo-austriaco (Veneto NE Italia, 46° 39' 28.37'' N, 12° 26' 59.17'' E) ad un'altitudine di 1790 m s.l.m.

La zona si trova nell'area Dolomitica nel settore a nord del fiume Piave e sul versante sinistro della valle del Padola (area di Comelico). Lo sfagneto ha una superficie di 3.7 ha e fa parte di un sistema di torbiere che si estende per 14 ha.

L'area è caratterizzata da un basamento cristallino Paleozoico, ricoperto direttamente da uno strato vulcanico del basso Permiano. La torbiera di Coltrondo è adagiata direttamente su un conglomerato semiarido di fanghi alluvionali, torrenti intrecciati e

fiumi meandrici. Le caratteristiche fisiche della zona comportano una forte ritenzione idrica e una buona impermeabilità, che favoriscono la formazione di torbiere e paludi.
La vegetazione moderna dell'area è caratterizzata dalla dominanza di foreste di pecci (*Picea*) che si estendono dalle altitudini più basse fino al limite del bosco, localizzato approssimativamente a 2000 m s.l.m.; altre specie presenti sono gli abeti (*Abies alba*), anche se in quantità nettamente inferiore, larici (*Larix*) e pini (*Pinus sylvestris e Pinus mugo*). La vegetazione moderna è frutto dell'influenza umana che si è perpetuata per secoli, favorendo i pecci rispetto ad abeti, pini, larici e specialmente al genere *Fagus*, rappresentato oggi solamente da specie arbustive. L'abbondanza generale delle attività pastorali delle ultime decadi ha favorito la diffusione di cespugli come *Rhododendron* e *Vaccinium*, salice (*Salix*) e arbusti (*Aluns viridis*). La torbiera è attualmente circondata da una foresta di pecci e dalla presenza di pini cembri (*Pinus cembra*) che crescono sul margine della torba.

La carota dalla quale provengono i campioni è stata prelevata a giungo 2011 con un carotiere da 250 cm. Gli strati superficiali della torba (i primi 100 cm) hanno richiesto un carotiere speciale per evitare la compressione durante l'estrazione, caratterizzato da una superficie maggiore (15x15x100 cm invece di 10x10x100). Gli strati più profondi sono stati invece prelevati con un carotatore di tipo Belarus a sezione semicilindrica (10x15 cm) che sfrutta una tecnica a tripla perforazione per evitare interferenze nel campione. L'intera carota è stata avvolta in un film di plastica, portata in laboratorio e immagazzinata a -18°C immediatamente dopo il campionamento. Successivamente è stata tagliata in fette da 1 cm a freddo utilizzando una sega a nastro in acciaio inossidabile, i bordi esterni sono stati scartati per evitare contaminazioni e ogni fetta è stata divisa in diversi quadrati per ottenere diversi sub-campioni che permettessero analisi multi-*proxy* [106].

Figura 3.25 - Mappa del Cadore, la posizione della torbiera è indicata dal segnaposto

I dati di profondità, datazione, velocità di sedimentazione e densità dei campioni analizzati sono riportati nella seguente tabella:

Tabella 3.32 - Dati campioni di torba analizzati [106]

Profondità (cm)	12.8	40.5	64.5	77.7	91.8	133.1	167.3	226.1
Età (cal BP)	-33	229	741	1127	1977	4613	6050	7270
Velocità di sedimentazione (cm y^{-1})	0.340	0.019	0.088	0.017	0.015	0.015	0.047	0.035
Densità (g cm^{-3})	0.065	0.135	0.081	0.129	0.127	0.105	0.12	0.097

Di seguito sono riportati i risultati delle varie classi di composti analizzati con i relativi intervalli di confidenza

3.2.2 *n-alcani*

Tabella 3.33 - n-alcani nei campioni

Anni (cal BP)	-33	229	741	1127	1977	4613	6050	7270	
Profondità (cm)	12,8	40,5	64,5	77,7	91,8	113,1	167,3	226,1	
	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	± (%)
C_{10}	53	32	3	1	2	3	<MDL	4	20
C_{11}	202	4	2	<MDL	1	1	<MDL	1	23
C_{12}	8	5	4	1	1	1	<MDL	2	14
C_{13}	8	4	2	1	<MDL	1	<MDL	1	30
C_{14}	14	9	15	1	1	1	<MDL	7	17
C_{15}	160	15	27	0	2	20	<MDL	15	30
C_{16}	26	27	28	3	3	2	2	12	20
C_{17}	35	78	2	<MDL	<MDL	1	2	1	30
C_{18}	48	36	36	3	5	4	5	15	13
C_{19}	12	0	5	1	<MDL	1	11	1	33
C_{20}	28	27	33	3	4	3	7	15	17
C_{21}	2	1	27	1	3	<MDL	19	2	33
C_{22}	35	19	43	4	11	5	17	17	15
C_{23}	5	12	50	9	31	6	48	19	21
C_{24}	24	12	42	6	21	6	25	16	22
C_{25}	14	24	63	20	41	18	54	25	16
C_{26}	8	8	52	14	25	9	30	14	16
C_{27}	17	30	120	48	57	40	75	26	19
C_{28}	9	9	44	12	21	13	33	13	33
C_{29}	35	46	98	43	44	37	80	32	28
C_{30}	11	5	25	8	15	7	21	9	19
C_{31}	131	102	75	29	46	37	78	38	28
C_{32}	13	3	15	5	9	5	13	5	17
C_{33}	138	37	37	16	24	19	56	21	18
C_{34}	5	1	5	2	2	1	3	2	9
C_{35}	9	1	8	8	6	4	13	9	11
TOT na	13598	8883	19165	6384	9844	5960	15777	6919	21

Facendo riferimento ai parametri riportati nel capitolo introduttivo, si nota che:

Il **CPI** è maggiore di 1 in tutte le sezioni di carota analizzate, segno che l'input degli n-alcani è naturale. I valori di CPI sono compresi tra 4.4 e 2.1, in linea generale il CPI è più alto nelle sezioni più recenti della carota e tende a diminuire leggermente, anche se in maniera non costante, nelle sezioni più profonde, segno probabilmente di una lieve degradazione degli analiti.

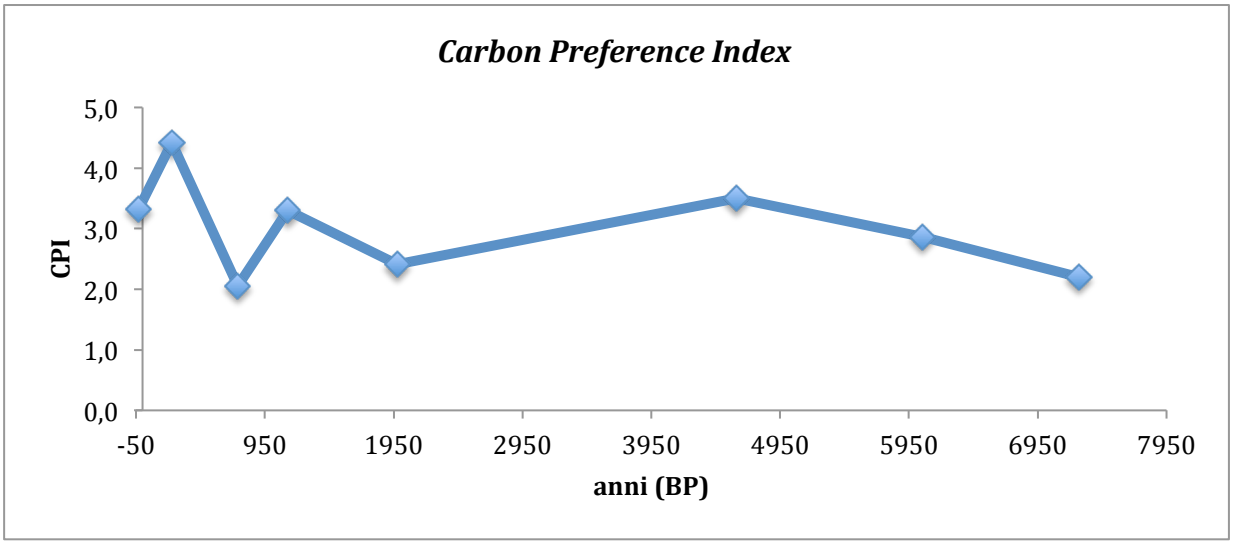

Figura 3.26 - Andamento del CPI nel tempo

La lunghezza media ponderata di catena (**ACL**) non varia di molto in tutta la carota, rimanendo compresa tra 30 e 27, indice del fatto che l'input principale è da attribuirsi a piante terrestri in tutto l'arco temporale considerato.

È interessante notare come tra i 7270 anni BP e i 1127 anni BP il valore di ACL oscilli tra 28 e 29, a causa probabilmente di un equilibrio tra alberi, che producono principalmente C_{27} e C_{29}, e specie erbacee, che producono principalmente C_{31}. A 741 anni BP si nota un minimo con l'ACL che scende a 27, interpretabile come un aumento degli alberi nei confronti delle erbe, per poi aumentare bruscamente a 229 anni BP (ACL = 29) e in maniera ancora più consistente a -33 anni BP (ACL = 30), indicando probabilmente un consistente calo degli alberi ed un forte aumento delle specie erbacee.

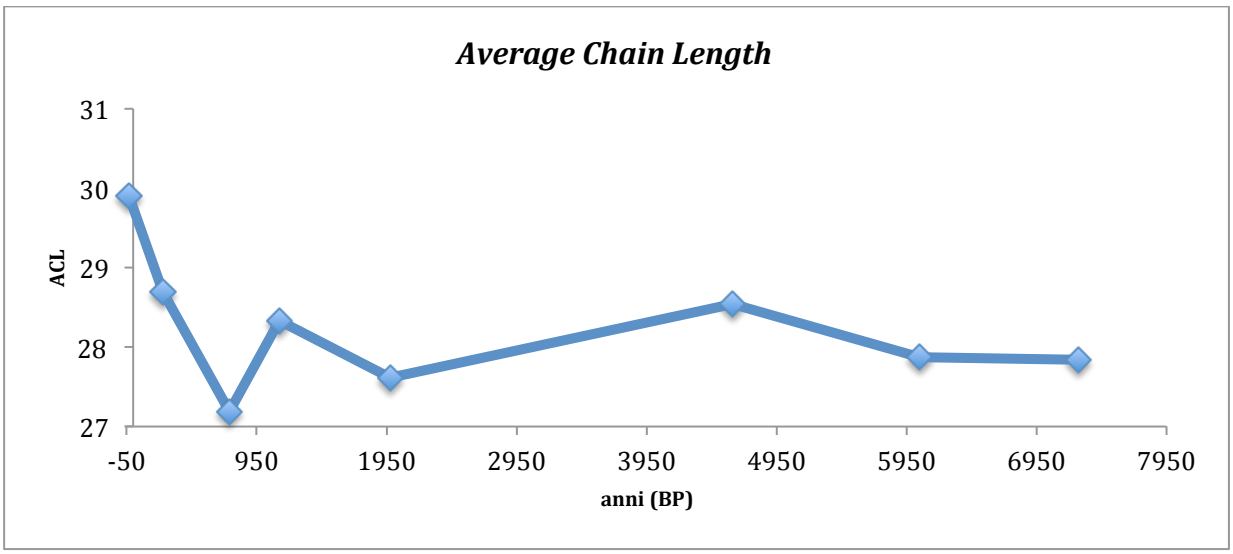

Figura 3.27 - Andamento dell'ACL nel tempo

Per mettere in evidenza il passaggio dalle specie arboree alle specie erbacee è utile rapportare gli alcani prodotti dai primi (C_{25}, C_{27}, C_{29}) a quelli prodotti dalle seconde (C_{29}, C_{31}), come fatto da d'Anjou et al. [17].

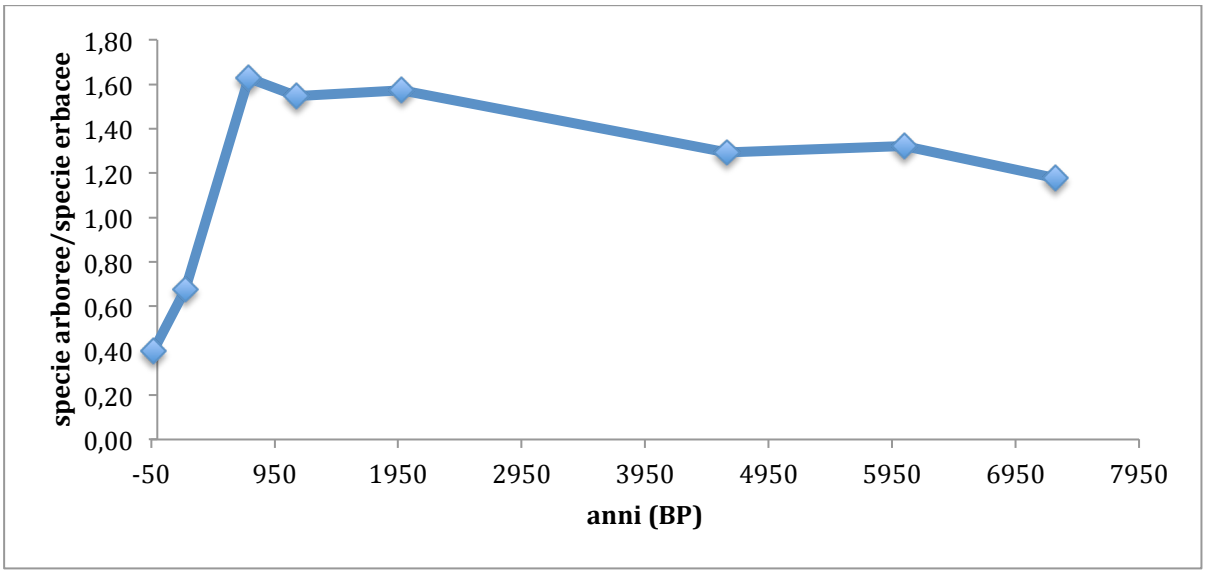

Figura 3.28 - Andamento del rapporto specie arboree/specie erbacee nel tempo

Si nota come da un rapporto in lieve crescita nel tempo fino a 741 anni BP segua un forte calo;

anche con questo parametro quindi, come con l'ACL, sembra emergere un passaggio tra la prevalenza delle specie arboree a quella delle specie erbacee.

3.2.3 *Idrocarburi Policiclici Aromatici*

Tabella 3.34 – IPA nei campioni

Anni (cal BP) Profondità (cm)	-33 12,8	229 40,5	741 64,5	1127 77,7	1977 91,8	4613 113,1	6050 167,3	7270 226,1	
	ng $y^{-1}cm^{-2}$	ng $y^{-1}cm^{-2}$	ng $y^{-1}cm^{-2}$	ng $y^{-1}cm^{-2}$	ng $y^{-1}cm^{-2}$	ng $y^{-1}cm^{-2}$	ng y^{-1} m^{-2}	ng $y^{-1}cm^{-2}$	± (%)
Naftalene	3.2	0.5	1.6	0.2	0.2	0.5	0.4	0.6	10
Acenaftilene	0.5	<MDL	0.2	<MDL	<MDL	0.1	0.1	0.1	8
Acenaftene	nd	<MDL	<MDL	0.1	0.1	0.1	<MDL	0.1	16
Fluorene	0.4	0.1	0.1	<MDL	0.1	0.2	0.1	0.1	2
Fenantrene	2.4	1.1	0.3	0.4	0.3	0.4	0.1	0.3	5
Antracene	0.2	0.4	nd	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	0
Fluorantene	0.4	0.1	nd	nd	nd	<MDL	nd	nd	16
Pirene	0.3	nd	nd	nd	0.1	0.1	nd	nd	24
Benzo(a)Antracene	nd	nd	<MDL	nd	nd	nd	<MDL	nd	2
Crisene	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21
Retene	0.1	0.8	35.9	0.9	0.2	0.1	0.9	0.2	27
Benzo(b)Fluorantene	0.1	<MDL	<MDL	nd	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	0
Benzo(k)Fluorantene	0.1	<MDL	<MDL	nd	0.1	<MDL	<MDL	<MDL	0
Benzo(a)Pirene	0.4	nd	0.1	nd	<MDL	<MDL	nd	<MDL	10
Benzo(ghi)Perilene	0.7	nd	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	0.1	<MDL	0
Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	2.3	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	15
Dibenzo(A,H)Antracene	nd	nd	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	0
tot IPA	11.1	3.1	38.2	1.8	1.1	1.7	1.8	1.5	16

L'andamento delle quantità dei singoli IPA nel tempo, così come i loro rapporti diagnostici, non forniscono informazioni rilevanti, fatta eccezione per l'andamento del retene. Nonostante si sia appurato che il metodo tende a sovrastimarne la quantità, infatti, il suo andamento nel tempo si mostra particolarmente interessante: da 7270 anni BP a 1977 anni BP la sua quantità varia di poco oscillando attorno agli 0.2 ng y^{-1} cm^{-2}, a 1127 anni BP si nota un aumento della quantità (0.9 ng y^{-1} cm^{-2}) che arriva ad un massimo (35.9 ng y^{-1} cm^{-2}) a 741 anni BP, per poi calare nelle sezioni di carota successive.

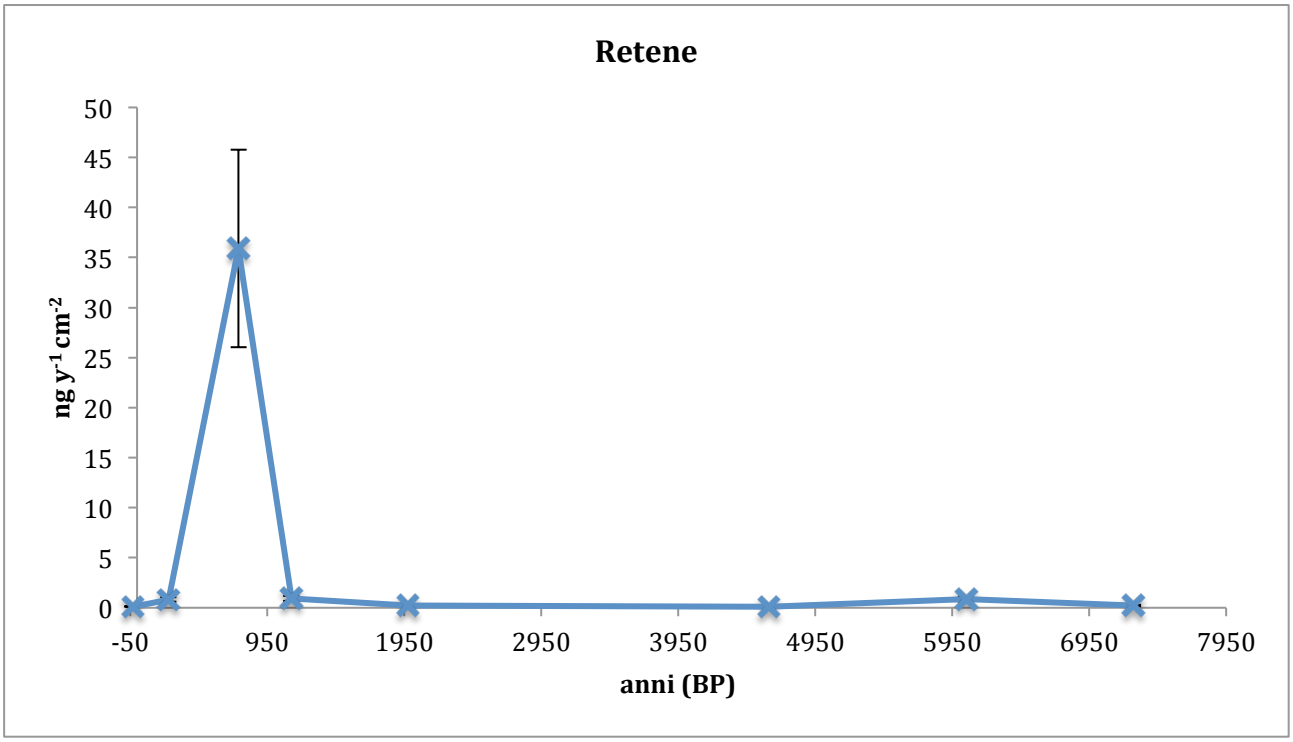

Figura 3.29 - Andamento del retene nel tempo

Confrontando il dato con quelli degli alcani si nota come il picco di retene (741 anni BP), tracciante di combustione delle conifere, corrisponda al massimo degli alcani generati dagli alberi e il successivo calo nella quantità di retene coincida con il brusco calo negli alcani prodotti dagli alberi a favore di quelli prodotti con le specie erbacee.

I dati ottenuti fanno quindi pensare che il brusco cambiamento nella vegetazione da specie boschive a specie erbacee possa essere attribuito ad incendi.

3.2.4 Acidi n-alcanoici

Tabella 3.35 – Acidi n-alcanoici nei campioni

Anni (cal BP) Profondità (cm)	-33 12,8 ng y^{-1} cm^{-2}	229 40,5 ng y^{-1} cm^{-2}	741 64,5 ng y^{-1} cm^{-2}	1127 77,7 ng y^{-1} cm^{-2}	1977 91,8 ng y^{-1} cm^{-2}	4613 113,1 ng y^{-1} cm^{-2}	6050 167,3 ng y^{-1} cm^{-2}	7270 226,1 ng y^{-1} cm^{-2}	± (%)
C_{11}	13	7	1	1	1	<MDL	<MDL	3	55
C_{12}	44	52	33	6	1	1	<MDL	11	25
C_{13}	8	13	5	2	1	1	3	7	56
C_{14}	172	43	20	17	7	4	<MDL	21	75
C_{17}	90	6	4	5	7	4	5	29	38
C_{19}	48	12	11	7	14	9	11	98	65
C_{20}	909	111	194	66	81	37	129	180	51
C_{21}	127	33	86	24	32	19	44	106	81
C_{22}	965	405	686	225	271	160	440	371	62
C_{23}	370	172	365	141	179	106	255	229	78
C_{24}	1402	596	996	428	584	383	873	922	85
tot acidi alcanoici	4149	1450	2401	924	1178	723	1761	1976	61

Il metodo sviluppato non è abbastanza affidabile per valutare l'andamento degli acidi alcanoici nel tempo, tuttavia, nonostante l'elevato errore percentuale, possono essere fatte alcune considerazioni qualitative:

- Le catene a numero pari di carbonio prevalgono su quelle a numero dispari, a riprova dell'input naturale nella torbiera in esame.
- Gli acidi alcanoici presenti in maggior quantità sono il C_{24} e il C_{22}, dato comune in diverse analisi che si possono trovare in letteratura. Va fatto notare però che spesso è riportata una distribuzione bimodale degli acidi n-alcanoici in cui, oltre a una prevalenza di una o due lunghezze di catena superiori a C_{22}, vengono indicati come acidi predominanti anche il C_{16} e il C_{18} [18, 97, 107, 108]. La spiegazione più logica e spesso indicata negli articoli è l'input da parte di batteri in cui, come già scritto, questi due composti sono alla base del metabolismo degli acidi grassi. L'analisi di questi due composti, i cui dati non sono riportati a causa dell'errore troppo elevato, ha dato risultati ben al di sotto del limite di rivelabilità della metodica e, in considerazione del fatto che molto spesso le metodiche utilizzate nelle analisi (così come MDL ed errori) non sono riportate negli articoli o sono riportate solo parzialmente, una più accurata verifica dell'attendibilità di questi dati potrebbe rivelarsi utile.

- Le quantità di acidi n-alcanoici presenti nel sedimento sono paragonabili alle quantità degli altri composti derivanti da vegetali presi in esame (fanno eccezione gli IPA che derivano principalmente dalla combustione), oscillando tra un minimo di 0.9 ± 0.6 μg y^{-1} cm^{-2} e un massimo di 4.1 ± 2.5 μg y^{-1} cm^{-2}. Data la notevole velocità di degradazione (in confronto ad n-alcani e steroli vegetali) riportata generalmente per questo tipo di composti il dato può indicare che la degradazione degli acidi n-alcanoici non è particolarmente significativa nella torbiera in esame, oppure che l'input di questi composti èpiù elevato rispetto a quello delle altre classi di analiti presi in esame.

Di seguito viene riportata la distribuzione degli acidi alcanoici all'interno di un campione come esempio.

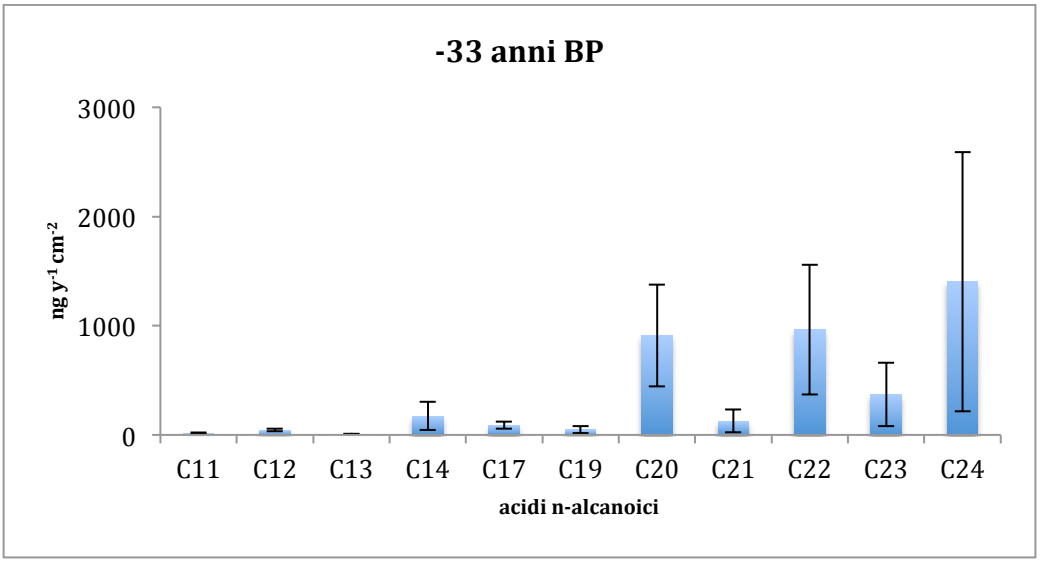

Figura 3.30 - Distribuzione delle lunghezze di catena nel campione datato -33 anni BP

3.2.5 *Steroli e stanoli*

Tabella 3.36 - Steroli e stanoli fecali nei campioni

Anni (cal BP) Profondità (cm)	-33 12,8	229 40,5	741 64,5	1127 77,7	1977 91,8	4613 113,1	6050 167,3	7270 226,1	
	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	ng y^{-1} cm^{-2}	± (%)
coprostanolo	11	1	3	33	17	<MDL	<MDL	1	19
epicoprostanolo	1	7	175	11	4	25	83	48	15
colesterolo	164	8	101	64	27	7	56	12	5
colestanolo	22	6	348	146	128	24	5	44	6
betasitosterolo	4438	674	6915	1433	1620	541	4825	584	5
stigmastanolo	493	222	911	442	834	592	1540	859	6
tot steroli e stanoli	5128	918	8452	2128	2630	1189	6508	1548	9

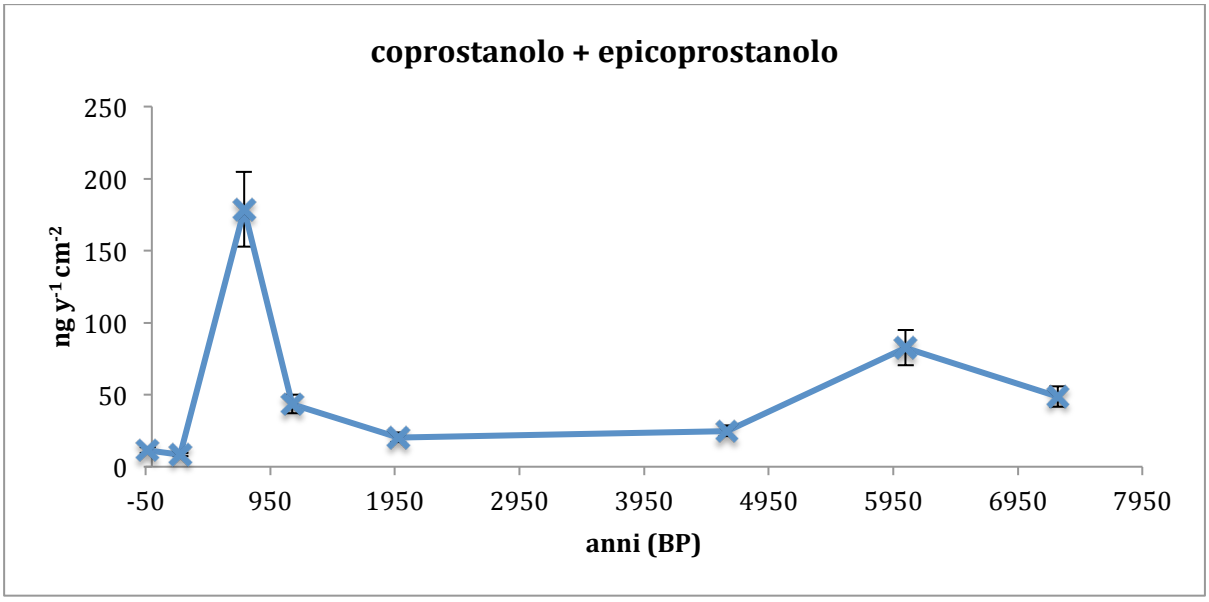

Figura 3.31 - Andamento della somma di coprostanolo e epicoprostanolo nel tempo

La somma di coprostanolo e epicoprostanolo mostra un andamento interessante, con un picco non particolarmente rilevante a 6050 anni BP e un picco più marcato a 741 anni BP. I due stanoli sono uno il prodotto di degradazione dell'altro e derivano principalmente dalle feci umane, il picco a 741 anni BP potrebbe quindi indicare la presenza umana nel territorio circostante la torbiera.

3.2.6 Interpretazione dei dati

Partendo dal presupposto che i dati raccolti sono pochi per poter avanzare ipotesi attendibili (8 punti distribuiti nell'arco di 7303 anni) la lettura di essi in un'ottica paleoclimatica ha il duplice scopo di fornire un esempio sul come la metodica sviluppata possa essere applicata e di verificare la corrispondenza tra dati ottenuti, ricostruzioni con *proxy* differenti e documenti storici.

I dati pollinici indicano che la vegetazione della zona era composta principalmente da gimnosperme come pini e abeti e da alcune angiosperme, principalmente faggi, vicini al loro limite massimo di altitudine. Nei primi secoli del secondo millennio d.C. si può notare un aumento delle foreste intorno all'XI secolo d.C. e un successivo calo della vegetazione boschiva, seguito da un rimboschimento fino ai giorni nostri in cui il faggio risulta però molto meno frequente. Dal punto di vista degli incendi non si notano invece particolari eventi che possano aver avuto un ruolo significativo nei cambiamenti della vegetazione [106].

Per quanto riguarda i dati storici, alcuni ritrovamenti di necropoli fanno ipotizzare che la zona del Cadore fosse abitata già 1000 anni a.C..
Nella vallata del Comelico, zona in cui è presente la torbiera, il primo dato interessante in ordine cronologico è la presenza nel comune di San Nicolò di Comelico (fondato in epoca alto medievale [109]) delle infrastrutture necessarie alla lavorazione dei minerali di ferro e rame estratti nelle miniere della zona, principalmente per uso locale. Il primo documento, risalente all'anno 1199 d.C., testimonia che tutto il materiale estratto dalle vicine miniere di Ferrera confluiva per comodità di dislocazione in località Gera di San Nicolò, ubicata sul fondovalle in prossimità del torrente Padola [109] (segnaposto 2 fig 3.32).
Sempre dai documenti storici si è a conoscenza del fatto che in Europa i primi altiforni alimentati a coke per la lavorazione dei minerali di ferro furono costruiti nel XVI secolo d.C.. Prima di questa data i minerali erano fusi in altiforni (a partire dal XV secolo d.C.) o in forni più piccoli chiamati *bloomery*e in entrambi i casi l'alimentazione era a base di carbone vegetale [110].
La Repubblica di Venezia estese il suo dominio nelle zone del Cadore nell'anno 1420 d.C. e ne mantenne il controllo fino all'anno 1797, in cui passarono sotto il controllo

Napoleonico. Un dato estremamente interessante dell'epoca riguarda la vendita di una "stua" sul torrente Padola (segnaposto 1 fig 3.32), che scorre sul fondo della valle del Comelico, nel 1521 [111]. Le stue erano delle dighe artificiali costruite con lo scopo di creare dei bacini che facessero scendere violentemente l'acqua fino a valle per trasportare i tronchi che in questo specifico caso confluivano nel Piave e venivano trasportati fino a Venezia e utilizzati per la costruzione delle imbarcazioni nell'Arsenale. La stua, costruita originariamente in legno, fu ricostruita in pietra nel 1818, facendo supporre che il commercio di legname fosse ancora attivo in quegli anni.

I documenti storici quindi fanno intendere che, almeno a partire dal 1200 d.C., il legname costituisse un elemento chiave per l'economia della zona, prima per la produzione del carbone necessario per alimentare le fornaci per la lavorazione dei metalli e successivamente come materia prima per l'Arsenale di Venezia.

Figura 3.32 - Mappa delle valli circostanti la torbiera di Coltrondo

I dati ottenuti con l'analisi degli alcani suggeriscono un cambiamento della vegetazione da specie arboree a specie erbacee nell'arco di tempo compreso tra il 1200 d.C. e il 1720 d.C. circa e un andamento simile si può riscontrare con l'analisi pollinica. Entrambi i *proxy* sembrano quindi testimoniare lo sfruttamento del legname in quel periodo, coerentemente ai documenti storici.

Fatto molto rilevante da tenere in considerazione è che, mentre i dati riguardanti la vegetazione del passato ottenuti con la distribuzione degli n-alcani sembrano coincidere

con i dati ottenuti dall'analisi pollinica, la vegetazione attuale nella zona della torbiera è caratterizzata principalmente da specie appartenenti al genere *Picea* (pecci) e non da specie erbacee come si potrebbe dedurre dalla distribuzione degli alcani. I dati pollinici oltretutto indicano che, nonostante l'intenso sfruttamento del legname verso la metà del II millennio d.C., la zona non è mai stata completamente disboscata come invece si potrebbe dedurre dalla distribuzione degli n-alcani. Considerazioni simili si possono trarre anche dal fatto che la stua di Padola sia rimasta attiva per il commercio di legname anche successivamente al 1700 d.C..

Va ricordato però che, come già riportato in precedenza, a produrre n-alcani sono principalmente le angiosperme, mentre le gimnosperme hanno una produzione molto più ridotta. I pecci che caratterizzano la vegetazione attuale sono gimnosperme, quindi il loro input di alcani risulta molto inferiore rispetto alle specie erbacee appartenenti alle gimnosperme. A dare l'input di n-alcani nel passato era probabilmente il faggio, unica angiosperma presente nella zona, che però non è ricomparso con il rimboschimento che ha portato all'attuale vegetazione; l'input maggiore di n-alcani è quindi rimasto probabilmente quello delle specie erbacee, nonostante la presenza di foreste.

Le deduzioni che si potrebbero trarre osservando solo gli n-alcani risulterebbero quindi parziali e potenzialmente fuorvianti se non si dispone del confronto con un'analisi pollinica che determini le classi di appartenenza della vegetazione in esame, evidenziando l'importanza di un approccio multi-*proxy*.

L'andamento del retene mostra un aumento della quantità di questo IPA intorno all'823 d.C., quindi in epoca alto medievale, e un picco a 1200 anni a.C., periodo in cui è testimoniata la presenza di fornaci alimentate presumibilmente con carbone vegetale per la lavorazione dei metalli che potenzialmente potrebbero essere la fonte primaria di retene, in considerazione del fatto che l'analisi pollinica non segnala nessun incendio naturale rilevante nella zona. Come l'aumento della quantità del retene potrebbe essere imputabile alle lavorazioni dei metalli in zona, il suo calo intorno al 1700 d.C. potrebbe essere imputabile all'esaurimento delle miniere, al loro abbandono, oppure al fatto che la lavorazione dei minerali non venisse fatta più in loco.

Infine il picco di steroli fecali umani nella torbiera attorno al 1200 d.C. potrebbe essere causato dalle attività umane nella zona.

Va fatto notare però che la torbiera in esame, essendo uno sfagneto, viene alimentata solamente dalle precipitazioni che cadono direttamente sulla zona occupata dalla torba. Gli IPA, derivando da combustioni, possono essere trasportati per via aerea e gli n-alcani possono giungere alla torbiera trasportati dal vento, possono essere dilavati dalle foglie di alberi a monte della torbiera o possono essere trasportati direttamente dalle foglie che cadono durante l'autunno. Gli steroli fecali invece, non potendo giungere alla torbiera trasportati da acque correnti, necessitano che l'input fecale sia direttamente sopra la torbiera, fatto rilevante e da tenere in considerazione quando si interpretano i dati di questi analiti.

I biomarker molecolari per i quali la metodica è stata sviluppata sembrano quindi trovare complessivamente riscontro in risultati ottenuti con metodiche differenti, suggerendo quindi che l'approccio qui proposto può essere applicato in ricostruzioni paleoclimatiche che mirino a determinare come la vegetazione attorno alle torbiere cambia nel tempo, se si sono verificati incendi nelle zone adiacenti e se questi eventi possono essere ricondotti a cause naturali o antropogeniche.

4 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata messa a punto una metodica multianalitica che permette l'analisi di n-alcani, IPA, acidi n-alcanoici, steroli e stanoli per ricostruzioni paleoclimatiche da campioni di torba.

Gli n-alcani e gli acidi n-alcanoici forniscono informazioni sulla tipologia e sui cambiamenti della vegetazione nelle zone limitrofe alle torbiere, consentendo di distinguere l'input delle alghe, quello degli sfagni e quello delle piante terrestri. Tra le piante terrestri è stato dimostrato che, con le dovute cautele, è possibile discriminare l'input di specie arboree e quello di specie erbacee, purché si tratti di specie appartenenti alla classe delle angiosperme. L'analisi di questi composti permette inoltre di stimare il grado di degradazione degli stessi tramite il loro *carbon preference index* e, sempre grazie a questo parametro, è possibile formulare ipotesi sull'input naturale o antropogenico degli idrocarburi presenti nella torbiera e individuare l'eventuale inquinamento derivante da sversamenti di petrolio o derivati.

Gli IPA forniscono informazioni sugli incendi avvenuti nelle zone limitrofe alle torbiere e permettono di avanzare ipotesi sulla natura di tali incendi e sul tipo di combustibile tramite rapporti diagnostici tra diverse molecole o tramite le variazioni della quantità di singole molecole specifiche nel tempo, che variano in base alle condizioni in cui gli incendi si verificano.

Gli steroli e gli stanoli permettono di avanzare ipotesi sulla presenza umana e animale valutando l'input fecale che arriva direttamente sopra la torbiera, consentendo potenzialmente di correlare le altre informazioni a disposizione con la presenza umana.

Le informazioni ricavate dall'approccio multi-*proxy* sono quindi numerose, anche se l'analisi simultanea di quattro diverse classi di composti ha richiesto un notevole sforzo in fase di messa a punto della metodica, specialmente per quel che riguarda la determinazione di una procedura di purificazione che consentisse di separare i diversi analiti per poter svolgere la successiva analisi gascromatografica nelle condizioni ideali per ognuno.

Per permettere l'analisi delle quattro classi di composti a partire da un singolo campione di torba la metodica sviluppata prevede un'unica estrazione comune per tutti gli analiti, seguita da una purificazione che consenta di ridurre le interferenze e separare gli analiti in due frazioni che vengono trattate diversamente in base alle caratteristiche specifiche delle molecole contenute. L'ultima fase della metodica è quella più specifica, prevedendo quattro differenti tipologie di analisi gascromatografiche, una per ognuna delle classi di analiti in esame, a partire dalle due diverse frazioni purificate che derivano a loro volta da un unico estratto.
La bontà del dato analiticocosì ottenuto è stata provata mediante la determinazione dei bianchi, dei limiti rivelabilità strumentale e metodici e mediante la valutazione della precisione e dell'accuratezza dell'analisi di ognuno deisessantuno analiti presi in esame.

L'attendibilità di ricostruzioni paleoclimatiche basate sui *biomarker* per i quali la metodica è stata sviluppata è stata verificata mediante l'analisi di campioni reali provenienti da una torbiera alpina. Il confronto con *proxy* differenti quali i pollini e con documenti storici sulla zona circostante la torbiera ha permesso di evidenziare i punti di forza e le lacune di questo approccio paleoclimatico e di fornire un modello di come questa metodica può essere utilizzata per ricostruzioni future basate sui *biomarker* analizzati e su quale tipo di informazioni possano essere ottenute.

Si può quindi affermare che gli obiettivi iniziali siano stati raggiunti: la metodica mutianalitica è stata sviluppata e validata, i dati ottenuti dai campioni di torba hanno mostrato la bontà dell'utilizzo dei composti in quanto *biomarker* ed è stato mostrato come le molecole studiate possano essere applicate in ricostruzioni paleoclimatiche multi-*proxy*.

5 APPENDICE

Gli acidi n-alcanoici solidi sono stati sciolti in toluene (che si è rivelato essere il miglior solvente) e diluiti successivamente in diclorometano a 50 ng μL^{-1} per effettuare le prove della metodica: di seguito vengono riportate le pesate e le diluizioni.

Tabella 5.1 - Preparazione soluzioni acidi n-alcanoici

miscela acidi n-alcanoici			
	mg pesati	soluzione madre [mg mL^{-1}] in toluene	soluzione standard [ng μL^{-1}] in diclorometano
C_{11}	10.1	1.01	50.5
C_{12}	14.4	1.44	72.0
C_{13}	10.6	1.06	53.0
C_{14}	11.0	1.10	55.0
C_{15}	10.6	1.06	53.0
C_{16}	10.1	1.01	50.5
C_{17}	9.9	0.99	49.5
C_{18}	11.2	1.12	56.0
C_{19}	10.1	1.01	50.5
C_{20}	11.7	1.17	58.5
C_{21}	10.0	1.00	50.0
C_{22}	10.3	1.03	51.5
C_{23}	10.3	1.03	51.5
C_{24}	9.9	0.99	49.5
$^{13}C_{18}$	10.0	1.00	50.0

Condizioni strumentali per GC-MS:

Tabella 5.2 - Condizioni strumentali per l'analisi degli n-alcani in GC-MS

OVEN		Thermal Aux 2 {MSD Transfer Line}	
Equilibration time	1min	Heater	On
Oven program	On	Temperature Program	On
50°C for 5 min then 18°C/min to 315°C for 20 min		300 °C for 0 min	
Run time	39.772 min	Run time	39.772 min
15 min (Post Run)	315°C	325°C: 60 m x 25 um x 0.25 um In: Front SS Inlet He Out: Vacuum	

Front SS Inlet He	
Mode	Splitless
Heater	On 300 °C
Pressure	On 19.926 psi
Total Flow	On 53.2 mL/min
Septum Purge Flow	On 2 mL/min
	On 20 mL/min After
Gas Saver	20 min
Purge Flow to Split Vent	50 mL/min at 1 min

(Initial)	50 °C
Pressure	19.926 psi
Flow	1.2 mL/min
Average Velocity	28.23 cm/sec
Holdup Time	3.5423 min
Flow Program	On
1.2 mL/min for 0 min	
Run time	39.722 min
15 min (Post Run	0.92041 mL/min
	: 230 °C maximum
MS Source	250 °C
	: 150 °C maximum
MS Quad	200 °C
Solvent Delay:	11.00 min

Tabella 5.3 - Ioni misurati in modalità SIM per gli n-alcani

Finestra unica	
Ion:	71
	85
	99
	113

Tabella 5.4 - Condizioni strumentali per l'analisi degli IPA in GC-MS

OVEN	
Equilibration time	1min
Oven program	On
70°C for 1.5 min	
then 10°C/min to 105°C	
for 10 min	
then 3°C/min to 300°C for	
15 min	
Run time	84.5 min
15 min (Post Run)	305°C

Front SS Inlet He	
Mode	Splitless
Heater	On 300 °C
Pressure	On 18.544 psi
Total Flow	On 51 mL/min
Septum Purge Flow	Off
Gas Saver	On 20 mL/min After

Thermal Aux 2 {MSD Transfer Line}	
Heater	On
Temperature Program	On
300 °C for 0 min	
Run time	84.5 min
325°C: 60 m x 25 um x	
0.25 um	
In: Front SS Inlet He	
Out: Vacuum	
(Initial)	70 °C
Pressure	18.544 psi
Flow	1 mL/min
Average Velocity	26.019 cm/sec
Holdup Time	3.8533 min
Flow Program	On
1.0 mL/min for 0 min	
Run time	84.5 min

	20 min
Purge Flow to Split Vent	50 mL/min at 1.5 min

30 min (Post Run)	0.92041 mL/min
	: 230 °C maximum
MS Source	250 °C
	: 150 °C maximum
MS Quad	200 °C
Solvent Delay:	10.00 min

Tabella 5.5 – Ioni misurati in modalità SIM per gli IPA

Finestra 1	Finestra 2	Finestra 3	Finestra 4
	Group start time: 18.00	Group start time: 24.00	Group start time: 30.00
Ion: 128	Ion: 152	Ion: 166	Ion: 178
	154		184
	158		
Finestra 5	**Finestra 6**	**Finestra 7**	**Finestra 7**
Group start time: 40.00	Group start time: 49.50	Group start time: 61.00	Group start time: 70.00
Ion: 202	Ion: 228	Ion: 252	Ion: 276
234	234	256	278
	235		

Tabella 5.6 - Condizioni strumentali per l'analisi degli acidi n-alcanoici in GC-MS

OVEN	
Equilibration time	1min
Oven program	On
100°C for 3 min	
then 10°C/min to 180°C	
for 0 min	
then 5°C/min to 300°C	
for 5 min	
Run time	40 min
15 min (Post Run)	305°C
Front SS Inlet He	
Mode	Splitless
Heater	On 300 °C
Pressure	On 21.717 psi
Total Flow	On 51.2 mL/min
Septum Purge Flow	Off
	On 20 mL/min After
Gas Saver	20 min
Purge Flow to Split Vent	50 mL/min at 2 min

Thermal Aux 2 {MSD Transfer Line}	
Heater	On
Temperature Program	On
300 °C for 0 min	
Run time	40 min
325°C: 60 m x 25 um x	
0.25 um	
In: Front SS Inlet He	
Out: Vacuum	
(Initial)	50 °C
Pressure	19.926 psi
Flow	1.2 mL/min
Average Velocity	28.23 cm/sec
Holdup Time	3.5423 min
Flow Program	On
1.2 mL/min for 0 min	
Run time	40 min
15 min (Post Run)	0.92041 mL/min
MS Source	: 230 °C maximum

	250 °C
	: 150 °C maximum
MS Quad	200 °C
Solvent Delay:	12.00 min

Tabella 5.7 - Ioni misurati in modalità SIM per gli acidi n-alcanoici

Finestra 1		Finestra 2		Finestra 3		Finestra 4	
		Group start time:	18.00	Group start time:	24.00	Group start time:	30.00
Ion:	117	Ion:	117	Ion:	117	Ion:	117
	243		299		355		411
	257		313		369		425
	271		327		383		
	285		341		397		
			359				

Tabella 5.8 - Condizioni strumentali per l'analisi degli steroli e stanoli in GC-MS

OVEN	
Equilibration time	1min
Oven program	On
150°C for 1 min	
then 30°C/min to 220°C	
for 0 min	
then 2°C/min to 300°C	
for 10 min	
Run time	53.333 min
15 min (Post Run)	315°C

Front SS Inlet He	
Mode	Splitless
Heater	On 280 °C
Pressure	On 21.77 psi
Total Flow	On 51 mL/min
Septum Purge Flow	Off
	On 15 mL/min After
Gas Saver	14 min
	50 mL/min at 1.5
Purge Flow to Split Vent	min

Thermal Aux 2 {MSD Transfer Line}	
Heater	On
Temperature Program	On
300 °C for 0 min	
Run time	53.333 min
325°C: 60 m x 25 um x	
0.25 um	
In: Front SS Inlet He	
Out: Vacuum	
(Initial)	150 °C
Pressure	19.942 psi
Flow	1 mL/min
Average Velocity	26.906 cm/sec
Holdup Time	3.7166 min
Flow Program	On
1.2 mL/min for 0 min	
Run time	40 min
15 min (Post Run)	53.333 min
	: 230 °C maximum
MS Source	250 °C
	: 150 °C maximum
MS Quad	200 °C
Solvent Delay:	9.50 min

Tabella 5.9 - Ioni misurati in modalità SIM per steroli e stanoli

Finestra 1	Finestra 2	Finestra 3
	Group start time: 18.00	Group start time: 24.00
Ion: 215	Ion: 332	Ion: 215
257	353	396
355	355	473
370	368	486
371	370	488
	371	
	460	

Tabella 5.10 - Rette di taratura degli n-alcani

C_n/C_{is}	0,1		0,5		1		5		6	
	A/A	DEV ST	A/A	DEV ST	A/A	DEV ST	A/A	DEV ST	A/A	DEV ST
C_{10}	0.171	0.006	0.666	0.019	1.269	0.015	2.742	0.116	2.806	0.087
C_{11}	0.129	0.004	0.623	0.014	1.234	0.019	2.672	0.105	2.732	0.061
C_{12}	0.161	0.005	0.766	0.021	1.525	0.022	3.185	0.124	3.251	0.064
C_{13}	0.218	0.008	1.033	0.024	2.047	0.025	4.137	0.159	4.209	0.068
C_{14}	0.303	0.011	1.422	0.042	2.805	0.043	5.569	0.214	5.660	0.114
C_{15}	0.385	0.013	1.827	0.056	3.606	0.063	7.140	0.255	7.253	0.133
C_{16}	0.464	0.015	2.206	0.061	4.372	0.074	8.615	0.293	8.722	0.129
C_{17}	0.500	0.016	2.451	0.077	4.868	0.078	9.719	0.322	9.881	0.168
C_{18}	0.550	0.017	2.662	0.081	5.333	0.102	10.688	0.328	10.831	0.121
C_{19}	0.541	0.019	2.753	0.084	5.625	0.115	11.426	0.402	11.552	0.106
C_{20}	0.586	0.017	2.988	0.106	6.175	0.142	12.633	0.378	12.782	0.116
C_{21}	0.515	0.015	2.644	0.109	5.660	0.197	12.259	0.322	12.461	0.100
C_{22}	0.532	0.022	2.599	0.073	5.348	0.163	12.267	0.245	12.655	0.123
C_{23}	0.471	0.015	2.426	0.069	5.121	0.101	12.148	0.191	12.711	0.081
C_{24}	0.492	0.015	2.431	0.053	5.080	0.144	12.033	0.214	12.715	0.044
C_{25}	0.440	0.012	2.240	0.049	4.846	0.139	11.930	0.174	12.760	0.005
C_{26}	0.413	0.011	2.137	0.054	4.709	0.125	11.847	0.173	12.773	0.031
C_{27}	0.369	0.011	1.937	0.037	4.360	0.108	11.299	0.152	12.369	0.153
C_{28}	0.399	0.010	1.846	0.048	4.203	0.098	10.954	0.227	12.065	0.088
C_{29}	0.404	0.006	2.021	0.048	4.657	0.112	12.057	0.287	13.263	0.107
C_{30}	0.336	0.007	1.903	0.032	4.559	0.114	12.536	0.256	13.762	0.096
C_{31}	0.298	0.007	1.793	0.034	4.388	0.109	12.578	0.303	13.894	0.058
C_{32}	0.268	0.002	1.690	0.020	4.233	0.107	12.747	0.304	14.180	0.052
C_{33}	0.238	0.003	1.529	0.013	3.982	0.087	12.653	0.313	14.168	0.070
C_{34}	0.222	0.001	1.341	0.007	3.642	0.096	12.267	0.298	13.822	0.002
C_{35}	0.212	0.011	0.995	0.014	2.785	0.064	10.367	0.235	11.749	0.032

Tabella 5.11 - Rette di taratura degli acidi n-alcanoici

	punto 1			punto 2			punto 3			punto 4			punto 5		
	C_n/C_{is}	A_n/A_{SI}	dev st	C_n/C_{is}	A_n/A_{SI}	dev st	C_n/C_{is}	A_n/A_{SI}	dev st	C_n/C_{is}	A_n/A_{SI}	dev st	C_n/C_{is}	A_n/A_{SI}	dev st
C_{11}	0.10	0.154	0.032	0.51	0.601	0.043	1.01	1.200	0.078	1.52	1.907	0.135	2.02	2.697	0.109
C_{12}	0.14	0.215	0.045	0.72	0.798	0.070	1.44	1.560	0.134	2.16	2.507	0.230	2.88	3.542	0.149
C_{13}	0.11	0.129	0.026	0.53	0.516	0.041	1.06	1.040	0.088	1.59	1.673	0.150	2.12	2.380	0.117
C_{14}	0.11	0.137	0.023	0.55	0.561	0.059	1.10	1.049	0.117	1.65	1.705	0.153	2.20	2.355	0.106
C_{15}	0.11	0.160	0.023	0.53	0.670	0.046	1.06	1.339	0.092	1.59	2.187	0.138	2.12	3.154	0.115
C_{16}	0.10	0.321	0.074	0.51	2.109	0.791	1.01	2.160	1.208	1.52	4.088	0.657	2.02	3.264	0.235
C_{17}	0.10	0.135	0.010	0.50	0.634	0.035	0.99	1.214	0.069	1.49	2.055	0.066	1.98	2.796	0.092
C_{18}	0.11	0.225	0.040	0.56	1.404	0.389	1.12	1.738	0.665	1.68	3.484	0.406	2.24	3.233	0.110
C_{19}	0.10	0.100	0.013	0.51	0.511	0.027	1.01	1.028	0.036	1.52	1.760	0.043	2.02	2.595	0.026
C_{20}	0.12	0.102	0.026	0.59	0.513	0.058	1.17	1.008	0.085	1.76	1.759	0.119	2.34	2.617	0.125
C_{21}	0.10	0.065	0.025	0.50	0.366	0.066	1.00	0.709	0.106	1.50	1.269	0.155	2.00	1.892	0.169
C_{22}	0.10	0.078	0.044	0.52	0.361	0.098	1.03	0.662	0.150	1.55	1.185	0.228	2.06	1.789	0.246
C_{23}	0.10	0.042	0.030	0.52	0.259	0.091	1.03	0.469	0.146	1.55	0.873	0.247	2.06	1.324	0.266
C_{24}	0.10	0.046	0.038	0.50	0.228	0.108	0.99	0.377	0.162	1.49	0.703	0.279	1.98	1.068	0.312

Tabella 5.12 - IDL steroli e stanoli [21]

steroli e stanoli	
	IDL (pg)
coprostanolo	11
epicoprostanolo	13
colesterolo	22
colestanolo	120
betasitosterolo	86
stigmastanolo	25

Tabella 5.13 - IDL IPA [82]

IPA	
	IDL (pg)
Acenaftilene	0.001
Acenaftene	0.005
Fluorene	0.01
Fenantrene	0.01
Antracene	0.01
Fluorantene	0.01
Pirene	0.01
Benzo(a)Antracene	1
Crisene	1
Retene	1
Benzo(b)Fluorantene	1
Benzo(k)Fluorantene	1
Benzo(a)Pirene	1
Benzo(ghi)Perilene	2
Indeno(1,2,3-c,d)Pirene	2
Dibenzo(A,H)Antracene	2

6 BIBLIOGRAFIA

1. Pasqua G, Abbate G, Forni C (2011) Botanica generale e diversità vegetale. Piccin Nuova Libraria S.p.A, Padova
2. Freeman KH, Pancost RD (2013) Biomarkers for Terrestrial Plants and Climate. Treatise on Geochemistry, 2nd ed. Elsevier Ltd., pp 395–416
3. Bush RT, McInerney FA (2013) Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: implications for paleoecology and chemotaxonomy. Geochim Cosmochim Acta 117:161–179. doi: 10.1016/j.gca.2013.04.016
4. Nichols JE, Booth RK, Jackson ST, Pendall EG, Huang Y (2006) Paleohydrologic reconstruction based on n-alkane distributions in ombrotrophic peat. Org Geochem 37:1505–1513. doi: 10.1016/j.orggeochem.2006.06.020
5. Shepherd T, Griffiths WD (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. New Phytol 171:469–99. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01826.x
6. Rochefort L, Strack M, Poulin M, Price JS, Graf M, Desrochers A, Lavoie C (2012) Wetlands of the Central Valley of California and Klamath Basin. Wetl Habitats North Am Ecol Conserv Concerns 9:119–134.
7. http://www.wetlands.org.
8. Clymo RS (1983) Mires: Swamp, Bog, Fen and Moor, Ecosystems of the world. Elsevier Scientific Publishing Co. New York
9. Strack M, Waddington JM, Turetsky M, Roulet NT, Byrne K a (2008) Northern peatlands, greenhouse gas exchange and climate change.
10. Buchanan BB, Gruissem W, Jones LR (2000) Biochemestry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists
11. Nelson LD, Cox MM (2004) Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition, 4th ed. W.H. Freeman abd Company
12. Jetter R, Kunst L (2008) Plant surface lipid biosynthetic pathways and their utility for metabolic engineering of waxes and hydrocarbon biofuels. Plant J 54:670–683. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03467.x
13. Zhang Z, Zhao M, Eglinton G, Lu H, Huang CY (2006) Leaf wax lipids as paleovegetational and paleoenvironmental proxies for the Chinese Loess Plateau over the last 170 kyr. Quat Sci Rev 25:575–594. doi: 10.1016/j.quascirev.2005.03.009
14. Carr AS, Boom A, Grimes HL, Chase BM, Meadows ME, Harris A (2014) Leaf wax n-alkane distributions in arid zone South African flora: Environmental controls, chemotaxonomy and palaeoecological implications. Org Geochem 67:72–84. doi: 10.1016/j.orggeochem.2013.12.004
15. Pietrogrande MC, Mercuriali M, Pasti L, Dondi F (2009) Data handling of complex GC-MS chromatograms: characterization of n-alkane distribution as chemical marker in organic input source identification. Analyst 134:671–80. doi: 10.1039/b815317e
16. Diefendorf AF, Freeman KH, Wing SL, Graham H V. (2011) Production of n-alkyl lipids in living plants and implications for the geologic past. Geochim Cosmochim Acta 75:7472–7485. doi: 10.1016/j.gca.2011.09.028
17. D'Anjou RM, Bradley RS, Balascio NL, Finkelstein DB (2012) Climate impacts on human settlement and

agricultural activities in northern Norway revealed through sediment biogeochemistry. Proc Natl Acad Sci U S A 109:20332–7. doi: 10.1073/pnas.1212730109

18. Meyers PA, Ishiwatari R (1993) Lacustrine organic geochemistry—an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. Org Geochem 20:867–900. doi: 10.1016/0146-6380(93)90100-P
19. Matsuda H, Koyama T (1977) Early diagenesis of fatty acids in lacustrine sediments—II. A statistical approach to changes in fatty acid composition from recent sediments and some source materials. Geochim Cosmochim Acta 41:1825–1834. doi: 10.1016/0016-7037(77)90214-9
20. Cranwell PA (1981) Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. Org Geochem 3:79–89. doi: 10.1016/0146-6380(81)90002-4
21. Battistel D, Piazza R, Argiriadis E, Marchiori E, Radaelli M, Barbante C (2015) GC-MS method for determining faecal sterols as biomarkers of human and pastoral animal presence in freshwater sediments. Anal Bioanal Chem. doi: 10.1007/s00216-015-8998-2
22. Tse TJ, Codling G, Jones PD, Thoms K, Liber K, Giesy JP, Wheater H, Doig LE (2014) Reconstructing long-term trends in municipal sewage discharge into a small lake in northern Manitoba, Canada. Chemosphere 103:299–305. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.12.019
23. Wen-Yen H, Meinschein W. (1976) Sterols as source indicators of organic materials in sediments. Geochim Cosmochim Acta 40:323–330. doi: 10.1016/0016-7037(76)90210-6
24. Dureth S, Herrman R, Pecher K (1986) Tracing faecal pollution by coprostanol and intestinal bacteria in an ice-covered finnish lake loaded with both industrial and domestic sewage. Water, Air, Soil Pollut 28:131–49.
25. Froehner S, Maceno M, Raquel FM (2010) Sediments as a potential tool for assessment of sewage pollution in Barigüi River, Brazil. Environ Monit Assess 170:261–272.
26. Sojinu SO, Sonibare OO, Ekundayo O, Zeng EY (2012) Assessing anthropogenic contamination in surface sediments of Niger Delta, Nigeria with fecal sterols and n-alkanes as indicators. Sci Total Environ 441:89–96. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.09.015
27. Cordeiro LGSM, Carreira RS, Wagener ALR (2008) Geochemistry of fecal sterols in a contaminated estuary in southeastern Brazil. Org Geochem 39:1097–1103. doi: 10.1016/j.orggeochem.2008.02.022
28. Birk JJ, Dippold M, Wiesenberg GLB, Glaser B (2012) Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr A 1242:1–10. doi: 10.1016/j.chroma.2012.04.027
29. Tyagi P, Edwards DR, Coyne MS (2008) Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution. Water Air Soil Pollut 187:263–274.
30. Takada H, Farrington JW, Bothner MH, Johnson CG, Tripp BW (1994) Transport of sludge-derived organic pollutants to deep-sea sediments at Deep Water Dump Site 106. Environ Sci Technol 28:1062–1072.
31. Venkatesan MI, Santiago CA (1989) Sterols in ocean sediments: novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. Mar Biol 102:431–437.
32. Hughes KA, Thompson A (2004) Distribution of sewage pollution around a maritime Antarctic

research station indicated by faecal coliforms, Clostridium perfringens and faecal sterol markers. Environ Pollut 127:315–321. doi: 10.1016/j.envpol.2003.09.004

33. Bethell PH, Goad LJ, Evershed RP, Ottaway J (1994) The study of molecular markers of human activity: the use of coprostanol in the soil as an indicator of human faecal material. J Archaeol Sci 21:619–632. doi: 10.1006/jasc.1994.1061
34. Evershed RP, Bethell PH (1996) Application of multimolecular biomarker techniques to the identification of fecal material in archaeological soils and sediments. ACS Symp Ser 625:157–172.
35. Ravindra K, Sokhi R, Vangrieken R (2008) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. Atmos Environ 42:2895–2921. doi: 10.1016/j.atmosenv.2007.12.010
36. Choi H, Harrison R, Komulainen H, Saborit JMD (2010) Polycyclic aromatic hydrocarbons. WHO Guidel. Indoor Air Qual. Sel. Pollut.
37. http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/docs/pah.pdf.
38. Laflamme RE, Hites RA (1978) The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. Geochim Cosmochim Acta 42:289–303. doi: 10.1016/0016-7037(78)90182-5
39. Tan Y., Heit M (1981) Biogenic and abiogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in sediments from two remote Adirondack lakes. Geochim Cosmochim Acta 45:2267–2279. doi: 10.1016/0016-7037(81)90076-4
40. Wakeham SG, Schaffner C, Giger W (1980) Poly cyclic aromatic hydrocarbons in Recent lake sediments—II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. Geochim Cosmochim Acta 44:415–429. doi: 10.1016/0016-7037(80)90041-1
41. Lima ALC, Farrington JW, Reddy CM (2005) Combustion-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment—A review. Environ Forensics 6:109–131. doi: 10.1080/15275920590952739
42. Garo A, Lahaye J, Prado G (1988) Mechanisms of formation and destruction of soot particles in a laminar methane-air diffusion flame. Symp Combust 21:1023–1031. doi: 10.1016/S0082-0784(88)80333-3
43. Richter H, Howard J. (2000) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot—a review of chemical reaction pathways. Prog Energy Combust Sci 26:565–608. doi: 10.1016/S0360-1285(00)00009-5
44. Macadam S (1997) Soot surface growth mechanisms in stationary combustion systems. Massachusetts Institute of Technology
45. Baek SO, Goldstone ME, Kirk PWW, Lester JN, Perry R (1991) Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere. Chemosphere 22:503–520. doi: 10.1016/0045-6535(91)90062-I
46. Yamasaki H, Kuwata K, Hiroko M (1982) Effects of ambient temperature on aspects of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Sci Technol 16 (4):189–194.
47. Golomb D (2001) Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons near New England coastal waters. Atmos Environ 35:6245–6258. doi: 10.1016/S1352-2310(01)00456-3
48. Offenberg JH, Baker JE (2002) Precipitation scavenging of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons along an urban to over-water transect. Environ Sci Technol 36:3763–71. doi:

10.1021/es025608h

49. Windsor JG, Hites RA (1979) Polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Maine sediments and Nova Scotia soils. Geochim Cosmochim Acta 43:27–33. doi: 10.1016/0016-7037(79)90043-7
50. Budzinski H, Raymond N, Nadalig T, Gilewicz M, Garrigues P, Bertrand JC, Caumette P (1998) Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. Org Geochem 28:337–348. doi: 10.1016/S0146-6380(98)00002-3
51. Cerniglia CE, Heitkamp MA (1989) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. In: Varanasi U (ed) Metab. Polycycl. Aromat. Hydrocarb. Aquat. Environ. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 41–68
52. Rothermich MM, Hayes LA, Lovley DR (2002) Anaerobic, Sulfate-Dependent Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Petroleum-Contaminated Harbor Sediment. Environ Sci Technol 36:4811–4817. doi: 10.1021/es0200241
53. Macrae J, Hall K (1998) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in marine sediment under denitrifying conditions. Water Sci Technol 38:177–185. doi: 10.1016/S0273-1223(98)00653-2
54. Jonesa DM, Rowlanda SJ, Douglasa AG, Howellsb S (1986) An Examination of the Fate of Nigerian Crude Oil in Surface Sediments of the Humber Estuary by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Int J Environ Anal Chem 24:227–247.
55. Budzinski H, Raoux C, Baumard P, Bellocq J, Garrigues P (1995) Differentiation of contamination sources in recent sediments through PAH distributions: an overview. Org Geochemistry Dev Appl to Energy, Clim Environ Hum Hist 616–618.
56. Colombo JC, Pelletier E, Brochu C, Khalil M, Catoggio JA (1989) Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de la Plata Estuary, Argentina. Environ Sci Technol 23:888–894. doi: 10.1021/es00065a019
57. Gschwend PM, Hites RA (1981) Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the northeastern United States. Geochim Cosmochim Acta 45:2359–2367. doi: 10.1016/0016-7037(81)90089-2
58. Lipiatou E, Marty J-C, Saliot A (1993) Sediment trap fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea. Mar Chem 44:43–54. doi: 10.1016/0304-4203(93)90005-9
59. Pereira WE, Hostettler FD, Luoma SN, van Geen A, Fuller CC, Anima RJ (1999) Sedimentary record of anthropogenic and biogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Bay, California. Mar Chem 64:99–113. doi: 10.1016/S0304-4203(98)00087-5
60. Prahl FG, Carpenter R (1983) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-phase associations in Washington coastal sediment. Geochim Cosmochim Acta 47:1013–1023. doi: 10.1016/0016-7037(83)90231-4
61. Readman JW, Fillmann G, Tolosa I, Bartocci J, Villeneuve J-P, Catinni C, Mee L. (2002) Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. Mar Pollut Bull 44:48–62. doi: 10.1016/S0025-326X(01)00189-8
62. Yunker MB, Macdonald RW, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S (2002) PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. Org

Geochem 33:489–515. doi: 10.1016/S0146-6380(02)00002-5

63. Gevao B, Jones K., Hamilton-Taylor J (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) deposition to and processing in a small rural lake, Cumbria UK. Sci Total Environ 215:231–242. doi: 10.1016/S0048-9697(98)00129-6
64. Grimmer G, Böhnke H (1975) Profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and metal content in sediment layers of a lake. Cancer Lett 1:75–83. doi: 10.1016/S0304-3835(75)95429-4
65. Lima ALC, Eglinton TI, Reddy CM (2003) High-resolution record of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbon deposition during the 20th century. Environ Sci Technol 37:53–61. doi: 10.1021/es025895p
66. McVeety BD, Hites RA (1988) Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces: A mass balance approach. Atmos Environ 22:511–536. doi: 10.1016/0004-6981(88)90196-5
67. Yunker MB, Macdonald RW (2003) Alkane and PAH depositional history, sources and fluxes in sediments from the Fraser River Basin and Strait of Georgia, Canada. Org Geochem 34:1429–1454. doi: 10.1016/S0146-6380(03)00136-0
68. Jones KC, Stratford JA, Tidridge P, Waterhouse KS, Johnston AE (1989) Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: Long-term changes in profile distribution. Environ Pollut 56:337–351. doi: 10.1016/0269-7491(89)90079-1
69. Wild SR, Waterhouse KS, McGrath SP, Jones KC (1990) Organic contaminants in an agricultural soil with a known history of sewage sludge amendments: polynuclear aromatic hydrocarbons. Environ Sci Technol 24:1706–1711. doi: 10.1021/es00081a013
70. Sanders G, Jones KC, Hamilton-Taylor J, Dorr H (1995) PCB and PAH fluxes to a dated UK peat core. Environ Pollut 89:17–25. doi: 10.1016/0269-7491(94)00048-I
71. Benner BA, Wise SA, Currie LA, Klouda GA, Klinedinst DB, Zweidinger RB, Stevens RK, Lewis CW (2002) Distinguishing the contributions of residential wood combustion and mobile source emissions using relative concentrations of dimethylphenanthrene isomers.
72. Fine PM, Cass GR, Simoneit BRT (2001) Chemical characterization of fine particle emissions from fireplace combustion of woods grown in the northeastern United States. Environ Sci Technol 35:2665–2675. doi: 10.1021/es001466k
73. Jenkins BM, Daniel Jones A, Turn SQ, Williams RB (1996) Particle concentrations, gas-particle partitioning, and species intercorrelations for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) emitted during biomass burning. Atmos Environ 30:3825–3835. doi: 10.1016/1352-2310(96)00084-2
74. Schauer JJ, Kleeman MJ, Cass GR, Simoneit BRT (2001) Measurement of Emissions from Air Pollution Sources. 3. C 1 −C 29 Organic Compounds from Fireplace Combustion of Wood. Environ Sci Technol 35:1716–1728. doi: 10.1021/es001331e
75. Jenkins BM, Jones AD, Turn SQ, Williams RB (1996) Emission Factors for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Biomass Burning. Environ Sci Technol 30:2462–2469. doi: 10.1021/es950699m
76. Simoneit BR. (1977) Diterpenoid compounds and other lipids in deep-sea sediments and their geochemical significance. Geochim Cosmochim Acta 41:463–476. doi: 10.1016/0016-7037(77)90285-X

77. Alexander R, Larcher A V., Kagi RI, Price PL (1992) An oil-source correlation study using age-specific plant-derived aromatic biomarkers. Biol markers sediments Pet 201–221.
78. van Aarssen B, Alexander R, Kagi RI (1996) The origin of Barrow Sub-basin crude oils: a geochemical correlation using land-plant biomarkers. APPEA Journal-Australian Pet Prod Explor Assoc 36:465–476.
79. Leppänen H, Oikari A (1999) Occurrence of retene and resin acids in sediments and fish bile from a lake receiving pulp and paper mill effluents. Environ Toxicol Chem 18:1498–1505. doi: 10.1002/etc.5620180723
80. Ramdahl T (1983) Retene - a molecular marker of wood combustion in ambient air. Nature 306:580–582.
81. Konieczka P, Namiesnik J (2009) Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory: A Practical Approach. CRC Press
82. Piazza R, Gambaro A, Argiriadis E, Vecchiato M, Zambon S, Cescon P, Barbante C (2013) Development of a method for simultaneous analysis of PCDDs, PCDFs, PCBs, PBDEs, PCNs and PAHs in Antarctic air. Anal Bioanal Chem 405:917–932. doi: 10.1007/s00216-012-6464-y
83. Gregoris E, Argiriadis E, Vecchiato M, Zambon S, De Pieri S, Donateo A, Contini D, Piazza R, Barbante C, Gambaro A (2014) Gas-particle distributions, sources and health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated naphthalenes (PCNs) in Venice aerosols. Sci Total Environ 476-477:393–405. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.036
84. Scholz-Böttcher BM, Ahlf S, Vázquez-Gutiérrez F, Rullkötter J (2009) Natural vs. anthropogenic sources of hydrocarbons as revealed through biomarker analysis: A case study in the southern Gulf of Mexico. Bol la Soc Geol Mex 61:47–56.
85. Mille G, Asia L, Guiliano M, Malleret L, Doumenq P (2007) Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). Mar Pollut Bull 54:566–575. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.12.009
86. Rielley G, Collier RJ, Jones DM, Eglinton G (1991) The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K.—I: source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. Org Geochem 17:901–912. doi: 10.1016/0146-6380(91)90031-E
87. Préndez M, Barra C, Toledo C, Richter P (2011) Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in marine surficial sediment near Antarctic stations at Fildes Peninsula, King George Island. Antarct Sci 23:578–588. doi: 10.1017/S0954102011000563
88. Aloulou F, Kallel M, Dammak M, Elleuch B, Saliot A (2009) Even-numbered n-alkanes/n-alkenes predominance in surface sediments of Gabes Gulf in Tunisia. Environ Earth Sci 61:1–10. doi: 10.1007/s12665-009-0315-y
89. Jaffé R, Mead R, Hernandez ME, Peralba MC, DiGuida O a. (2001) Origin and transport of sedimentary organic matter in two subtropical estuaries: A comparative, biomarker-based study. Org Geochem 32:507–526. doi: 10.1016/S0146-6380(00)00192-3
90. Sánchez-García L, de Andrés JR, Martín-Rubí JA, González-Vila FJ, Polvillo O (2008) Use of lipid biomarker patterns as a proxy of environmental variability in the coastal sedimentary record from the Gulf of Cádiz (SW Spain). Org Geochem 39:958–964. doi: 10.1016/j.orggeochem.2008.03.013

91. Schwark L, Zink K, Lechterbeck J (2002) Reconstruction of postglacial to early Holocene vegetation history in terrestrial Central Europe via cuticular lipid biomarkers and pollen records from lake sediments. Geology 30:463–466. doi: 10.1130/0091-7613(2002)030<0463:ROPTEH>2.0.CO;2

92. Jansen B, Haussmann NS, Tonneijck FH, Verstraten JM, de Voogt P (2008) Characteristic straight-chain lipid ratios as a quick method to assess past forest-paramo transitions in the Ecuadorian Andes. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol 262:129–139. doi: 10.1016/j.palaeo.2008.02.007

93. Schellekens J, Buurman P (2011) n-Alkane distributions as palaeoclimatic proxies in ombrotrophic peat: The role of decomposition and dominant vegetation. Geoderma 164:112–121. doi: 10.1016/j.geoderma.2011.05.012

94. Wang Y-H, Yang H, Chen X, Zhang J-X, Ou J, Xie B, Huang C-C (2013) Molecular biomarkers for sources of organic matter in lacustrine sediments in a subtropical lake in China. Environ Pollut 176:284–91. doi: 10.1016/j.envpol.2013.01.041

95. Ishiwatari R, Yamamoto S, Uemura H (2005) Lipid and lignin/cutin compounds in Lake Baikal sediments over the last 37 kyr: implications for glacial–interglacial palaeoenvironmental change. Org Geochem 36:327–347. doi: 10.1016/j.orggeochem.2004.10.009

96. Ficken KJ, Street-Perrott FA, Perrott RA, Swain DL, Olago DO, Eglinton G (1998) Glacial/interglacial variations in carbon cycling revealed by molecular and isotope stratigraphy of Lake Nkunga, Mt. Kenya, East Africa. Org Geochem 29:1701–1719. doi: 10.1016/S0146-6380(98)00109-0

97. Zheng Y, Zhou W, Meyers PA, Xie S (2007) Lipid biomarkers in the Zoigê-Hongyuan peat deposit: Indicators of Holocene climate changes in West China. Org Geochem 38:1927–1940. doi: 10.1016/j.orggeochem.2007.06.012

98. Xu Y, Holmes CW, Jaffé R (2007) Paleoenvironmental assessment of recent environmental changes in Florida Bay, USA: A biomarker based study. Estuar Coast Shelf Sci 73:201–210. doi: 10.1016/j.ecss.2007.01.002

99. Meyers PA, Kawka OE (1984) Geolipid, pollen and diatom stratigraphy in postglacial lacustrine sediments PHILIP. Org Geochem 6:727–732.

100. Jaffé R, Rushdi AI, Medeiros PM, Simoneit BRT (2006) Natural product biomarkers as indicators of sources and transport of sedimentary organic matter in a subtropical river. Chemosphere 64:1870–1884. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.01.048

101. Ogura K, Machihara T, Takada H (1990) Diagenesis of biomarkers in Biwa Lake sediments over 1 million years. Org Geochem 16:805–813. doi: 10.1016/0146-6380(90)90119-K

102. Huang Y, Street-Perrott FA, Perrott RA, Metzger P, Eglinton G (1999) Glacial–interglacial environmental changes inferred from molecular and compound-specific δ13C analyses of sediments from Sacred Lake, Mt. Kenya. Geochim Cosmochim Acta 63:1383–1404. doi: 10.1016/S0016-7037(99)00074-5

103. Xie S (2005) Distributions of fatty acids in a stalagmite related to paleo-climate change at Qingjiang in Hubei, southern China. Sci China Ser D 48:1463. doi: 10.1360/04yd0155

104. Russell JM, Werne JP (2007) The use of solid phase extraction columns in fatty acid purification. Org Geochem 38:48–51. doi: 10.1016/j.orggeochem.2006.09.003

105. de Abreu-Mota MA, de Moura Barboza CA, Bícego MC, Martins CC (2014) Sedimentary biomarkers

along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: a multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. Chemosphere 103:156–63. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.11.052

106. Segnana M (2015) Climatic variability and human impact during the Holocene from an Alpine peat bog. Ca' Foscari University of Venice
107. Cranwell PA (1974) Monocarboxylic acids in lake sediments: indicators, de- rived from terrestrial and aquatic biota, of paleoenvi- ronmental trophic levels. 14:
108. Kawamura K, Ishiwatari R (1985) Distribution of lipid-class compounds in bottom sediments of freshwater lakes with different trophic status, in Japan. Chem Geol 51:123–133. doi: 10.1016/0009-2541(85)90092-0
109. http://www.infodolomiti.it/vivere-le-dolomiti/i-comuni/san-nicolo-di-comelico/5688-l1.html.
110. TYLECOTE RF (1976) A history of metallurgy.
111. http://www.valcomelicodolomiti.it/arte-a-cultura/la-stua-sul-torrente-padola.html.