

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea specialistica in SCIENZE PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

**DETERMINAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI
AROMATICI IN CARBONI VEGETALI (BIOCHAR)**

Tesi di laurea in Chimica Analitica degli Inquinanti

Relatore

Prof. Daniele Fabbri

Presentata da

Alessandro Girolamo Rombolà

Correlatore

Dott. Cristian Torri

(I sessione)

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
Premessa	
1.1. Il biochar	5
1.1.1. Produzione del biochar	7
1.1.2. Costituenti delle biomasse e comportamento termico	10
1.1.3. Caratteristiche chimiche del biochar	13
1.1.4. Benefici del biochar	15
1.1.5. Probabili inquinanti nel biochar	20
1.2. Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	22
1.2.1. Caratteristiche generali e struttura degli IPA	22
1.2.2. Proprietà chimico-fisiche degli IPA	25
1.2.3. Sorgenti e meccanismi di formazione	25
1.2.4. Tossicità degli IPA	28
1.2.4.1. Tossicità equivalente (TEQ)	30
1.3. Scopo della tesi	31
2. PARTE SPERIMENTALE	33
MATERIALI E METODI	
2.1. Materiali	33
2.1.1. Campioni	35
2.2. Strumentazioni e metodologie	37
2.2.1. Pirolisi GC/MS	37

2.3. Determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici	40
2.3.1. Preparazione del campione e dei materiali di estrazione	40
2.3.2. Estrazione degli IPA dal biochar	40
2.3.3. Clean up	42
2.3.4. Analisi GC/MS	43
2.3.5. Calcolo delle concentrazioni	44
2.4. Validazione del metodo	45
2.4.1. Verifica della linearità della risposta strumentale e curve di calibrazione	45
2.4.2. Limite di rivelabilità	46
2.4.3. Limite di quantificazione	47
2.4.4. Precisione	47
2.4.5. Bianco procedurale	47
2.4.6. Recupero	48
2.4.7. Robustezza	48
2.4.8. Greenness	49
2.5. Analisi elementare, microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)	50
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	52
3.1. Ottimizzazione della procedura analitica per la determinazione degli IPA nel biochar	52
3.1.1. Ottimizzazione del metodo estrattivo	53
3.1.1.1. Prove di estrazione a riflusso	53
3.1.1.2. Prove di estrazione mediante Sonicazione	57
3.1.1.3. Prove di estrazione mediante Soxhlet	58

3.1.2. SPE	62
3.1.3. Ottimizzazione clean up	65
3.2. Procedura definitiva	71
3.3. Validazione del metodo	74
3.3.1. Calibrazione	74
3.3.2. Limite di rivelabilità	75
3.3.3. Limite di quantificazione	75
3.3.4. Precisione	76
3.3.5. Bianco procedurale	78
3.3.6. Recupero	78
3.3.7. Robustezza	79
3.3.8. Greenness	78
4. Applicazione della metodologia	81
4.1. Determinazione di IPA in carboni vegetali	81
4.1.1. IPA nei biochar	82
4.1.2. IPA nei char da <i>Panicum virgatum</i>	88
4.1.3. IPA nei char da microalghe	94
4.1.4. Confronto tra le concentrazioni di IPA e le caratteristiche dei biochar/char	98
4.2. Determinazione degli IPA in suoli trattati e non trattati con biochar	103
4.3. Confronto con la letteratura	104
5. CONCLUSIONI	111
BIBLIOGRAFIA	115

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Premessa

La concentrazione di anidride carbonica in atmosfera aumenta in modo costante di circa 1.5 ppm l'anno, per cui è facile prevedere per il 2050 una concentrazione di 560 ppm, con un aumento del 200% rispetto all'età pre-industriale, e probabili effetti negativi sul clima.

L'inizio del trend di crescita della concentrazione di CO₂ coincide con la rivoluzione industriale: il progresso tecnologico, le migliori condizioni igienico-sanitarie, l'abbattimento dei tassi di mortalità hanno infatti favorito un cambiamento del tenore di vita. Si è così passati da una vita regolata da un regime di sussistenza, improntato quindi al possesso dei beni primari, ad un regime più consumistico, basato sull'accumulo di beni di lusso (beni secondari), caratterizzato dalla richiesta di una maggiore quantità e varietà di cibi e da uno smisurato consumo di carne. La popolazione globale è andata via via aumentando e sempre più popolazioni hanno iniziato a perseguire il mito del benessere. Ne è derivato direttamente l'aumento delle emissioni di gas serra, soprattutto per sovrautilizzo di combustibili fossili e sovrasfruttamento dei terreni.

Inoltre, tra gli anni '60 e la fine degli anni '90, un profondo cambiamento interessò le pratiche agrarie. Tale cambiamento, definito "rivoluzione verde", ha introdotto una serie di tecniche e pratiche agricole orientate al raggiungimento della massima produttività, quali: l'uso di fertilizzanti chimici; l'introduzione di nuove e più produttive varietà di piante; l'introduzione di specie ibride geneticamente migliorate; l'impiego di macchine agricole; l'uso di prodotti fitosanitari di sintesi per controllare le malerbe (diserbanti) e gli insetti nocivi (antiparassitari). Tale "rivoluzione" se da un lato ha consentito un incremento delle produzioni agricole in gran parte del mondo, dall'altro ha tuttavia messo a dura prova gli ecosistemi agrari, contribuendo alla degradazione del suolo, all'esaurimento e all'inquinamento delle acque, alla riduzione della biodiversità e alla riduzione delle scorte di sostanza organica nel terreno.

L'agricoltura intensiva ha anche provocato un aumento delle emissioni di anidride carbonica legate al settore agricolo. La quantità di energia richiesta dal processo di produzione è infatti molto cresciuta, sia per l'aumentato ricorso ai macchinari sia per l'impiego di fertilizzanti, pesticidi ed erbicidi chimici, molti dei quali prodotti da combustibili fossili, che hanno reso l'agricoltura sempre più dipendente dai prodotti del petrolio. Inoltre, le tecniche di smaltimento di rifiuti agricoli non hanno fatto altro che velocizzare il processo di emissione di CO₂.

Vi è quindi la necessità di ripensare l'attuale modello di sviluppo basato sullo sfruttamento eccessivo delle risorse e di realizzare invece uno sviluppo sostenibile. Per "sviluppo sostenibile" s'intende: "uno sviluppo che risponda alle necessità del presente senza compromettere la capacità delle generazioni future di soddisfare le proprie esigenze". Tali parole sono tratte dal rapporto "*Our Common Future*" del 1987, conosciuto anche come *Brundtland Report*, e danno la definizione di "sviluppo sostenibile" così come elaborata dalla "*World Commission on Environment and Development* (Commissione mondiale sull'ambiente e lo sviluppo). Il concetto di sviluppo sostenibile si concentra sul migliorare la qualità della vita per tutti i cittadini senza incrementare l'uso delle risorse naturali oltre la capacità che l'ambiente ha di fornirle.

Per realizzare un modello di sviluppo sostenibile è indispensabile sostituire le risorse non rinnovabili con le risorse rinnovabili, che sono distribuite uniformemente sul pianeta e permettono di ridurre le emissioni di CO₂.

Mediante le risorse energetiche rinnovabili, come l'energia solare, l'energia eolica e le biomasse, il cui sfruttamento non è associato all'emissione di CO₂, si può soddisfare la maggior parte del fabbisogno energetico dell'uomo.

L'utilizzo delle biomasse, ad esempio, può dare un valido contributo al settore energetico, garantendo effetti molto più contenuti in termini di emissioni di gas serra. La biomassa è una sofisticata forma di accumulo dell'energia solare: le piante convertono l'energia solare attraverso il processo di fotosintesi, con un rendimento medio dello 0,1 %, accumulandola in modo permanente nelle foglie, negli steli e nei fiori. Tra le energie rinnovabili, la biomassa è l'unica a poter essere convertita in combustibili solidi (per esempio legna, pellets, cippato, bricchette, carbone di legna), in combustibili liquidi (bioetanolo, biodiesel, bio-olio), combustibili gassosi (biogas, gas di sintesi, idrogeno).

Le piante costituiscono la forma più comune di biomassa. Esse sono state utilizzate sotto forma di legno, torba e paglia per milioni di anni, fino a che sono state soppiantate dall'utilizzo di combustibili di origine fossile ritenuti per anni fonti di energia "pulita". Nella società preindustriale la biomassa era la fonte di energia dominante. Oggi si stima che, nei Paesi in via di sviluppo, la biomassa contribuisca a soddisfare il fabbisogno di energia primaria ancora nella misura del 33%, ma con bassissimo rendimento energetico, mentre in quelli industrializzati appena il 3%. Attualmente si sta dimostrando che uno sfruttamento oculato delle biomasse può costituire un'ottima fonte energetica. Le piante possono essere coltivate direttamente per la produzione di energia o raccolte nell'ambiente naturale. In genere vengono scelte piante capaci di riprodursi in tempi brevi, sia alberi (pini, pioppi, eucalipti) che piante annuali a basso fusto (canna da zucchero, mais, soia). Le ricerche sono orientate verso l'ottimizzazione delle potenzialità energetiche delle piante, andando ad individuare le specie colturali caratterizzate da un alto tasso di efficienza fotosintetica e da una limitata necessità di pratiche agronomiche quali lavorazione del terreno, concimazione, irrigazione.

Accanto alla ricerca agronomica si mira anche al miglioramento delle tecniche di raccolta, stoccaggio e trasporto delle biomasse. È fondamentale non trascurare nessun particolare poiché l'utilizzazione energetica delle biomasse trova la sua limitazione più grande nel costo di produzione della materia prima, che incide sul costo finale dell'energia in maniera molto significativa. Per abbassare i costi di produzione è necessario agire sulla massimizzazione delle produzioni per unità di superficie e di tempo.

Un utilizzo molto interessante delle biomasse è quello finalizzato alla produzione di biochar mediante pirolisi o gassificazione. Il biochar veniva prodotto tradizionalmente nelle carbonaie, ossia cumuli di legna coperti da terra per isolare il legname dall'aria e permetterne la trasformazione in condizioni di carenza di ossigeno. Sullo stesso principio si basano i processi industriali di pirolisi: la decomposizione termochimica di materiali organici si ottiene mediante l'applicazione di calore in assenza di agenti ossidanti.

Il biochar, infatti, può essere ottenuto a partire da numerosi tipi di residui: stocchi di mais, gusci di noce, lavorazione delle olive, pula di riso, scarti di potatura e di lavorazione del legno. Oltre al biochar, ad opportune condizioni di pirolisi, dalla biomassa si ottiene syngas e bio-olio.

I vantaggi associati al biochar sono molteplici.

In particolare, se applicato ai suoli, il biochar è un potente ammendante. Infatti, la sua alta porosità aumenta la ritenzione idrica e quella degli elementi nutritivi, che rimangono così più a lungo disponibili per le piante; migliora, inoltre, la struttura del terreno e le sue proprietà meccaniche (Chan et al., 2007). Molti studi hanno già dimostrato l'impatto positivo dell'applicazione del biochar sulle rese agricole. Esso infatti determina la diminuzione del fabbisogno di acqua e fertilizzanti (Lehmann et al., 2003; Yamato et al., 2006; Chan et al., 2007; Rondon et al., 2007; Baronti et al., 2010; Vaccari et al., 2011), consentendo altresì la riduzione dell'utilizzo di prodotti chimici di sintesi ad alta intensità energetica.

Un'altra potenzialità del biochar è rappresentata dalla mitigazione dei cambiamenti climatici. Infatti, la struttura compatta del biochar permette a questo prodotto di non essere degradato dai microrganismi del suolo e quindi di stoccare carbonio invece che farlo tornare in atmosfera sotto forma di CO₂.

A tali numerosi vantaggi va inoltre aggiunto che il liquido e il gas prodotti con la pirolisi, insieme al biochar, possono essere utilizzati per la produzione di energia elettrica o come altri combustibili (oltre ad essere utilizzati per alimentare il processo), così da limitare il consumo di combustibili fossili e quindi evitare le emissioni di gas serra.

Investire sul biochar e applicarlo sui terreni agricoli può essere sia economicamente sostenibile che vantaggioso. Infatti, l'aumento dei prezzi dei combustibili fossili, la necessità di aumentare la resa agricola in vista dell'aumento della popolazione mondiale e della conseguente richiesta alimentare mondiale, e la possibile nascita di un importante mercato mondiale di crediti di emissione di CO₂ legati all'impiego di biochar che le imprese potranno comprare per compensare le loro emissioni, sono tutti aspetti che rendono l'uso del biochar vantaggioso non solo dal punto di vista ambientale, ma anche da quello economico.

1.1 Il biochar

Il biochar è un materiale a grana fine e porosa prodotto dalla “combustione” di biomasse in assenza di ossigeno. La definizione adottata dalla *International Biochar Initiative* (IBI) precisa, inoltre, la necessità, affinché si possa parlare di biochar, di trovarsi in presenza di un materiale la cui applicazione è mirata al miglioramento della resa agricola e alla protezione dell’ambiente.

La tradizionale produzione di carbone vegetale, in un ambiente privo di ossigeno, ha una lunga storia nella civiltà umana risalente al 1600 circa, e l’uso di carbone risale a molto prima come si può osservare in disegni presenti in grotte di oltre 35 mila anni fa. Nonostante le antiche origini, si registra una certa mancanza di uniformità nella letteratura scientifica riguardo la nomenclatura dei prodotti derivanti dalla combustione di biomasse. Char, charcoal, soot, carbonio grafítico, cenere, coal e black carbon sono tutti termini utilizzati per descrivere i prodotti solidi derivanti dalla combustione di biomasse. Recentemente, il termine biochar è stato aggiunto a tale lista per indicare il prodotto derivante dalla pirolisi di materia organica specificatamente per essere applicato ai suoli sia per uso agronomico che di gestione ambientale (Lehmann J. et al., 2006). Da questo punto di vista, il biochar è qualcosa di nuovo in termini di applicazione e di finalità (sequestro del carbonio), ma non per quanto concerne la sua produzione.

Il termine biochar nel linguaggio comune, ma anche nella letteratura scientifica (Demirbas A., 2004a), è spesso utilizzato in maniera indifferenziata dal termine charcoal. Ciò dovrebbe essere evitato in quanto potrebbe indurre a non distinguere tra charcoal e carbone o coal. Infatti, il carbone è prodotto in maniera molto diversa dal charcoal e presenta differenti caratteristiche chimico-fisiche, anche se in determinati casi molto particolari le differenze possono essere meno marcate.

Per differenziare il termine biochar da charcoal, carbone attivo e black carbon, viene proposto il seguente elenco di termini che mira a definire meglio i diversi prodotti. Le differenze, tuttavia, sono relativamente sottili in quanto tutti i prodotti sono ottenuti dal riscaldamento di materiali ricchi in carbonio.

- **Charcoal:** prodotto derivante dalla decomposizione termica di legno e di materiali organici e usato soprattutto come combustibile per il

riscaldamento domestico e la cucina. Tradizionalmente si utilizza anche come ammendante o per il controllo di odore (Okimori et al., 2003). È prodotto in forni tradizionali a 450-500 °C, temperature simile a quelle della pirolisi industriale, ma con rese della materia prima in charcoal più basse. Inoltre tutto il calore, così come gli inquinanti gassosi e il liquido co-prodotti, si disperdono durante il processo di combustione;

- **Char:** prodotto solido derivante dalla pirolisi di qualsiasi materiale organico, ma anche un qualsiasi residuo di incendi naturali. Char è quindi il termine più generale per definire un residuo di pirolisi o incendio indipendentemente dalla natura del materiale di partenza. Spesso i termini char e charcoal vengono usati indifferentemente, ma il termine char è utilizzato anche per indicare un materiale carbonizzato contenente una minor quantità di carbonio, come i residui di incendi;
- **Carbone attivo:** prodotto dal riscaldamento di materiale carbonioso ad alta temperatura (sopra i 500 °C) e per lunghi periodi di tempo (> 10 ore). Il materiale risultante è caratterizzato da un'elevata capacità di adsorbimento. Non viene utilizzato come ammendante del suolo, ma per processi di pulizia come la pulizia dell'acqua e l'adsorbimento di gas, di contaminanti liquidi o solidi (Tomaszewski et al., 2007);
- **Black carbon:** è un termine molto vasto e comprende i residui ricchi in carbonio di combustioni o incendi. Combustibili fossili come carbone, gas e petrolio, così come biomasse, possono produrre black carbon. Il termine black carbon comprende l'intero spettro di materiali carbonizzati, che spaziano dal char, charcoal e biochar alla fuliggine, nerofumo e grafite (Schmidt M.W.I. et al., 2000);
- **Biochar:** residuo carbonioso di pirolisi o gassificazione prodotto specificatamente per essere applicato nei suoli sia per uso agronomico che di gestione ambientale.

1.1.1 Produzione del Biochar

I principali sistemi utilizzati dalle industrie di bioenergia per lo sfruttamento delle biomasse come fonti energetiche e per la produzione di biochar sono rappresentati dalla pirolisi e dalla gassificazione. La gassificazione può essere definita come la conversione termochimica di un combustibile solido o liquido in un gas, attuata mediante la presenza di un agente gassificante ed altri reagenti (aria/ossigeno e/o acqua/vapore), conducendo ad una sua parziale combustione. È un processo ad alte temperature in cui, attraverso il controllo della quantità di ossigeno presente nell'ambiente, la biomassa viene decomposta principalmente in "syngas", una miscela gassosa costituita principalmente d'azoto (50%), idrogeno (15-20%), metano (3-5%), monossido e diossido di carbonio (ciascuno 15-20%).

La pirolisi è un processo di degradazione termochimica che avviene in atmosfera inerte a temperature superiori a 300°C. I prodotti principali della pirolisi e della gassificazione si possono classificare come segue:

- un gas combustibile costituito principalmente da CO, CO₂ (se è presente ossigeno nel materiale base), H₂ e idrocarburi leggeri sia saturi che insaturi;
- un prodotto liquido che si separa in due fasi, una acquosa contenente specie organiche solubili a basso peso molecolare ed una non acquosa costituita prevalentemente da molecole organiche ed oli ad alto peso molecolare, denominata tar o bio-olio;
- un prodotto solido ricco in carbonio, il char.

Variando le condizioni sperimentali del processo, è possibile realizzare tre diversi tipi di pirolisi:

- la *slow pyrolysis*, caratterizzata da velocità di riscaldamento delle biomasse molto bassa, con temperature di reazione anch'esse piuttosto basse (200°C –350°C), e con tempi di residenza molto lunghi. Questo particolare tipo di pirolisi può essere impiegato per produrre elevate quantità di char (oltre il 30%);

- la **pirolisi convenzionale**, che può essere realizzata mediante moderate velocità di riscaldamento ($\approx 20^\circ\text{C/s}$) e altrettanto moderate temperature di reazione (minori di 600°C), con tempi di residenza variabili da 10 s a 10 min. Questo secondo tipo di pirolisi dà luogo a quantità comparabili di char, gas e liquido;
- la **fast pyrolysis**, infine, caratterizzata da velocità di riscaldamento molto alte (dell'ordine di 100°C/s), che possono essere raggiunte mediante un'alimentazione a granulometria molto fine, da tempi di residenza della fase gas molto brevi (<2 s), e da rese molto basse di char.

Le rese di gas, liquido e char dipendono, oltre che dal tipo di biomassa, dal tempo di residenza e dalla temperatura all'interno del reattore (Di Blasi et al., 1999; Di Blasi et al., 2001). Si riscontrano differenze quantitative nella resa dei prodotti tra *slow pyrolysis*, pirolisi convenzionale, *fast pyrolysis* e gassificazione. Dalla tabella 1.1 si può osservare come la massima resa di char (35%) avvenga con la *slow pyrolysis*, mentre si ha una diminuzione di tale resa con la pirolisi convenzionale (20%) e la *fast pyrolysis* (12%). In quest'ultima, invece, si ha un aumento della resa in bio-olio che con la *fast pyrolysis* raggiunge il 75%.

Le differenze osservate fanno dedurre che il tempo di residenza influisce sul grado di avanzamento delle reazioni secondarie che portano ad una diminuzione della resa di liquido a favore della formazione di volatili e char.

Per quanto riguarda la dipendenza dalla temperatura, la resa di liquido mostra un andamento non monotono caratterizzato dalla presenza di un massimo intorno ai $500\text{-}600^\circ\text{C}$. Il liquido è costituito da una frazione organica e da acqua; la resa della frazione organica raggiunge un massimo a circa 450°C (Aguado et al., 2000). Il residuo solido, invece, diminuisce velocemente per portarsi ad un valore che si mantiene costante alle alte temperature. Un incremento della temperatura di pirolisi determina un aumento nel contenuto di carbonio fisso e ceneri e una diminuzione di materia volatile nel residuo solido (Encinar et al., 1996).

Infine, la resa della fase gassosa tende ad aumentare con la temperatura. Tale andamento dipende dal fatto che inizialmente c'è una certa competizione fra le reazioni di *charring* e quelle di devolatilizzazione che prendono il sopravvento ad alta temperatura. Ne consegue che le rese in liquido e gas aumentano con la

temperatura, mentre diminuisce quella in char. A temperature prossime a 500 °C hanno inizio le reazioni di degradazione secondaria dei vapori di tar con produzione di specie gassose.

Tabella 1.1: Rendimenti dei prodotti tipici ottenuti attraverso diversi tipi di pirolisi del legno (International Energy Agency, 2007)

Processi	Bio-olio	Char	Gas
FAST PYROLYSIS Temperatura moderata (500 °C) Tempo di residenza breve del vapore caldo (< 2s)	75%	12%	13%
INTERMEDIATE PYROLYSIS Temperatura moderata (500 °C) Tempo di residenza moderato del vapore caldo (10-20 s)	50%	20%	30%
SLOW PYROLYSIS Temperatura bassa (400 °C) Tempo di residenza molto lungo per i solidi	30%	35%	35%
GASSIFICAZIONE Temperatura alta (800 °C) Tempo di residenza lungo per il vapore	5%	10%	85%

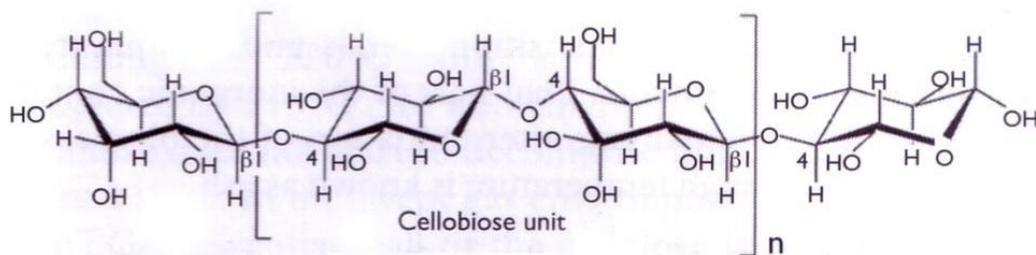
Pirolisi e gassificazione sono tecniche ben consolidate per la produzione di biocarburanti e gas di sintesi. Tuttavia, lo sfruttamento commerciale del biochar come ammendante è ancora agli albori. In Giappone, che rappresenta il più grande mercato di tali prodotti, circa 15000 t a⁻¹ sono prodotti per fini agronomici (Okimoro et al., 2003). Più spesso i char sono gassificati per l'estrazione di energia residua o utilizzati per la produzione di altri prodotti come il carbone attivo.

Il processo di pirolisi influisce notevolmente sulla qualità del biochar e il suo potenziale valore agricolo in termini di prestazioni agronomiche o di sequestro di carbonio. Il processo di pirolisi e i parametri di processo, principalmente la temperatura e il tempo di residenza, sono particolarmente importanti, come verrà successivamente descritto in modo dettagliato, ma va comunque evidenziato che nel determinare il prodotto finale influisce anche il tipo di materia prima. Queste due variabili sono quelle che determinano le proprietà chimico-fisiche del biochar.

1.1.2 Costituenti delle biomasse e comportamento termico

I costituenti delle biomasse sono principalmente la cellulosa, l'emicellulosa e la lignina, con piccole quantità di estratti organici e minerali inorganici. Questi costituenti possono variare considerevolmente tra i vari tipi di biomasse o anche in funzione del tipo di suolo, condizioni climatiche e tempo di mietitura.

Figura 1.1: Cellulosa



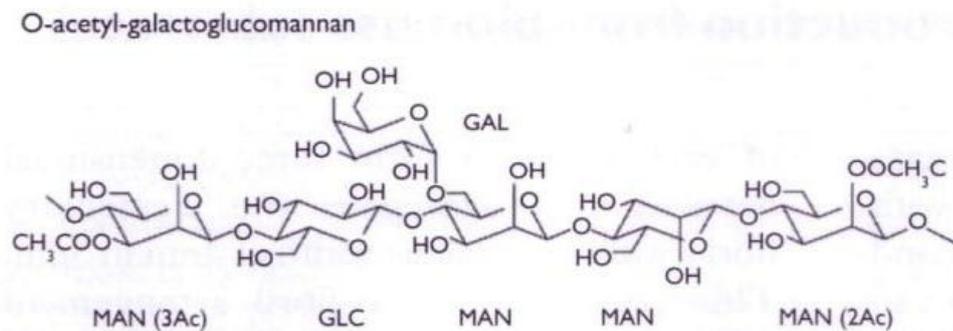
Fonte: Mohan et al., 2006

La cellulosa, che è il componente principale delle pareti cellulari delle piante, è composta da unità di glucopiranosio che formano una catena lineare attraverso legami $\beta 1 \rightarrow 4$. Nella struttura le unità, a residui alterni, sono “ruotate” in modo da permettere la formazione di legami a idrogeno tra molecole adiacenti. Ciò dà origine alle caratteristiche fibre resistenti della cellulosa. In figura 1.1 è indicata tra parentesi l'unità di cellobiosio, un disaccaride costituito da due unità di glucopiranosio. Il numero di unità di glucosio in una catena di cellulosa è noto come grado di polimerizzazione. Il grado medio di polimerizzazione è di circa 10000 unità. L'accoppiamento parallelo di molecole di cellulosa adiacenti a causa di ponti idrogeno o forze di Van Der Waals genera una struttura di tipo cristallino. La cellulosa esiste come fogli, composti da anelli di glucopiranosio giacenti su un piano. Tali fogli possono andare a costruire una pila di fogli, più propriamente un aggregato di micro fibrille con larghezza cristallina da 4nm a 5nm. In pirolisi la cellulosa produce principalmente anidro-cellulosa, 1,6-anidro- β -D-glucopiranosio (levoglucosano), furano e acidi volatili.

L'emicellulosa è costituita da diversi monosaccaridi e da residui di acido glucuronico e di acido 4-O-metilglucuronico rappresentati in figura 1.2. Questo

etero-polisaccaride può contenere in alcuni punti delle catene laterali alla catena polimerica principale. La stabilità chimica e termica dell'emicellulosa è più bassa rispetto a quella della cellulosa a causa della mancanza di una struttura cristallina e del basso grado di polimerizzazione (solo 100-200 unità).

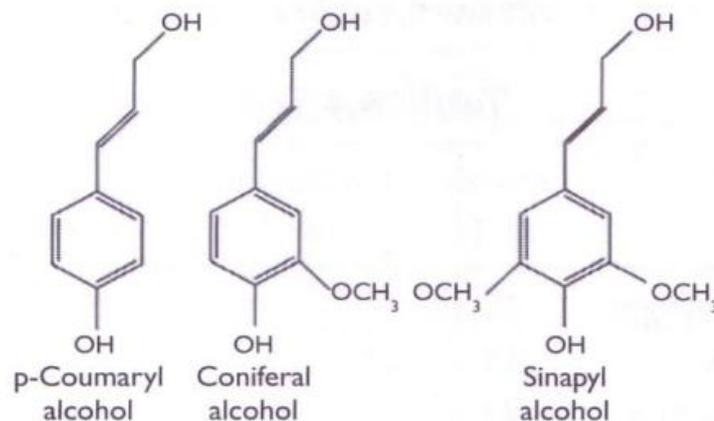
Figura 1.2: Formula strutturale di una generica emicellulosa



Fonte: Hartman, 2006

La lignina è il terzo e ultimo costituente principale del legno, di cui costituisce il 16-33 % in massa secca. È costituita da tre monomeri: l'alcool coniferilico (alcool 4-idrossi-3-metossicinnamilico), l'alcool sinapilico (alcool 4-idrossi-3,5-dimetossicinnamilico) e l'alcool cumarilico (alcool 4-idrossicinnamilico), ciascuno dei quali ha un anello aromatico con differenti sostituenti (Figura 1.3).

Figura 1.3: Monomeri della lignina



Fonte: Mohan et al., 2006

La lignina ha una struttura amorfa che porta a un gran numero di possibili collegamenti interni tra unità individuali. Legami etere sono predominanti tra le unità di lignina, mentre tra lignina e polisaccaridi sono presenti legami covalenti. A differenza della cellulosa, la lignina non può essere depolimerizzata ai suoi monomeri originali. La struttura, così come la composizione della lignina, può cambiare tra le diverse specie vegetali.

Il materiale vegetale contiene anche altri composti organici. Tra questi troviamo resine, grassi e acidi grassi, fenoli e fitosteroli. Gli estratti vengono classificati in idrofilici e lipofilici, a seconda che essi siano solubili rispettivamente in acqua o in solventi organici. Gli estratti possono modificare i profili delle emissioni gassose durante la pirolisi, ma non la quantità di biochar prodotta, dato che essi sono contenuti in concentrazioni molto basse.

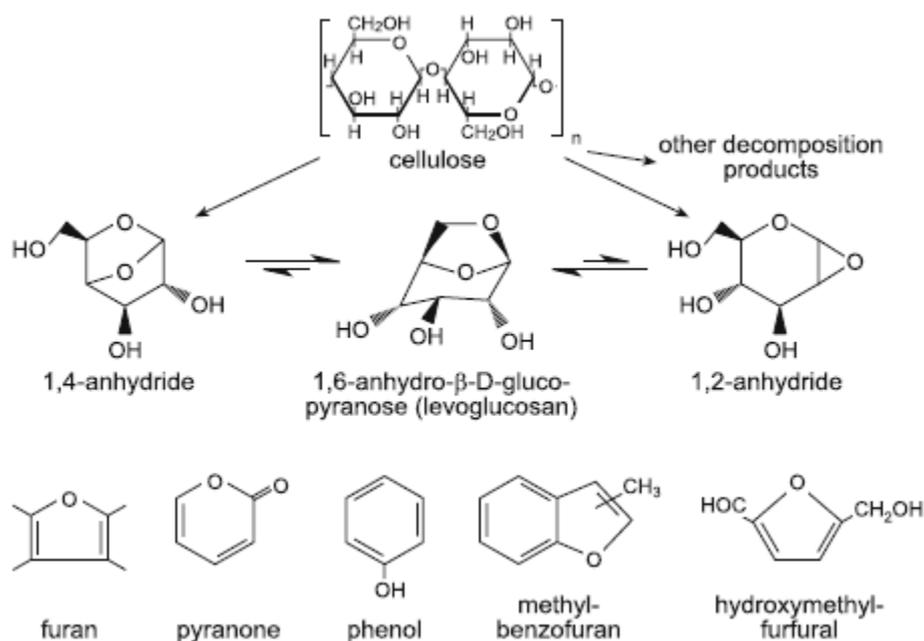
I componenti inorganici della biomassa includono sia i nutrienti elementari come azoto, fosforo e potassio, ma anche piccole quantità di zolfo, cloro e silicio, metalli alcalino terrosi, metalli di transizione e tracce di altri elementi. Questa parte di componenti inorganici rimane dopo l'ossidazione della biomassa ad alte temperature ed è nota come ceneri.

La cellulosa, l'emicellulosa e la lignina hanno comportamenti distinti circa la decomposizione termica, dipendenti dalla velocità di riscaldamento. Con elevate velocità di riscaldamento ($50^{\circ}\text{C min}^{-1}$), la decomposizione termica inizia a temperature più alte (Gupta A. K. et al., 2003). Con velocità di riscaldamento più basse, tipiche dei forni a muffola o dei forni tradizionali per la produzione del carbone, la decomposizione inizia a temperature inferiori a 250°C (William P. T. et al., 1996).

I prodotti di pirolisi dell'emicellulosa, includono gas non condensabili (CO , CO_2 , H_2 e CH_4), composti organici a basso peso molecolare (acidi carbossilici, aldeidi, alcheni e eteri), e acqua (Rutherford et al., 2004).

I prodotti di decomposizione della cellulosa, riportati in figura 1.4, possono variare di molto a seconda delle condizioni operative della pirolisi.

Figura 1.4: Decomposizione della cellulosa



Fonte: Knicker, 2007

La pirolisi della lignina produce gas non condensabili, vapori condensabili e aerosol liquidi, e biochar (Mohan et al., 2006). I gas non condensabili, che rappresentano il 10% in peso della lignina di partenza, sono principalmente CO, CH₄ ed etano (C₂H₄). I vapori condensabili e gli aerosol liquidi sono recuperati come acido pirolignico e tar insolubile. L'acido pirolignico è una fase acquosa di metanolo, acido acetico, acetone e tar solubile. Il tar insolubile contiene composti fenolici omologhi derivati dalla rottura di eteri e legami C-C. La pirolisi della lignina produce più char rispetto a quella della cellulosa.

1.1.3 Caratteristiche chimiche del biochar

Il biochar, essendo prodotto da una vasta gamma di biomasse, presenta al suo interno una grande variabilità in termini di composizione chimica. Una tale eterogeneità dei composti presenti è tuttavia da attribuire anche ai processi termici di produzione del biochar. Pertanto ogni biochar, creato da una certa biomassa di

partenza mediante determinati processi, avrà delle specifiche caratteristiche chimiche.

Per produrre biochar, infatti, può essere usato un ampio numero di materie prime e di processi termici. Fra le potenziali materie prime troviamo materiale di origine biologica come deiezioni animali, rifiuti e biomassa ligneocellulosica. In particolare quest'ultima è la materia prima principale per la produzione del biochar. I principali processi termici sono invece la conversione idrotermale, la torrefazione, la pirolisi lenta, la pirolisi veloce, la gassificazione e varie permutazioni. Tali processi si distinguono principalmente per la presenza o l'assenza di acqua libera, tempo di residenza delle materie prime, disponibilità di ossigeno atmosferico, velocità di riscaldamento, gas ambientali (come N₂ o vapore), temperatura e pressione usata.

Alcune ricerche hanno descritto il cambiamento delle caratteristiche chimico-fisiche di un residuo carbonioso ottenuto da biomasse ligneocellulosiche degradate termicamente a varie condizioni (Paris et al., 2005; Skodras et al., 2006; Strevos et al., 2007). In tali studi si è verificato che nel primo stadio ($T < 250^{\circ}\text{C}$) la biomassa va incontro a una deidratazione e ad una lieve depolimerizzazione della cellulosa, e le perdite di massa osservate sono molto basse. Si è inoltre rilevato che tra i 250°C e i 300°C vi è la depolimerizzazione (pirolisi) completa della cellulosa, accompagnata da forti perdite di massa da volatilizzazione e conseguente formazione di una struttura carboniosa amorfa. Ancora si è potuto osservare che intorno a 330°C iniziano a comparire i primi composti aromatici, e infine che sopra i 600°C inizia la carbonizzazione in cui viene rimossa la maggior parte degli atomi non di carbonio.

Dal punto di vista della composizione, durante la deidratazione e la pirolisi avviene l'allontanamento dei costituenti principali della biomassa, quali C, H e O. In particolare H e O lasciano la biomassa nel primo stadio come acqua, poi come idrocarburi, vapori di tar, H₂, CO e CO₂ (Antal e Grønli, 2003). Ovviamente H e O hanno in proporzione tassi di allontanamento molto superiori a C. Infatti, escludendo i biochar ad alto contenuto di ceneri inorganiche, il contenuto di carbonio in peso passa da un 40-50% nella biomassa iniziale, a un 70-80% dopo la fase di pirolisi.

I biochar, dunque, sono caratterizzati da un alto contenuto di carbonio che può raggiungere anche il 90%. La composizione chimica elementare di una serie di biochar prodotti da varie biomasse è riportata in tabella 1.2.

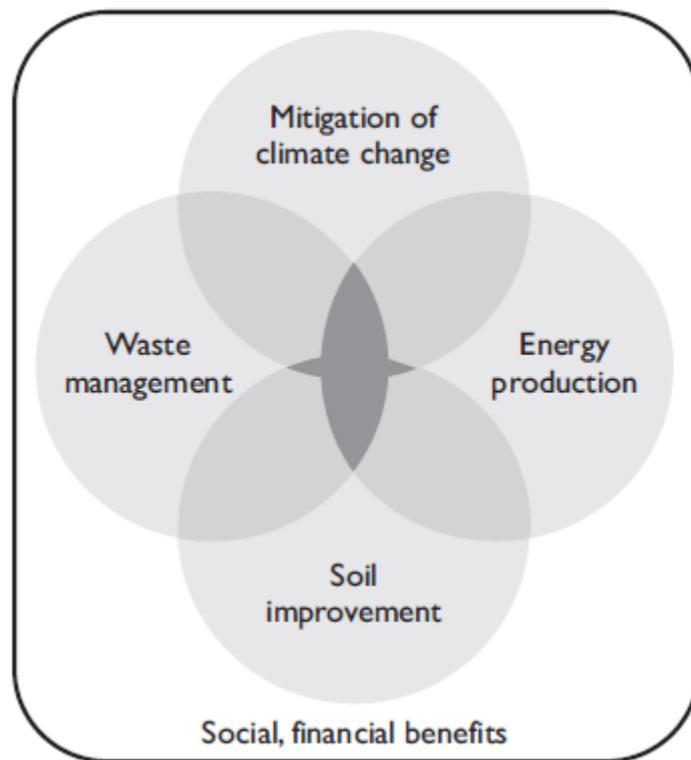
Tabella 1.2: Composizione elementare di biochar prodotti da varie biomasse (Demirbas et al., 2004)

Materia prima	Composizione elementare (%)			
	C	H	N	O
Tronchi di faggio	87,9	2,9	0,6	10,6
Residui di colza	66,6	2,5	6,1	24,3
Corteccia di legno	85,0	2,8	-	12,2
Gambo di cotone	72,2	1,2	-	26,6
Legno di noccioli	95,6	1,3	-	3,1

1.1.4 Benefici del biochar

I vantaggi associati all'utilizzo del biochar, che possono motivarne la produzione e l'applicazione per la gestione ambientale, sono costituiti dal miglioramento delle caratteristiche del suolo - migliore produttività nonché riduzione dell'inquinamento; da una migliore gestione dei rifiuti; dalla mitigazione dei cambiamenti climatici e dalla produzione di energia (Figura 1.5), che singolarmente o combinati comportano un vantaggio sociale e/o finanziario.

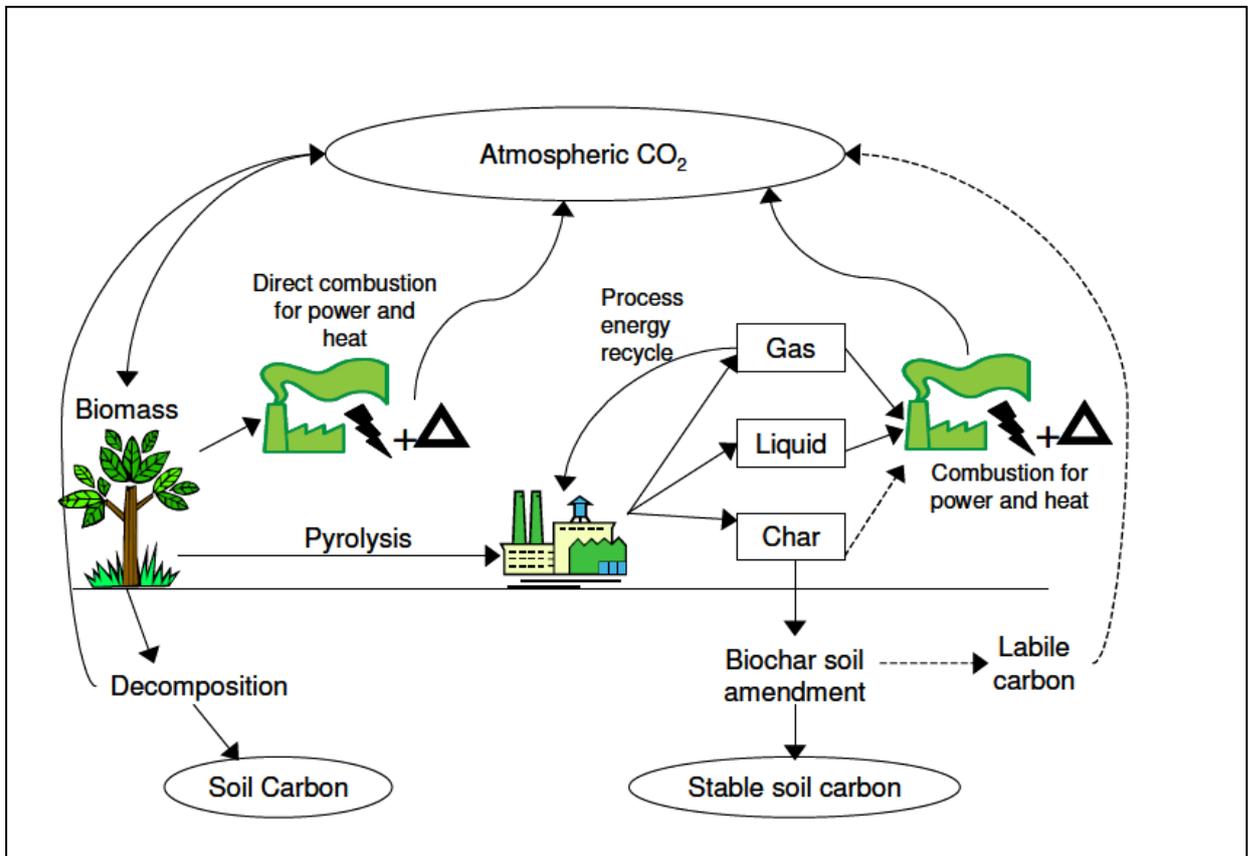
Figura 1.5: Vantaggi associati all'utilizzo del biochar



Fonte: Johannes Lehmann

Nella figura sottostante vengono sinteticamente rappresentati i principali flussi di carbonio associati alla pirolisi di biomasse e all'utilizzo di biochar.

Figura 1.6: Principali flussi di carbonio associati alla pirolisi di biomasse



Fonte: Brownsort, 2009

Biochar in agricoltura

È stato dimostrato che l'uso del biochar come ammendante in agricoltura aumenta la resa delle colture attraverso numerosi meccanismi. In particolare si è rilevato che l'aggiunta di biochar nei suoli ne migliora la ritenzione idrica, la struttura, e ne aumenta l'attività microbica, soprattutto quando applicato a suoli poveri o degradati (Blackwell et al., 2009). Inoltre, è molto importante l'apparente stabilità biologica e chimica del biochar, che gli consente di agire come *sink* di carbonio, così da fornire vantaggi di lunga durata al suolo.

Tutti i suddetti vantaggi, che migliorano le rese agricole, sono importanti a fronte dell'aumento della domanda di prodotti alimentari, conseguente alla crescita della popolazione mondiale, e al diffuso degrado dei suoli causato dalle vigenti pratiche agricole.

Va altresì messo in luce come l'uso del biochar nei Paesi in via di sviluppo potrebbe rappresentare, dal punto di vista della fertilità dei suoli e delle rese agricole, una soluzione importante. Essendo, infatti, i sistemi per la produzione di biochar non molto costosi, si potrebbero sfruttare le risorse locali esistenti, come ad esempio residui agricoli e biomassa fresca, per aumentare appunto la fertilità dei suoli e quindi le rese agricole (Lehmann et al., 2009).

Esiste tuttavia ancora qualche incertezza circa l'uso del biochar in agricoltura. In particolare si è visto che le rese agricole variano in base a fattori quali il tipo di suolo, il clima, la specie di pianta studiata, la biomassa originale e le condizioni di pirolisi (Blackwell et al, 2009).

Biochar e gestione dei rifiuti

I rifiuti forestali e agricoli, le deiezioni animali, i fanghi di depurazione, la frazione organica dei rifiuti solidi urbani e dei rifiuti industriali possono dar luogo a emissioni di gas serra quando vengono smaltiti o lasciati a decomporsi, oltre a determinare l'inquinamento dei suoli e delle acque superficiali. In particolare, per quanto riguarda le emissioni di gas serra, si può verificare il rilascio di metano da discarica, protossido di azoto derivante da un uso improprio dei rifiuti su terreni agricoli, così come di anidride carbonica da combustione o decomposizione naturale all'aperto.

L'uso della pirolisi per il trattamento di tali rifiuti, oltre che consentire la produzione di energia, può quindi evitare le emissioni di ossidi di azoto e metano e può bloccare una parte di carbonio in forma stabile nel biochar. La pirolisi, inoltre, può portare come ulteriore e significativo beneficio la riduzione del volume e del peso dei rifiuti destinati allo smaltimento (Lehmann et al., 2009), fornendo un'alternativa non certo di poco conto alle attuali problematiche di gestione quantomeno di alcune tipologie di rifiuti (rifiuti forestali e agricoli, deiezioni animali, fanghi di depurazione, frazione organica dei rifiuti solidi urbani e dei rifiuti industriali).

Biochar e mitigazione dei cambiamenti climatici

I cambiamenti climatici causati dalle emissioni antropogeniche di gas serra sono considerati da molti una sfida significativa per l'umanità. Gran parte dell'attività volta a mitigare i cambiamenti climatici è attualmente impegnata ad evitare le emissioni di gas serra attraverso la riduzione dell'uso di combustibili fossili e attraverso cambiamenti nella gestione del territorio e nelle pratiche agricole. Vi è comunque una crescente consapevolezza che le misure messe in atto per ridurre le emissioni di gas serra sono insufficienti al fine di evitare un drastico cambiamento climatico. Alla luce di ciò, i metodi per rimuovere l'anidride carbonica dall'atmosfera sono di crescente interesse. Tra di essi, un metodo di particolare interesse in grado di trattenere per un lungo periodo carbonio nel suolo in forma inerte è rappresentato dal biochar.

L'aggiunta di biochar al suolo, infatti, determina una riduzione dell'anidride carbonica atmosferica. Va innanzitutto ricordato che la biomassa vegetale che si forma nell'arco di anni in genere si decompone rapidamente. Tale decomposizione rilascia nuovamente in atmosfera la CO₂, che era stata fissata dalle piante attraverso la fotosintesi. Al contrario, la trasformazione della biomassa in biochar, che si decompone molto più lentamente, fa sì che il carbonio passi dal ciclo biologico rapido al ciclo del biochar molto più lento (Lehmann, 2007b). Perché ciò si verifichi, tuttavia, è anche necessario che il biochar sia molto più stabile della biomassa da cui si è formato, come dimostrato da numerosi studi.

Le stime sul potenziale di cattura del carbonio attraverso l'utilizzo di biochar non sono molte, ma suggeriscono che su scala globale tale potenziale potrebbe raggiungere livelli elevati, superando addirittura le emissioni attuali di combustibili fossili (Lehmann et al., 2006). Tali stime comunque si basano su varie ipotesi.

Biochar e produzione di energia

La pirolisi e la gassificazione mediante combustione delle biomasse a certe condizioni, ossia la prima in atmosfera inerte e la seconda con ossigeno substechiometrico, producono gas combustibile di sintesi (syngas), olio (bio-olio) e char. I primi due possono essere utilizzati per produrre energia e calore. La frazione

liquida, inoltre, può essere impiegata come materia prima per combustibili e prodotti chimici.

Il char prodotto può essere usato come combustibile direttamente o in co-combustione con altri combustibili solidi. Nella sua forma tradizionale, ossia come charcoal, è ampiamente utilizzato per la cottura di cibi, in particolare in Africa e in altre regioni in via di sviluppo. I tradizionali processi di produzione del carbone sono spesso inefficienti e sono visti come una fonte importante di degrado ambientale a causa della deforestazione e dell'inquinamento nelle zone rurali (Kammen et al., 2005). L'uso della pirolisi nei Paesi in via di sviluppo potrebbe migliorare l'efficienza e la sostenibilità, riducendo la quantità di biomassa necessaria per produrre la stessa quantità di carbone e consentendo l'uso di rifiuti agricoli come materia prima alternativa al legno.

1.1.5 Probabili inquinanti nel biochar

In letteratura sono presenti alcuni studi (Garcia-Perez M. et al., 2008, 2009) sul potenziale sviluppo di pericolose sostanze tossiche nel biochar come risultato del processo di pirolisi della biomassa e l'impatto potenziale di questi prodotti sull'ambiente. In particolare, in tali lavori è stata studiata la possibile formazione durante la pirolisi di policlorodibenzofurani (PCDF), policlorodibenzo-p-diossine (PCDD) e idrocarburi policiclici aromatici (IPA), e si è concluso che la presenza degli stessi non è riscontrabile nei biochar prodotti da pirolisi veloce e pirolisi lenta.

Per quanto riguarda gli IPA, in particolare, è noto che essi si formano in grandi quantità da reazioni termo-chimiche secondarie a temperature superiori a 700°C (Ledesma et al., 2002). Esistono tuttavia prove scientifiche in base alle quali è possibile dimostrare che piccole quantità di questi composti possono essere prodotte anche alla gamma di temperature utilizzate nei reattori di pirolisi (350 – 600°C). Viene quindi evidenziata la necessità di esaminare i meccanismi e le cinetiche coinvolte nella creazione di questi composti come sistema per limitare la loro sintesi in pirolisi.

Per quanto riguarda invece le PCDD, i due principali meccanismi proposti per spiegarne la formazione durante l'incenerimento dei rifiuti solidi urbani sono la pirosintesi (o meccanismo precursore) e la sintesi *de novo*. Entrambi possono verificarsi in modo simultaneo e/o indipendente.

La pirosintesi presuppone che le PCDD si formino dalla policondensazione dei precursori (policlorobifenili, policlorobenzeni), che si formano a loro volta ad una temperatura di circa 1000°C.

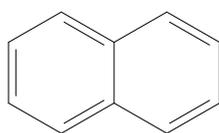
La sintesi *de novo*, invece, implica la presenza di carbonio in fase solida e di O₂ e avviene a temperature comprese tra i 200 e i 400°C.

La mancanza di ossigeno nei reattori di pirolisi, il contenuto molto basso di cloro nella biomassa e il fatto che i precursori di formazione delle PCDD dovrebbero essere generati a temperature elevate di circa 1200°C, potrebbe spiegare perché non è possibile trovare alcun riscontro della presenza di PCDD e PCDF nel biochar.

1.2 Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

1.2.1 Caratteristiche generali e struttura degli IPA

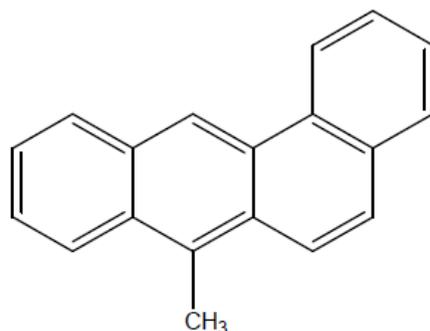
Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici costituiscono un'ampia classe di composti organici che si formano durante la combustione incompleta e la pirolisi di materiali organici. Gli IPA sono caratterizzati, dal punto di vista strutturale, dalla presenza di anelli aromatici e non aromatici contenenti 5 o 6 atomi di carbonio, condensati in un'unica struttura con disposizione angolare e/o lineare. Il più semplice è il naftalene ($C_{10}H_8$) che si può considerare derivante dalla fusione di due molecole di benzene.



Naftalene

Teoricamente il numero di IPA è enorme; per esempio, i composti diversi con cinque anelli benzenici, nelle varie combinazioni, possono essere ventidue. È possibile ottenere 88, 333 e 1448 composti, utilizzando rispettivamente sei, sette e otto anelli. Inoltre, si conoscono molti idrocarburi polibenzenoidi che vengono denominati benzo-derivati, nei quali la posizione di fusione è identificata da una lettera tra parentesi, che indica su quale lato del sistema genitore è avvenuta la fusione:

Figura 1.7: Metilbenz[a]antracene



L'estrema eterogeneità di tale classe di composti è ulteriormente incrementata dalla possibile presenza di anelli pentatomici, che inducendo variazioni alla planarità può portare fino ai sistemi tridimensionali dei fullereni.

Tale eterogeneità rende molto difficile lo studio dell'intera classe nelle matrici ambientali, infatti in letteratura gli studi di monitoraggio si riferiscono spesso ad un numero limitato di IPA.

La *United States Environment Protection Agency* (EPA) e la *World Health Organization* (WHO) hanno identificato all'interno della suddetta classe 16 composti definiti "inquinanti prioritari", dal naftalene a composti contenenti fino a sei anelli fusi, come serie di riferimento e set rappresentativo di contaminanti policiclici aromatici (tabella 1.3).

Si tratta di una lista coerente di IPA, dato che essi si trovano generalmente assieme nell'aria, nel suolo e nell'acqua. Ciò che varia in funzione dell'origine (emissione di motori diesel o a benzina, sigarette, inceneritori), è lo stato fisico (fase gassosa o fase particellare) e la distribuzione dei 16 IPA, tanto che si possono identificare IPA come markers caratterizzanti un evento o un sito.

L'attenzione allo sviluppo di metodi di identificazione e successiva quantificazione degli IPA in varie matrici ambientali è legata al fatto che essi formano una vasta classe di composti carcinogenici e di inquinanti mutagenici.

Nella tabella sottostante (tabella 1.3) è riportato l'elenco dei 16 IPA prioritari dell'EPA.

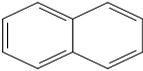
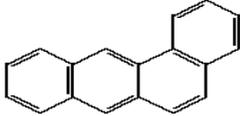
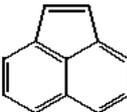
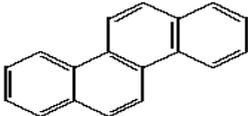
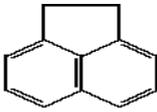
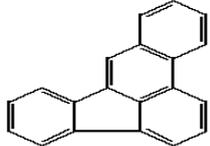
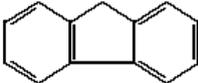
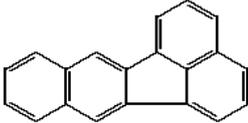
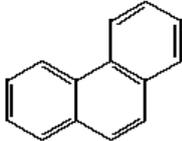
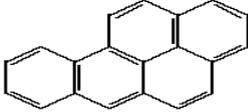
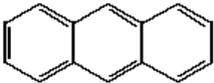
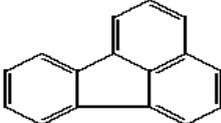
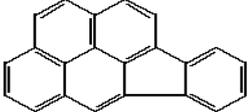
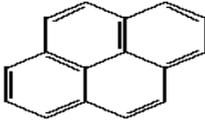
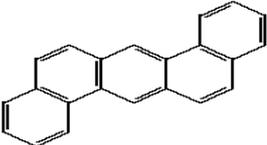
NOME FORMULA	STRUTTURA	NOME FORMULA	STRUTTURA
NAFTALENE C ₁₀ H ₈		BENZO[<i>a</i>] ANTRACENE C ₁₈ H ₁₂	
ACENAFTILENE C ₁₂ H ₈		CRISENE C ₁₈ H ₁₂	
ACENAFTENE C ₁₂ H ₁₀		BENZO[<i>b</i>] FLUORANTENE C ₂₀ H ₁₂	
FLUORENE C ₁₃ H ₁₀		BENZO[<i>k</i>] FLUORANTENE C ₂₀ H ₁₂	
FENANTRENE C ₁₄ H ₁₀		BENZO[<i>a</i>] PIRENE C ₂₀ H ₁₂	
ANTRACENE C ₁₄ H ₁₀		BENZO[<i>ghi</i>] PERILENE C ₂₂ H ₁₂	
FLUORANTENE C ₁₆ H ₁₀		INDENO[1,2,3- <i>cd</i>] PIRENE C ₂₂ H ₁₂	
PIRENE C ₁₆ H ₁₀		DIBENZO[<i>ah</i>] ANTRACENE C ₂₂ H ₁₄	

Tabella 1.3: I 16 IPA prioritari dell'EPA

1.2.2 Proprietà chimico-fisiche degli IPA

Le proprietà chimico-fisiche sono di estrema importanza poiché danno informazioni circa la distribuzione e la reattività di una sostanza nell'ambiente.

Gli IPA sono solidi a temperatura ambiente e hanno punti di fusione e di ebollizione elevati. La loro tensione di vapore è generalmente bassa ed è inversamente proporzionale al numero di anelli. Per questo motivo spesso gli IPA nell'atmosfera sono associati con il particolato. Inoltre si può osservare come, al diminuire della temperatura, gli IPA aventi peso molecolare più elevato (più di 4 anelli), caratterizzati da una bassa tensione di vapore, tendano rapidamente a condensare e a venire adsorbiti dalla superficie delle particelle di fuliggine e di cenere, mentre quelli a minore peso molecolare (3 anelli), aventi più elevata tensione di vapore, rimangono parzialmente nella fase di vapore. Quindi nell'aria gli IPA ad elevato peso molecolare si trovano esclusivamente legati al particolato, mentre quelli a basso peso molecolare possono anche trovarsi in fase gassosa (N. Ohkouchi et al., 1999).

In genere gli IPA, per le loro caratteristiche chimico-fisiche, presentano mediamente una solubilità in acqua piuttosto bassa che tende a diminuire con l'aumento del peso molecolare, per cui gli IPA con più di quattro anelli si trovano sempre legati alle sostanze particellari, mentre gli IPA a basso peso molecolare (2 o 3 anelli) possono anche trovarsi in soluzione nei sistemi acquosi.

Gli IPA adsorbiti nei suoli o nei sedimenti, una volta "bloccati", risultano più resistenti ai processi degradativi ad opera dei batteri e/o a quelli dovuti all'esposizione agli agenti atmosferici e alla luce (P. M. Gewend et al., 1981).

1.2.3 Sorgenti e meccanismi di formazione

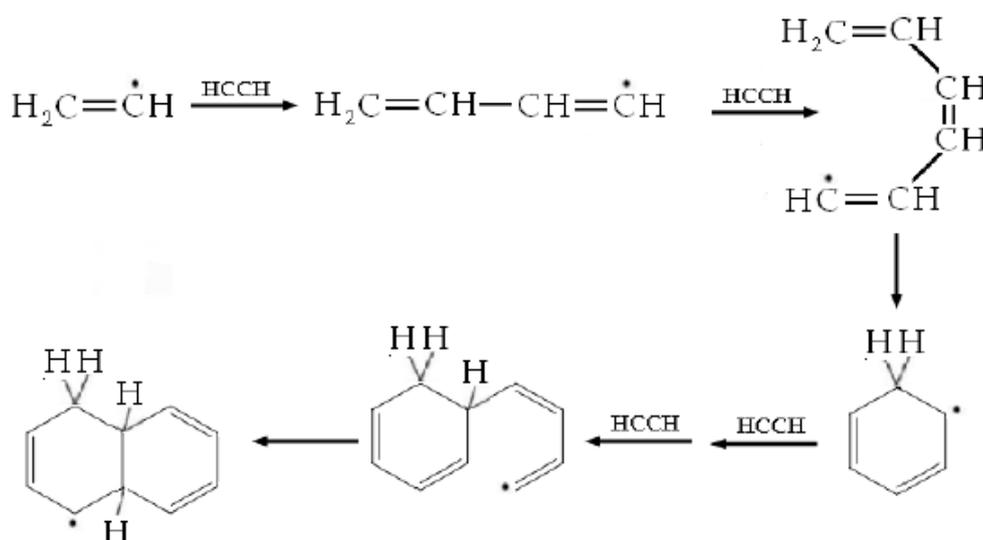
Gli IPA si possono formare durante la lenta maturazione della materia organica (origine petrogenica) e durante la combustione incompleta o la pirolisi di materiali organici (origine pirogenica) (Soclo H. H. et al., 2000).

Gli IPA di origine petrogenica rappresentano una frazione variabile della composizione chimica dei combustibili fossili. Questo tipo di origine implica una formazione diagenica caratterizzata da temperature relativamente basse (100-150 °C) e tempi di formazione su scala geologica (milioni di anni).

Gli IPA di origine pirogenica sono, invece, generati dalla combustione incompleta o dalla pirolisi di sostanza organica. I meccanismi di formazione non sono ancora ben chiari, ma si può ipotizzare che, quando la pirolisi avviene ad alte temperature (650-900 °C) e in carenza di ossigeno, la formazione degli IPA sia favorita; infatti, generalmente, con il diminuire del rapporto ossigeno-combustibile si ha un incremento della loro velocità di formazione.

In generale, è stato proposto da vari autori (Simoneit B.R.T., 1998; Andelman J. B. et al., 1970) un meccanismo di tipo radicalico:

Figura 1.8: Meccanismo di formazione degli IPA da processi di combustione (pirosintesi)



Inizialmente avviene una ripolimerizzazione in carenza di ossigeno dei frammenti di idrocarburo che si formano durante il processo di *cracking*, termine con cui è indicato il processo di demolizione delle frazioni più alto bollenti in frazioni più volatili. Durante questo processo, le molecole si riarrangiano in molecole più piccole, e inizialmente si nota il prevalere dei frammenti contenenti due soli atomi di carbonio. Questi radicali liberi a due atomi di carbonio reagiscono con una molecola di acetilene (C_2H_2). Il risultato di tale reazione è un altro radicale a quattro atomi di carbonio, che a sua volta può aggiungere un'altra molecola di acetilene e formare un

anello a sei atomi di carbonio. A questo punto, l'atomo di idrogeno, legato al carbonio del CH_2 , può staccarsi dando origine a una molecola di benzene o aggiungere altre molecole di acetilene dando luogo a catene laterali che formano ulteriori anelli benzenici condensati.

Le fonti di emissione degli IPA possono essere distinte in naturali ed antropiche. Le fonti di origine naturale sono dovute a:

- ✓ eruzioni vulcaniche
- ✓ incendi di foreste

mentre quelle antropiche sono dovute a:

- ✓ combustione di prodotti fossili come il coke
- ✓ combustione di sostanze organiche come il legno, la cellulosa ed il tabacco
- ✓ incenerimento dei rifiuti solidi urbani
- ✓ fumi di scarico di motori a scoppio, in particolar modo quelli provenienti da motori a diesel
- ✓ impianti di produzione di energia elettrica

Le fonti di emissione degli IPA possono essere inoltre classificate in mobili e stazionarie. Appartengono alla prima classe il traffico aereo, nautico e ferroviario oltre a quello di veicoli a motore su strada, che nelle aree urbane rappresenta spesso la fonte prevalente di IPA.

Tutti i motori a combustione interna hanno diverse caratteristiche di emissione degli IPA che dipendono dalla temperatura del motore, carico, carburante, velocità, età e stato di manutenzione (Commissione europea, 2001). L'uso di convertitori catalitici ha effetti significativi sulla riduzione della concentrazione di IPA nei gas di scarico.

Tra le fonti di emissione stazionarie si possono annoverare gli impianti di produzione di alluminio, ferro e acciaio, gli impianti di riscaldamento e quelli di incenerimento dei rifiuti solidi urbani.

Gli impianti di riscaldamento producono una parte consistente degli IPA immessi in atmosfera. Ciò si verifica soprattutto nei Paesi in cui si fa ancora un

massiccio uso di carbone e legna per il riscaldamento. Attualmente invece, nei Paesi industrializzati, sia l'impiego di gas per il riscaldamento domestico che l'utilizzo di sistemi di abbattimento (come alcuni catalizzatori) hanno consentito una riduzione delle loro emissioni dagli impianti di riscaldamento.

1.2.4 Tossicità degli IPA

Gli IPA vengono studiati con attenzione per un duplice motivo: per il ruolo che giocano come precursori dell'O₃ fotochimico, responsabile di alterazioni delle funzioni polmonari, e per la riscontrata tossicità di alcuni di essi.

In particolare, alcuni IPA sono classificati come “probabilmente cancerogeni per l'uomo” e altri come “possibilmente cancerogeni per l'uomo” dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC). Fino ad ora la IARC ha classificato 48 IPA in funzione della loro capacità di fungere da induttori tumorali. Per il benzo[*a*]pirene è stata di recente provata la cancerogenicità sull'uomo, con conseguente riclassificazione da 2B (possibile cancerogeno) a 1 (cancerogeno per l'uomo). Il benzo[*a*]pirene, inoltre, e sostanzialmente tutti gli IPA più pesanti del fluorantene, per la loro capacità di accumularsi in suoli e sedimenti e le loro proprietà di bioconcentrazione, sono anche classificati come PBTs (Persistent, Bioaccumulable, and Toxic) dall'EPA (*Environmental Protection Agency*).

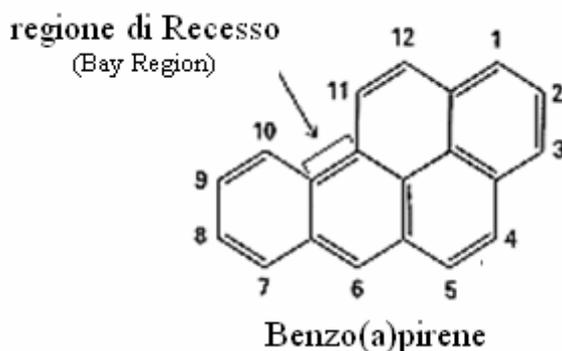
Nella tabella 1.4 viene riportata la valutazione di cancerogenicità dei 16 IPA prioritari dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro.

Tabella 1.4: Classificazione IARC per i 16 IPA prioritari

IPA	IARC	IPA	IARC
Naftalene	3	Crisene	3
Acenaftilene	N/A	Benzo[<i>a</i>]antracene	2A
Acenaftene	N/A	Benzo[<i>b</i>]fluorantene	2B
Fluorene	3	Benzo[<i>k</i>]fluorantene	2B
Fenantrane	3	Benzo[<i>a</i>]pirene	1
Antracene	3	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	2B
Fluorantene	3	Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	2A
Pirene	3	Benzo[<i>ghi</i>]perilene	3

N/A = dato non disponibile. 1 = cancerogeno per l'uomo. 2A = probabile cancerogeno per l'uomo. 2B = possibile cancerogeno per l'uomo. 3 = non classificato.

Le posizioni relative degli anelli condensati degli IPA svolgono un ruolo importante nel determinarne il livello di potenzialità cancerogena. Gli IPA, che rappresentano gli agenti cancerogeni più potenti, possiedono una regione di recesso (*bay region*) formata da una ramificazione nella sequenza di atomi degli anelli benzenici.



La tossicità primaria degli IPA, in realtà, è molto bassa, ma in seguito a reazioni di biotrasformazione (e in particolare la formazione di diolo-epossido), la tossicità aumenta notevolmente.

L'azione mutagenica del benzo[*a*]pirene inizia con la sua metabolizzazione in vari tessuti e organi (pelle, placenta, polmoni, esofago, colon, fegato, ecc.) e in genere il primo passo del suo metabolismo, finalizzato ad aumentarne l'idrofilicità e facilitarne l'escrezione attraverso urine e feci, è un'ossidazione. La reazione è catalizzata dal sistema enzimatico citocromo P450 associato al reticolo endoplasmatico delle cellule e porta alla formazione di epossidi e specie idrossilate in varie posizioni, che possono subire a loro volta ulteriori trasformazioni metaboliche. Quindi, mentre il benzo[*a*]pirene di per sé non è un agente cancerogeno (è infatti un agente precancerogeno, che richiede bioattivazione), nel corso di queste reazioni metaboliche possono formarsi degli intermedi elettrofili (cancerogeni e genotossici), capaci di interagire con varie macromolecole biologiche, compreso il DNA.

1.2.4.1 Tossicità equivalente (TEQ)

Un utile strumento per valutare la tossicità di una miscela di IPA è dato dal calcolo della tossicità equivalente (TEQ).

Diversi studi forniscono, infatti, per ognuno dei più comuni idrocarburi policiclici aromatici un relativo fattore di tossicità equivalente (TEF) che rappresenta il valore di tossicità di tale molecola rispetto al benzo[*a*]pirene al quale è stato assegnato un valore di TEF uguale a 1.

Moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun IPA per il TEF corrispondente e sommando i diversi contributi, si ottiene il TEQ:

$$\text{TEQ} = \sum_i [\text{IPA}]^i \text{TEF}^i$$

È necessario tuttavia sottolineare che in vari studi si è visto, mediante il confronto tra l'attività cancerogena calcolata in base ai TEF e quella osservata sperimentalmente, come l'uso del TEQ porti a sottostimare significativamente la reale cancerogenicità delle miscele complesse di IPA. Per esempio, in alcuni studi (Culp et al., 1998), in cui è stato saggiato il potenziale cancerogeno di residui catramosi della distillazione del coke con un contenuto noto di IPA cancerogeni, si è verificato che l'attività cancerogena calcolata sulla base del TEQ era di oltre 3 volte inferiore a quella osservata sperimentalmente.

1.3 Scopo della tesi

In letteratura esistono numerosi studi sui vantaggi associati all'utilizzo del biochar. Non altrettanto si può dire per quanto concerne i possibili effetti negativi dovuti alla presenza di inquinanti nel biochar. In particolare, pur essendo nota la possibile formazione di IPA durante la produzione del biochar, non vi è traccia in letteratura di metodi specifici e validati per la determinazione degli stessi nel biochar.

Lo scopo di questa tesi è di sviluppare un metodo analitico affidabile per la determinazione degli IPA nel biochar, valutando le principali figure di merito.

Inizialmente è stata condotta un'approfondita ricerca bibliografica sia sulle caratteristiche chimico-fisiche degli IPA sia sui metodi finora utilizzati per la loro determinazione in matrici complesse simili al biochar.

È da sottolineare che generalmente i metodi descritti in letteratura per la determinazione degli IPA in matrici complesse utilizzano solventi tossici e purificazioni su colonna cromatografica, che richiedono una notevole quantità di solvente, e non sempre sono accompagnati da recuperi soddisfacenti.

Durante lo svolgimento della tesi oltre all'esigenza di sviluppare un metodo sensibile ed affidabile si è prestata attenzione agli aspetti legati ai rischi per la salute e all'ambiente. Per ottimizzare il metodo è stato scelto un campione di biochar utilizzato di recente in studi agronomici.

La determinazione di composti in traccia come gli IPA in una matrice complessa come il biochar è particolarmente difficile e richiede l'attuazione di misure specifiche durante l'intero ciclo analitico, dalle fasi pre-analitiche di conservazione e trattamento a quelle più direttamente strumentali di quantificazione finale, al fine di ridurre gli errori (contaminazione, perdita).

La seconda parte della tesi è stata dedicata all'applicazione del metodo per la determinazione degli IPA in campioni reali di biochar. Lo scopo è quello sia di verificare la robustezza del metodo sia di conoscere le concentrazioni di IPA in biochar di diversa origine. Questo secondo aspetto è importante per avere informazioni sui fattori che determinano la formazione di IPA nel biochar quale materiale di partenza e condizioni di processo.

In particolare sono stati analizzati i seguenti campioni:

- biochar prodotti da varie biomasse con differenti temperature di pirolisi ed utilizzati in esperimenti di interrimento nei suoli
- char prodotti dalla pirolisi di biomassa erbacea (panico) a diverse condizioni di pirolisi con un pirolizzatore da banco. Si è così proceduto al fine di verificare, utilizzando la stessa biomassa e lo stesso sistema pirolitico, l'effetto della temperatura e del tempo di residenza sulla concentrazione degli IPA
- char ottenuti dalla pirolisi di biomasse algali: *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*.

L'ultima parte della tesi ha affrontato in modo preliminare l'analisi dei suoli ammendati con biochar.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

Filtri in fibra di vetro Whatman GF/C, diametro 47 mm, porosità 1,2 μm

Cartucce Sulpeco:

- DSC-Si silica tube, 6 mL, 1g
- LC-Alumina-B SPE tubes, 3 mL

Filtri a ditale: Acqualab 22 x 80 mm, ALBET 33 x 99 mm, MACHEREY-NAGEL
Frühere Massangabe 33 x 94 mm

Celite 500 fine (FLUKA, dried, type Norit RB4C, loss on ignition 900 °C ~ 3,6%,
pH ~ 7)

Quartz wool Agilent Technologies

Solventi

Cicloesano (Sigma – Aldrich, purezza 99,5%)

Acetone (Sigma – Aldrich, CHROMASOLV per HPLC, purezza \geq 99,8%)

Acetonitrile (Sigma – Aldrich, CHROMASOLV per HPLC, purezza min. 99,9%)

Diclorometano (Sigma – Aldrich, purezza 99,9%)

Toluene (Aldrich, purezza 99,8%, anhydrous)

Nonano (Aldrich, purezza $>$ 99%, anhydrous)

Etile acetato (Riedel – de Haën, purezza 99,5%)

Soluzioni standard

EPA 525, 525.1 (Internal Standard Mix – SUPELCO).

Come surrogati degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono stati utilizzati i seguenti IPA deuterati (IPA ²H): antracene-d₁₀, fenantrene-d₁₀, crisene-d₁₂. Si è quindi fatto uso della soluzione di cui sopra contenente 500 µg di ciascun surrogato in 1 mL di acetone/cicloesano (500 mg/L). Tale soluzione è stata diluita con acetone/cicloesano (1:1, v:v) 1/100 ottenendo la soluzione a 5 mg/L, di cui si è successivamente fatto uso per determinare i recuperi e calcolare la concentrazione di IPA nel Biochar.

PAH Calibration Mix

Per gli IPA prioritari si è utilizzata la soluzione PAH Calibration Mix della Supelco, contenente 10 µg di ciascun IPA in 1 mL di acetonitrile. Tale soluzione è stata diluita 1/10 con acetone/cicloesano (1:1, v:v), ottenendo la soluzione 1 mg/L, di cui si è successivamente fatto uso per determinare i fattori di risposta dei vari IPA.

Gli IPA presenti nella soluzione PAH Calibration Mix sono i seguenti:

- Naftalene (purezza 99,7%, concentrazione 9,97 µg/mL)
- Acenaftilene (purezza 99,7%, concentrazione 10,03 µg/mL)
- Acenaftene (purezza 99,9%, concentrazione 9,88 µg/mL)
- Fluorene (purezza 99,6%, concentrazione 9,89 µg/mL)
- Fenantrene (purezza 95,9%, concentrazione 9,88 µg/mL)
- Antracene (purezza 99,9%, concentrazione 9,92 µg/mL)
- Fluorantene (purezza 99,5%, concentrazione 9,87 µg/mL)
- Pirene (purezza 96,6%, concentrazione 9,94 µg/mL)
- Crisene (purezza 98,4%, concentrazione 9,92 µg/mL)
- Benzo[a]antracene (purezza 98,9%, concentrazione 9,91 µg/mL)
- Benzo[b]fluorantene (purezza 99,9%, concentrazione 9,89 µg/mL)
- Benzo[k]fluorantene (purezza 99,5%, concentrazione 9,87 µg/mL)
- Benzo[a]pirene (purezza 99,9%, concentrazione 9,65 µg/mL)
- Indeno[1,2,3-*cd*]pirene (purezza 99,9%, concentrazione 9,93 µg/mL)
- Dibenzo[*a,h*]antracene (purezza 99,9%, concentrazione 9,92 µg/mL)
- Benzo[*ghi*]perilene (purezza 98,3%, concentrazione 9,91 µg/mL)

1,3,5-tertributilbenzene

La soluzione *stock* di 1,3,5-tertributilbenzene a 1270 mg/L è stata ottenuta sciogliendo 12,7 mg del composto in 10 mL di cicloesano. Tale soluzione è stata diluita 1/100 con acetone/cicloesano (1:1, v:v), ottenendo la soluzione 12,7 mg/L utilizzata nell'analisi degli IPA.

2.1.1 Campioni

La messa a punto del metodo analitico per l'analisi quantitativa degli IPA è stata effettuata utilizzando un campione di biochar fornito dalla Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali (DISA) dell'Università di Udine ed identificato nel presente lavoro con la sigla BC-RIF. Tale biochar è stato prodotto in un impianto di produzione situato a Bagnacavallo (RA) mediante pirolisi a 500°C di residui di potatura di frutteto (Fellet G. et al., 2011).

Una volta valutati i vari aspetti della procedura analitica, la stessa è stata applicata a un campione rappresentativo dei biochar attualmente disponibili sul mercato, prodotti da varie biomasse con differenti temperature di pirolisi (da 410 °C a 850 °C) e tempo di residenza (da secondi a ore), al fine di determinare la concentrazione degli IPA negli stessi.

Una parte dei suddetti biochar, di seguito identificati con le sigle BC-1, BC-2, BC-3, BC-4, BC-5, BC-6, BC-7 e BC-8, è stata selezionata tra 30 ottenuti da diversi produttori di biochar e laboratori di ricerca (*Dyanamotive, EPIRDA (Earth, People, Research, Innovation, Development, and Acknowledgement), Best Energies, Pacific Pyrolysis, University of Minnesota, Northern Tilt, Willinger Brothers, Chip Energy, Cowboy Charcoal, Illinois Sustainability and Technology Center, Siemens, Harsco Technology Corporation, Alterna Bioenergy, University of Georgia, e the National Council of Air and Stream Improvement*).

Tali biochar sono oggetto di una ricerca del *US Department of Agriculture – Agricultural Research Service (USDA-ARS) Biochar and Pyrolysis Initiative*, attualmente in corso, riguardante gli effetti dell'aggiunta di biochar sulla produzione di gas serra. I 30 biochar, prodotti da varie biomasse con temperatura di pirolisi che va da 410 °C a 850 °C e con un tempo di residenza da secondi a ore, forniscono uno spaccato di quelli attualmente disponibili sul mercato.

Nel presente lavoro sono stati sottoposti ad analisi anche char di *Panicum virgatum* (panico) e di alghe prodotti nel Laboratorio di Scienze Ambientali “R. Sartori”, Centro Interdipartimentale di Ricerca in Scienze Ambientali (C.I.R.S.A.).

I primi sono stati ottenuti dalla pirolisi di circa 3 g di biomassa di panico, mentre quelli di alghe dalla pirolisi di circa 1 g delle seguenti 3 alghe: *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*. Il processo di produzione di tali biochar verrà descritto nel dettaglio in seguito.

Si sono, infine, effettuate delle prove per verificare l'efficienza del metodo nella determinazione degli IPA in suoli trattati con biochar. I campioni di suolo trattati e non trattati con biochar BC-RIF sono stati gentilmente forniti dall'Istituto di Biometeorologia (IBIMET) del CNR.

GBW 11111a: Carbone certificato

Certificatore: China National Centre for Quality Supervision and Test of Coal (Beijing, China). Produttore: Shandong Metallurgical Research Institute, Jinan (China).

2.2 Strumentazioni e metodologie

2.2.1 Pirolisi – GC/MS

La strumentazione utilizzata è composta da tre moduli:

- 1) Il **pirolizzatore** a filamento CDS Pyroprobe 1000. È dotato di una consolle da cui è possibile impostare i parametri strumentali e da una sonda recante il filamento a serpentina entro cui viene posto il campione. L'interfacciamento con la colonna cromatografica avviene per mezzo della camera di pirolisi, montata sull'iniettore del gascromatografo.
- 2) Il **gascromatografo** Varian Star 3400 dotato di una colonna capillare HP-5MS contenente polidimetilsilossano come fase stazionaria (lunghezza 30 m, diametro 0,25 mm, spessore del film 0.25 μm). Il gas carrier è elio (flusso 100 mL/min) e il rapporto di split è regolato a 1/200 del flusso totale.
- 3) Lo **spettrometro di massa** Varian Saturn 2000 interfacciato alla colonna cromatografica. Lo spettrometro funziona con frammentazione ad impatto elettronico (70 eV) e selettore di massa a quadrupolo.

Dopo aver eseguito la procedura di *clean* del pirolizzatore (pretrattamento alla temperatura di 1200 °C), una quantità (2-3 mg) esattamente pesata di campione è inserita nel tubicino portacampione di quarzo tramite un imbuto metallico. Il campione viene bloccato, circa al centro del tubicino, ostruendone le estremità con della lana di quarzo (Varian – Quartz Wool 10 gr).

Il tubicino portacampione è poi inserito nella spirale di platino della sonda pirolitica, a sua volta introdotta nella camera di pirolisi. Già prima dell'introduzione della sonda pirolitica nella camera di pirolisi all'interno della stessa, allo scopo di fare uscire l'aria presente, viene fatto fluire elio a 100 mL/min. Il campione viene quindi pirolizzato a 900 °C per 5 secondi alla massima velocità di riscaldamento. I prodotti di pirolisi, essendo la camera di pirolisi attraversata da un flusso di elio, vengono fatti fluire nella colonna cromatografica, passando attraverso un ago metallico che collega l'interfaccia, mantenuta a 300 °C, al gascromatografo.

La temperatura dell'iniettore è impostata a 300 °C. La separazione dei composti è avvenuta su colonna capillare 5% fenile 95% polidimetilsilossano come

fase stazionaria, usando elio come fase mobile ad un flusso di 100 mL/min. Le condizioni della colonna sono: iniziale 50 °C per 5 min, rampa termica di 5 °C/min per 52 min fino a 310 °C, 310 °C per 10 min.

La rivelazione MS è stata fatta con ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV, acquisendo il segnale in *full scan* nell'intervallo di m/z 45-650 La durata del solvent-delay è di 5 min.

Pirolisi da banco per la produzione di char

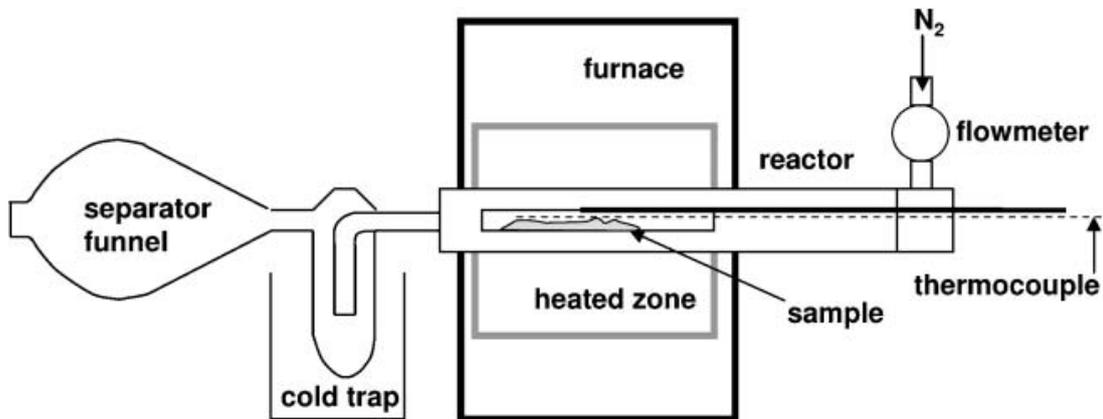
- Panico

I char prodotti dal laboratorio di chimica analitica del CIRSA sono stati ottenuti dalla pirolisi di 3 g di biomassa da panico a 450 °C, 550 °C e 650 °C per 5 minuti o per 20 minuti con un pirolizzatore da banco.

Il pirolizzatore è costituito da una fornace orizzontale, con un diametro interno di 45 mm, in cui è inserito un tubo di quarzo (lunghezza: 650 mm, diametro interno: 37 mm) con al centro un portacampione alloggiato su una termocoppia. All'inizio della camera di pirolisi è posto un sistema smontabile con 3 aperture: una per l'introduzione del gas inerte, una per la bacchetta di traino della termocoppia e una per la bacchetta della navicella portacampione. Quest'ultima è un semicilindro con un diametro di 20 mm e una lunghezza di 250 mm all'interno del quale è posto il campione da pirolizzare.

I campioni sono stati collocati in modo uniforme sulla navicella portacampione, il flusso di azoto è stato fissato a $1500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ed è stato acceso il forno. Non appena la temperatura interna del reattore ha raggiunto la temperatura stabilita (450 °C, 550 °C e 650 °C), il campione è stato posizionato nella parte centrale del forno per 5 minuti o per 20 minuti, quindi recuperato a monte nella parte più fredda del reattore.

Fig. 2.1: Schema del pirolizzatore da banco



Fonte: D. Fabbri et al., 2007

- **Microalghe**

I char da alghe sono stati ottenuti mediante pirolisi preparativa di circa un grammo di campione con il pirolizzatore da banco precedentemente descritto. Una quantità esattamente pesata (1 g) è stata disposta sulla superficie della navicella portacampione. Questa è stata inserita all'interno della camera di pirolisi, nella zona non riscaldata, ed è stato fatto fluire l'azoto con una portata di 1.5 l/min. Non appena la temperatura interna al reattore ha raggiunto 500 °C, si è fatta entrare la navicella portacampione nella zona centrale riscaldata del forno. Il campione è stato lasciato in questa zona riscaldata per 5 min al termine dei quali si è fatta raffreddare la fornace. Infine si è pesato il materiale rimasto nella navicella porta campione, ossia il char.

2.3 Determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici

Per la determinazione degli IPA nel biochar è stata sviluppata una nuova procedura di analisi basata sull'estrazione mediante Soxhlet con acetone/cicloesano (1:1, v:v), eliminazione della soluzione estraente tramite Rotavapor ed estrazione in fase solida (SPE) con gel di silice.

2.3.1 Preparazione del campione e dei materiali di estrazione

Tutti i campioni di biochar sono stati analizzati in forma pulverulenta. Alcuni, già in forma pulverulenta, sono stati analizzati tal quali; altri invece, presentandosi in forme aggregate, mediante un mortaio sono stati ridotti a una polvere fine.

I ditali di estrazione, i Soxhlet, i refrigeranti, i palloni e il cotone, utilizzati durante la fase di estrazione, sono stati depurati mediante 4 ore di estrazione Soxhlet con una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v). Successivamente, i ditali e il cotone sono stati essiccati in un becher posto su piastra riscaldata a 30 °C. Tutta la vetreria utilizzata è stata lavata accuratamente con apposito detersivo Micro-90 (Aldrich), acqua distillata e acetone.

2.3.2 Estrazione degli IPA dal biochar

Estrazione mediante Sonicazione

Il sonicatore usato nel presente lavoro è un Misonix Sonicatore Ultrasonic Liquid Processor (550 Watt e frequenza 20 kHz), dotato di un generatore in grado di convertire l'energia elettrica convenzionale (50/60 Hz AC) in una corrente dalla frequenza di 20 kHz, che è trasferita al convertitore che la trasforma in vibrazione meccanica. Il convertitore, vibrando in direzione longitudinale, trasmette questo moto all'estremità della sonda immersa nella soluzione.

Sono stati pesati esattamente circa 0.5 g di biochar e introdotti in una provetta in pyrex (50 mL) da centrifuga. Si è poi omogeneizzato il tutto, portando il biochar ad uno stato pulverulento, e sono stati aggiunti 100 µL di IPA deuterati a 5 mg/L. È stata quindi fissata la provetta allo stativo che si trova all'interno del box asonoro del sonicatore e immersa la sonda nel solvente in modo da non farle toccare la provetta.

Si è poi impostata una programmata di 10 minuti che prevede pulsazioni alla massima potenza da 20 secondi l'una con 1 minuto di off.

Terminata la sonicazione, è stata sottoposta la miscela a centrifugazione per circa 1 ora. Successivamente si è filtrata la miscela con filtro Büchner in cui è stata adagiato un filtro in fibra di vetro Whatman GF/C e aggiunto un sottile strato di celite 500 fine.

Dopo la filtrazione, la soluzione ottenuta è stata concentrata al Rotavapor sino a un volume finale di circa 1 mL.

Infine, dopo aver trasferito l'estratto concentrato in un vial con tappo, è stato concentrato ulteriormente sotto leggero flusso d'azoto e si sono aggiunti 10 µL di soluzione di 1,3,5-tertributilbenzene alla concentrazione di 12,7 mg/L in acetone/cicloesano (1:1, v:v).

Estrazione a riflusso

L'estrazione a riflusso degli IPA dalla matrice biochar è stata effettuata nel seguente modo. A circa 0.5 g di biochar, introdotti in un pallone da 50 mL munito di ancoretta magnetica, sono stati aggiunti 100 µL di IPA deuterati a 5 mg/L e 18 mL di soluzione estraente; il tutto è stato successivamente messo a riflusso per 4 ore.

La miscela proveniente dall'estrazione è stata quindi filtrata con filtro Büchner, in cui è stata adagiato un filtro in fibra di vetro Whatman GF/C ed è stato aggiunto un sottile strato di celite 500 fine. Il filtro e il pallone contenente il campione sono stati successivamente lavati con circa 9 mL di cicloesano. La soluzione ottenuta è stata quindi concentrata al Rotavapor sino a una volume finale di circa 1 mL. Infine, al campione concentrato a circa 0.5 mL sotto flusso d'azoto sono stati aggiunti, come ulteriore standard interno, 10 µL di 1,3,5-tertributilbenzene alla concentrazione di 12,7 mg/L in acetone/cicloesano (1:1, v:v).

Estrazione mediante Soxhlet : procedura definitiva

L'estrazione degli analiti di interesse (IPA) dalla matrice biochar è stata effettuata mediante Soxhlet nel seguente modo. Dopo aver eseguito la procedura di *cleaning* come sopra descritto, un campione di circa 0,5 g di biochar è stato pesato su

bilancia analitica e introdotto in un apposito ditale di cellulosa. Aggiunti nel campione 100 μ L di IPA deuterati a 5 mg/L, il ditale è stato tappato con un batuffolo di cotone idrofilo.

Dopo aver inserito un pallone da 250 mL munito di ancoretta magnetica nell'estrattore Soxhlet, si è posto il ditale nella camera di estrazione del Soxhlet e si sono introdotti nella stessa 100 mL della soluzione estraente (acetone/cicloesano 1:1, v:v). Si è inserito il refrigerante e si sono azionate l'agitazione magnetica e la piastra scaldante, con temperatura impostata a circa 100 °C, su cui si è posto il bagno a olio. Dal primo riflusso il campione è stato sottoposto a estrazione per circa 36 ore.

La miscela proveniente dall'estrazione è quindi stata filtrata con filtro Büchner, in cui si è adagiata una carta in fibra di vetro Whatman GF/C e si è aggiunto un sottile strato di celite 500 fine. Il filtro e il pallone contenente il campione sono stati successivamente lavati con circa 9 mL di cicloesano. Dopo aver aggiunto 0,5 mL di n-nonano, la soluzione ottenuta è stata concentrata al Rotavapor sino a una volume finale di circa 0,5 mL.

Si è quindi potuto procedere alla fase di purificazione o *clean up* dell'estratto.

2.3.3 Clean up

Dopo aver effettuato la concentrazione della miscela proveniente dall'estrazione, prima dell'analisi GC-MS, si è ritenuto opportuno purificarla tramite *Solid Phase Extraction* (SPE), che consiste nell'eluizione del campione attraverso colonnine contenenti una fase stazionaria in grado di trattenere gli analiti, i quali verranno eluiti successivamente con un solvente adatto.

Le cartucce utilizzate nel presente lavoro sono impaccate con silice (DSC-Si silica tube, 6 mL, 1g, Sulpeco). Tali cartucce subiscono un prelavaggio con circa 4 mL etile acetato e un condizionamento con circa 4 mL di cicloesano, stando attenti a lasciarle umide. Il campione viene quindi posto in testa alla cartuccia ed eluito con 1 mL di cicloesano per separare la prima frazione a composizione alifatica. Successivamente viene fatta una seconda eluizione con 4 mL di una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v) per separare la frazione aromatica.

Gli IPA eluiscono nella seconda frazione, che viene quindi concentrata quasi a secchezza sotto flusso d'azoto. Una volta concentrata sono aggiunti 10 μ L di 1,3,5-tertributilbenzene (TTB) alla concentrazione di 12,7 mg/L in cicloesano/acetone (1:1, v:v), per verificare la resa dei deuterati rispetto al TTB. La prima frazione viene trattata allo stesso modo per verificare che non vi siano IPA.

2.3.4 Analisi GC-MS

Le determinazioni qualitative e quantitative sono state eseguite con gas cromatografo Agilent 6850 interfacciato a uno spettrometro di massa a quadrupolo Agilent 5975, con elio fase mobile a 1 mL/min e con colonna 5% fenile e 95% metile polisilossano (Agilent HP-5MS, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m film). La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 310 °C e le soluzioni sono state analizzate in modalità *splitless*. La programmata termica usata è quella riportata in tabella 2.1.

Tabella 2.1: Programmata termica utilizzata per l'analisi GC-MS

Segmento	T iniziale (C)	T finale (C)	Gradiente (C/min)	Durata segmento (min)
1	50	100	20	2.50
2	100	300	5	40
3	300	300	0	2.50

La durata del solvent-delay è stata di 5 min. La rivelazione MS è stata fatta con ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV, acquisendo il segnale in *full scann* nell'intervallo di massa 35-650 m/z per l'analisi dei composti principali.

Per l'analisi quantitativa dei singoli IPA l'acquisizione è stata effettuata invece in ione selezionato (*single ion monitoring*, SIM), utilizzando lo ione molecolare dell'analita. Il rivelatore selettivo di massa è stato impostato in modo da acquisire le seguenti masse:

Tempo (min)	m/z
5.50-8.50	128
8.50-10.50	142
10.50-12.00	231
12.00-12.50	152
12.50-14.50	154, 164
14.50-18.50	166
18.50-23.50	178, 188
23.50-30.00	202
30.00-35.00	228, 240
35.00-40.00	252
40.00-45.00	276, 278

All'inizio della fase di ottimizzazione del metodo, per stabilire i tempi di ritenzione di ciascun analita, sono stati analizzati prima i singoli standard, e poi una miscela (100 μ L di soluzione PAH Calibration Mix 1 mg/L + 100 μ L di soluzione IPA deuterati 5 mg/L + 10 μ L di soluzione TTB da 12.7 mg/mL), registrando la corrente ionica nell'intervallo di massa 35-650 m/z (metodo TIC: *Total Ionic Current*). Oltre ai tempi di ritenzione del picco cromatografico dei singoli composti, sono state determinate le masse caratteristiche dei frammenti ionici ed i loro rapporti per utilizzarli successivamente nel metodo SIM. L'acquisizione in SIM ha consentito di registrare la corrente ionica dovuta a singole masse in finestre di tempo stabilite.

2.3.5 Calcolo delle concentrazioni

Per verificare l'efficacia dell'estrazione degli IPA si sono determinati i recuperi di tre composti surrogati degli IPA introdotti nel biochar all'inizio dell'estrazione stessa, utilizzando l'1,3,5-tertributilbenzene come standard interno. I composti utilizzati a tal fine sono stati acenafte-ne-d₁₀, fenantrene-d₁₀, crisene-d₁₂. Il fattore di risposta degli IPA deuterati rispetto allo standard interno è stato calcolato dall'analisi di una soluzione standard contenente quantità note degli IPA deuterati e di standard interno.

Mediante l'area dei picchi cromatografici dell'analita e del composto deuterato, nota la quantità di standard interno aggiunto, è stata calcolata la massa dell'analita nella soluzione di misurazione utilizzando il fattore di risposta e, nota la quantità di biochar pesata inizialmente, la concentrazione dei vari IPA.

2.4 Validazione del metodo

Con il termine validazione si intende il processo che permette di dimostrare se i risultati ottenuti con il metodo sono affidabili, riproducibili e se il metodo è adatto per l'applicazione richiesta. Il processo di validazione ha quindi l'obiettivo di dimostrare la validità di un metodo mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo (M. Tenaglia, E. Venturini, 2002).

Tra questi parametri ci sono precisione, limite di rivelabilità, limite di quantificazione, intervallo di linearità della risposta, esattezza, recupero, robustezza, ripetibilità.

2.4.1 Verifica della linearità della risposta strumentale e curve di calibrazione

La linearità di un metodo d'analisi consiste nella sua capacità di produrre risultati direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita. Per la sua valutazione è stata utilizzata la tecnica della regressione lineare.

Il protocollo di calibrazione consiste nella produzione di soluzioni di calibrazione contenenti quantità variabili dell'analita standard e la stessa quantità di standard interno. Il modello di calibrazione lineare è stato ottenuto con il metodo dei minimi quadrati, ed è espresso dall'equazione $Y = aX + b$, in cui Y è il rapporto delle aree dei picchi cromatografici dell'analita e dello standard interno, ottenute dall'analisi GC-MS, e X il rapporto delle masse dell'analita e dello standard interno nella soluzione.

Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione

Le soluzioni standard a bassa concentrazione nei diversi IPA per la determinazione delle funzioni di calibrazione vengono preparate mediante opportune diluizioni della soluzione madre.

In particolare, nell'ambito della presente ricerca sono state preparate, mediante opportune diluizioni della soluzione certificata IPA mix (vedi materiali), 6 soluzioni di calibrazione alle concentrazioni di 0.0025, 0.005, 0.02, 0.25, 0.5 e 1.25 mg/L, e allo stesso volume di 0.5 mL. Tale intervallo corrisponde approssimativamente alle concentrazioni di IPA nei vari campioni di biochar. A

ciascuna soluzione sono stati aggiunti 100 µL di una soluzione di IPA deuterati a 5 mg/L di acenaftene-d10, fenantrene d-10 e crisene-d12.

L'analisi GC-MS delle 6 soluzioni di calibrazione ha permesso di determinare la linearità di risposta in funzione della concentrazione degli IPA di nostro interesse. Per gli IPA con peso molecolare compreso tra 128 u (naftalene) e 166 u (fluorene), la retta di calibrazione è stata costruita in base all'acenaftene-d10. Per gli IPA con peso molecolare compreso tra 178 u (fenantrene – antracene) e 202 u (crisene), le rette di calibrazione sono state costruite in base al fenantrene-d10. Le rimanenti rette di calibrazione (peso molecolare IPA tra 252 e 278 u) sono state calcolate in base al crisene-d12.

2.4.2 Limite di rivelabilità

In qualsiasi metodo di analisi è di estrema importanza determinare qual è la più piccola quantità di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del fondo. Tale quantità di analita è definita limite di rivelabilità (LOD) ed è stata calcolata come segue:

essendo

$$Y_{\text{LOD}} = Y_b + 3s_b$$

Con: Y_b = segnale del bianco; Y_{LOD} = segnale del campione al LOD; s_b = deviazione standard del bianco.

Dalla retta di calibrazione,

$$\text{LOD} = 3 s_b / a$$

è stato calcolato attraverso il parametro a (pendenza) della retta di calibrazione e la deviazione standard del bianco. Ogni 8-10 determinazioni di IPA nel biochar è stato effettuato un bianco procedurale e il valore di s_b è stato determinato mediante l'area del picco al tempo di ritenzione dell'IPA individuata nei bianchi procedurali effettuati.

2.4.3 Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione (LOQ), che corrisponde alla più bassa quantità di analita misurabile con ragionevole certezza, viene definito come il segnale del bianco sommato a 10 volte la sua deviazione standard. Nel presente lavoro è stato stimato dalle rette di calibrazione e dai bianchi procedurali con la seguente formula:

$$\text{LOQ} = 10 s_b / a$$

2.4.4 Precisione

La precisione riguarda la concordanza fra i risultati di analisi ripetute sullo stesso campione omogeneo con lo stesso metodo analitico. In questa tesi si sono volute valutare riproducibilità e ripetibilità del metodo.

La ripetibilità è stata valutata effettuando 4 analisi replicate di uno stesso campione di biochar. Per verificare invece la riproducibilità, è stata effettuata una replica 3 settimane dopo ed il risultato è stato confrontato con quello ottenuto dalla media delle 4 repliche. La misura di errore associato ai dati, denominata scarto percentuale (scarto %), è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{Scarto \%} = [(a-b)/a]*100$$

a = valore di concentrazione medio di n = 4 repliche

b = valore di concentrazione analisi singola

La formula impiegata per calcolare l'errore considera il dato medio di 4 repliche come un unico valore, accentuando dunque le differenze tra le due prove.

2.4.5 Bianco procedurale

Per determinare la presenza eventuale di interferenti e di IPA di altra origine nel corso dell'analisi, sono stati eseguiti dei bianchi procedurali. Questi consistono

nell'applicazione della procedura standard di determinazione degli IPA in assenza del campione. Nel presente lavoro di tesi sono stati effettuati dei bianchi procedurali ogni 8-10 determinazioni di IPA nel biochar.

2.4.6 Recupero

Il recupero, ovvero la capacità di un metodo analitico di determinare la totalità dell'analita presente in una matrice, è uno dei parametri più importanti nel definire la validità del metodo stesso. Per verificare l'efficacia dell'estrazione degli IPA si sono determinati i recuperi di tre composti surrogati degli IPA introdotti nel biochar all'inizio dell'estrazione stessa, utilizzando l'1,3,5-tertributilbenzene come standard interno. I composti utilizzati a tal fine sono stati acenaftene-d₁₀, fenantrene-d₁₀ e crisene-d₁₂. Il fattore di risposta degli IPA deuterati rispetto allo standard interno è stato calcolato dall'analisi di una soluzione standard contenente quantità note degli IPA deuterati e di standard interno.

Il recupero è stato calcolato con la seguente formula:

$$\% R = Q_{dm}/Q_d$$

Dove Q_d è la quantità di IPA deuterato aggiunta e Q_{dm} è la quantità di IPA deuterato misurata e calcolata dalla equazione:

$$Q_{dm} = (F_d \times Q_t \times A_d) / (A_t \times Q_d)$$

Dove Q_t è la quantità di TTB aggiunto e A_t l'area del picco GC corrispondente; A_d l'area del picco GC dell'IPA deuterato e F_d il fattore di risposta calcolato come indicato sopra.

2.4.7 Robustezza

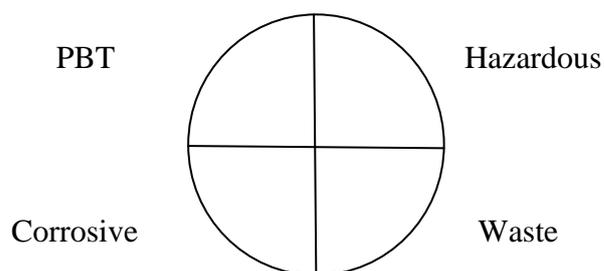
La robustezza di una procedura analitica è la sua capacità di non essere influenzata da piccole ma deliberate variazioni nei parametri del metodo, e fornisce un'indicazione della sua affidabilità durante l'impiego normale. Per il metodo ottimizzato la verifica della robustezza è stata effettuata variando i seguenti parametri: quantità di campione analizzato (da 3 g a 0,1 g), quantità di standard interno aggiunta (da 100 µL a 10 µL), quantità di solvente utilizzato per l'estrazione (da 300 mL a 100 mL).

2.4.8 Greenness

Spesso i metodi analitici utilizzati per la determinazione degli IPA in matrici complesse sono non molto sostenibili dal punto di vista ambientale o “green”, in quanto:

- Utilizzano solventi e reagenti pericolosi
- Producono grandi quantità di rifiuti
- Usano grande quantità di energia

Nonostante i moltissimi fattori che devono essere considerati quando si sviluppa un metodo analitico, durante lo sviluppo del metodo si è voluto porre particolare attenzione anche alla sostenibilità ambientale dello stesso. Per quantificare il grado di “green” del metodo ottimizzato si è utilizzato il profilo di *greenness* sviluppato dal NEMI (*National Environmental Methods Index*) in collaborazione con 5 agenzie federali americane e laboratori privati. Il profilo di *greenness* si basa su quattro criteri di accettabilità, rappresentati mediante 4 quadranti, e il cui rispetto, che determina la compatibilità ambientale del metodo, è contraddistinto dalla colorazione verde di ciascun quadrante.



Criteri di accettabilità:

1. PBT – Una delle sostanze usate è considerata persistente, bioaccumulabile, tossico secondo *Toxic Release Inventory* (TRI) dell'EPA (<http://www.epa.gov/tri/chemical/>).
2. Pericoloso – Una delle sostanze usate è considerato pericoloso secondo la TRI o da una delle liste dei rifiuti pericolosi D, F, P o U del *Resource Conservation and Recovery Act* (RCRA) (*Code of Federal Regulations*, Titolo 40, Parte 261, <http://ecfr.gpoaccess.gov/>).
3. Corrosivo – Il pH durante l'analisi è < 2 o > 12
4. Quantità di rifiuti – La quantità di rifiuti prodotta per l'analisi è > 50 g

2.5 Analisi elementare, microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)

L'analisi elementare di alcuni dei campioni studiati è stata effettuata con lo strumento FLASH 2000 Organic Elemental Analyzers che funziona con la tecnica di “*flash combustion*”, con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche e inorganiche in prodotti gassosi.

Per lo studio delle caratteristiche morfologiche del biochar sono state utilizzate la microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM). Il SEM fornisce informazioni sull'aspetto, sulla natura e sulle proprietà di superficie e degli strati sottostanti di campioni solitamente solidi. Il principio su cui si basa è quello di inviare un fascio di elettroni primari di intensità nota su di un campione conduttore e di raccoglierne, tramite adeguata scansione sull'area corrispondente all'ingrandimento selezionato dall'operatore, l'immagine bi-dimensionale e

ingrandita della superficie stessa, convertendo in segnale, tramite opportuni rivelatori, i diversi fenomeni risultanti (emissione di elettroni secondari, back-scattering di elettroni primari, catodoluminescenza, ecc.). Tali segnali vengono poi riprodotti su uno schermo catodico il cui pennello elettronico deve risultare in fase con quello della colonna del SEM, o, talvolta, vengono rielaborati mediante opportuni pacchetti software per ottenere dati chimici qualitativi o quantitativi. L'immagine che si ottiene è dotata di un'ottima profondità di campo (ovvero di un ampio intervallo di distanze attorno al fuoco dell'immagine, dove essa risulta ancora nitida poiché la sfocatura è impercettibile o comunque tollerabile), per cui si possono osservare in dettaglio le asperità superficiali, le caratteristiche morfologiche di un singolo elemento o cristallo e le cavità della superficie.

Nel presente lavoro di tesi le analisi al SEM dei campioni di biochar sono state effettuate con un *Phenom electron microscope* operante ad una tensione di 5 kV.

Lo strumento che è stato utilizzato, invece, per la microscopia elettronica a trasmissione è un Philips CM10 con tensione di lavoro da 80 kV; le immagini sono acquisite con CCD. Il campione è stato preparato ponendo la polvere (circa 1 mg), ottenuta da macinazione in mortaio di agata, in 8 ml di acqua bidistillata. La miscela è stata sonicata per alcuni secondi. Una goccia della sospensione è stata messa su un grid apposito, costituito da una micro-griglia di rame ricoperta da un sottile strato di carbonio. La sospensione è stata filtrata attraverso la griglia, in modo da depositare il campione sul grid; il campione è stato poi asciugato all'aria.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Ottimizzazione della procedura analitica per la determinazione degli IPA nel biochar

Al fine di sviluppare un metodo analitico efficiente, economico e con un buon grado di greenness per la determinazione degli IPA nel biochar, è stata condotta un'approfondita ricerca bibliografica sia sulle caratteristiche chimico-fisiche degli IPA sia sui metodi finora utilizzati per la loro determinazione da matrici complesse simili al biochar. In letteratura, infatti, non è ad oggi presente un metodo specifico per la determinazione degli IPA in tale matrice.

È da sottolineare che generalmente i metodi descritti in letteratura per la determinazione degli IPA in matrici complesse utilizzano solventi tossici, purificazione su colonna cromatografica che richiede una notevole quantità di solvente, e non sempre sono accompagnati da recuperi soddisfacenti. Tali metodi, inoltre, seppur efficaci per l'estrazione degli IPA da matrici quali il sedimento o il carbone, non sono risultati idonei all'obiettivo della presente tesi. La matrice biochar è pertanto risultata molto diversa da quelle citate già presenti in letteratura.

È altresì importante evidenziare che, nell'ottimizzazione del presente metodo analitico, si è cercato soprattutto di contemperare l'efficienza con l'utilizzo di solventi green o più in generale con un maggiore livello di greenness.

La determinazione di composti in traccia come gli IPA, riscontrabili anche a tenori di ultra-traccia (es. ng/L), in una matrice complessa come il biochar, è particolarmente difficile e richiede l'attuazione di misure specifiche durante l'intero ciclo analitico, dalle fasi pre-analitiche di conservazione e trattamento, a quelle più direttamente strumentali di quantificazione finale, ciò al fine di limitare contaminazioni o perdite dell'informazione analitica.

Scelta del materiale

Per la messa a punto del metodo analitico è stato scelto un biochar utilizzato in diversi studi agronomici (G. Fellet et al., 2011). Tale biochar è stato fornito dalla Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali (DISA) dell'Università di Udine ed è stato prodotto in un impianto di produzione situato Bagnacavallo (RA) mediante pirolisi a 500°C di residui di potatura di frutteti (G. Fellet et al., 2011).

È necessario sottolineare che non sono stati trovati carboni vegetali certificati per la concentrazione di IPA. In fase di messa appunto del metodo estrattivo è stato utilizzato il carbone GBW certificato per l'analisi elementare ma non per gli IPA, le cui caratteristiche sono indicate nel capitolo Materiali e Metodi.

3.1.1 Ottimizzazione del metodo estrattivo

Sono state inizialmente effettuate numerose prove di estrazione in cui si sono variati parametri quali metodologia estrattiva, solvente, tempo, temperatura, in modo da individuare le migliori condizioni sperimentali per il raggiungimento dello scopo prefissato. In particolare, sono state confrontate 3 metodologie estrattive: riflusso, Soxhlet e sonicazione. I solventi utilizzati sono stati: acetone, cicloesano, toluene, diclorometano per quanto riguarda l'estrazione a riflusso; acetone e cicloesano per l'estrazione mediante Soxhlet e sonicazione.

Sulla base delle informazioni reperite in letteratura (V. Flotron et al., 2003) e in considerazione del fatto che gli IPA sono composti idrofobici, si è deciso di iniziare ad effettuare una serie di estrazioni degli IPA mediante una miscela acetone/cicloesano e di utilizzare una tecnica estrattiva come il riflusso che presenta il vantaggio di essere rapida e di necessitare di una minore quantità di solvente rispetto ad altre.

3.1.1.1 Prove di estrazione a riflusso

Miscela acetone/cicloesano

Una prima serie di prove di estrazione è stata effettuata utilizzando un metodo a riflusso presente in letteratura per l'estrazione degli IPA da carbone. Si sono quindi

effettuate una serie di estrazioni a riflusso (cfr. Capitolo Materiali e Metodi) con 18 mL di una soluzione acetone/cicloesano (1:5, v:v), prima su un carbone certificato (GBW 11111a), e poi su un campione di biochar. I risultati relativi ai recuperi ottenuti da tali estrazioni sono stati significativamente differenti (tabella 3.1). I recuperi ottenuti dall'estrazione degli IPA deuterati dal biochar sono risultati notevolmente più bassi, soprattutto per quello che riguarda gli IPA con maggiore peso molecolare per i quali si può parlare di resa di estrazione nulla, rispetto a quelli ottenuti dall'estrazione effettuata sul GBW. (tabella 3.1)

Tabella 3.1: Valori medi dei recuperi e degli RSD di tre repliche sul GBW e sul biochar ottenuti mediante estrazione a riflusso con una soluzione acetone/cicloesano (1:5, v:v) e con una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v) (solo biochar)

IPA deuterato	GBW		Biochar Ac/CH (1:5, v:v)		Biochar Ac/CH (1:1, v:v)	
	Recuperi %	RSD %	Recuperi %	RSD %	Recuperi %	RSD %
Acenaftene-d10	64	24	55	43	78	19
Fenantrene-d10	87	34	37	16	40	45
Crisene-d12	70	31	6	56	7	79

Per cercare di incrementare il recupero degli IPA deuterati si è provato a variare il rapporto acetone/cicloesano utilizzando una soluzione 1:1. Anche in questo caso i recuperi non sono stati soddisfacenti, essendo rimasti pressoché identici per quanto riguarda fenantrene-d10 e crisene-d12. Si è invece registrato un sostanziale aumento del recupero dell'acenaftene-d10 che è passato dal 55% al 78% (tabella 3.1).

Un problema legato all'estrazione a riflusso è probabilmente dovuto al fatto che tale estrazione dà origine a campioni molto sporchi, con conseguente effetto matrice decisamente rilevante in fase di filtrazione, e quindi possibile perdita di IPA in tale operazione. Infatti, gli IPA per le loro caratteristiche chimico-fisiche presentano mediamente una solubilità in acqua piuttosto bassa che tende a diminuire

con l'aumento del peso molecolare, per cui gli IPA con più di quattro anelli tendono a legarsi alle sostanze particellari.

Toluene e diclorometano

È stata testata la capacità estrattiva di alcuni solventi. I solventi utilizzati sono stati il diclorometano e il toluene. Dai risultati ottenuti da tali prove di estrazione, riportati in tabella 3.2, si può osservare che, mentre il diclorometano consente di avere dei recuperi sostanzialmente uguali dell'acenaftene-d10 e del fenantrene-d10, e inferiori per quanto riguarda il crisene-d12, a quelli ottenuti con la soluzione acetone/cicloesano; il toluene consente di ottenere dei recuperi abbastanza alti anche del crisene-d12 (59%). In virtù di questo risultato e in considerazione del fatto che la principale difficoltà riscontrata nell'ottimizzazione della metodologia estrattiva è stata rappresentata dall'estrazione degli IPA ad alto peso molecolare, si è deciso di effettuare altre estrazioni con l'utilizzo del toluene. Inoltre, essendo il toluene un solvente alto bollente, si è cercato di verificare se nella procedura di concentrazione si possono avere delle perdite di IPA.

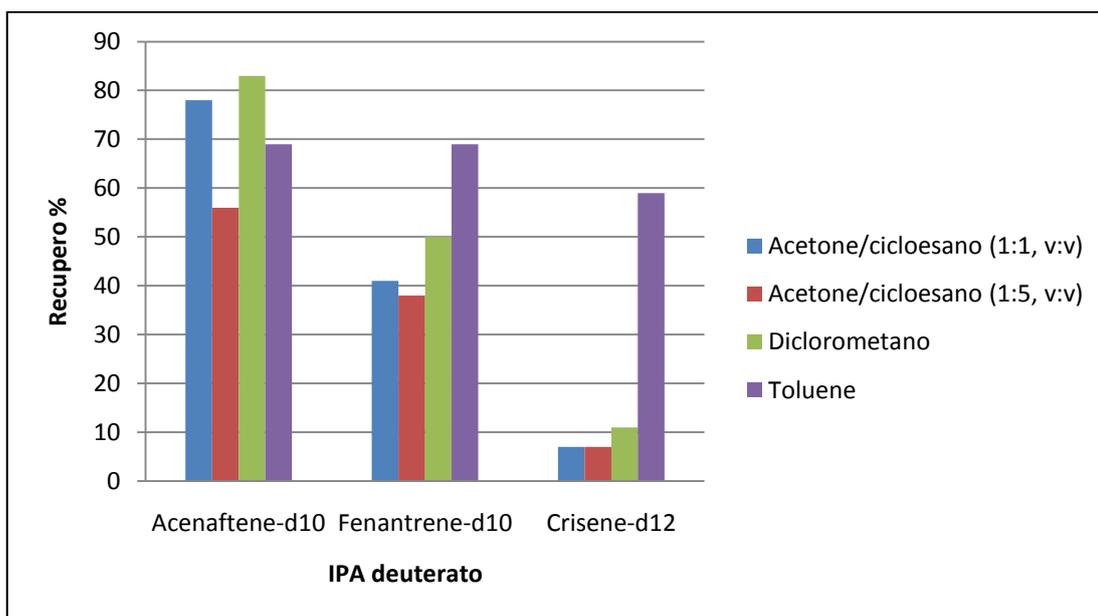
Per effettuare tale verifica, in un pallone da 250 mL sono stati aggiunti 100 mL di toluene e 100 μ L di IPA deuterati 5 ppm. Tale soluzione è stata quindi concentrata al Rotavapor fino a un volume di 1 mL. Dopo averla trasferita in un vial, sono stati aggiunti 10 μ L di TTB 12,7 ppm, e si è proceduti all'analisi in GC-MS. I recuperi ottenuti su tre repliche sono stati del 65% per l'acenaftene-d10, del 64% per il fenantrene-d10 e del 58% per il crisene-d12. Da questi risultati si evince che i recuperi ottenuti mediante l'estrazione a riflusso con toluene sono stati fortemente influenzati dalla fase di eliminazione del solvente al Rotavapor, che ha determinato una perdita di IPA. In considerazione di ciò, e del fatto che nella scelta del solvente di estrazione, come già evidenziato in precedenza, si vuole porre particolare attenzione alla tossicità e all'impatto ambientale dello stesso, sono state effettuate delle altre prove di estrazione mediante Soxhlet e Sonicatore.

Tabella 3.2: Valori medi dei recuperi e degli RSD di tre repliche sul biochar

IPA deuterato	Diclorometano		Toluene	
	Recuperi %	RSD %	Recuperi %	RSD %
Acenaftene-d10	83	68	69	21
Fenantrene-d10	50	84	69	13
Crisene-d12	11	80	59	24

Prima di utilizzare altre metodologie estrattive, sono stati confrontati i risultati ottenuti dalle estrazioni a riflusso in funzione dei diversi solventi utilizzati (grafico 3.1), per individuare quale solvente o miscela di solventi abbia dato i migliori risultati così da ricorrervi per le successive estrazioni.

Grafico 3.1: Recuperi degli IPA deuterati acenaftene-d10, fenantrene-d10 e crisene-d12, delle estrazioni effettuate a riflusso con diversi solventi



Come si può osservare dal grafico 3.1, i risultati mostrano come i vari solventi utilizzati per le estrazioni forniscano recuperi sostanzialmente confrontabili per l'acenaftene-d10 e con piccole differenze per il fenantrene-d10. Per quanto riguarda il crisene deuterato si nota invece come il toluene ha consentito di ottenere dei recuperi del 60%, e quindi sostanzialmente superiori agli altri che sono in media

del 10%. Sulla base di tali risultati, della tossicità del diclorometano e alla luce delle considerazioni fatte in precedenza sul toluene, si è deciso di effettuare le estrazioni mediante sonicazione e Soxhlet con una miscela acetone/cicloesano (1:1, v:v).

3.1.1.2 Prove di estrazione mediante Sonicazione

La sonicazione è una tecnica che utilizza le frequenze degli ultrasuoni per estrarre gli analiti dalla matrice. Il fascio di ultrasuoni generato dal sonicatore produce all'interno del liquido delle onde di pressione provocando il fenomeno della cavitazione, cioè la formazione durante la fase di pressione negativa di milioni di piccole cavità che, nella successiva fase di pressione positiva, implodono con un drastico e improvviso cambiamento della temperatura e della pressione nella zona interessata. Gli effetti della temperatura, accoppiati alle forze vibrazionali e torsionali, rendono possibile l'estrazione degli analiti in pochi minuti.

Le estrazioni mediante sonicazione sono state effettuate facendo ricorso alla procedura di seguito descritta in maniera sintetica – per una descrizione più dettagliata si rimanda al capitolo Materiali e Metodi.

Sono stati pesati esattamente circa 0.5 g di biochar e introdotti in una provetta in pyrex (50 mL) da centrifuga. Sono stati quindi aggiunti 100 μ L di IPA deuterati a 5 mg/L. È stata poi fissata la provetta allo stativo del sonicatore e immersa la sonda nel solvente in modo tale da non toccare la provetta stessa.

Terminata la sonicazione, è stata sottoposta la miscela a centrifugazione per circa 1 ora. La stessa è quindi stata filtrata con filtro Büchner in cui è stato adagiato un filtro in fibra di vetro Whatman GF/C 541 e aggiunto un sottile strato di celite 500 fine.

Dopo la filtrazione, la soluzione ottenuta è stata concentrata al Rotavapor sino a un volume finale di circa 1 mL.

Infine, dopo aver trasferito l'estratto concentrato in un vial con tappo, è stato concentrato ulteriormente sotto leggero flusso d'azoto e si sono aggiunti 10 μ L di soluzione di 1,3,5-tertributilbenzene alla concentrazione di 12,7 mg/L in acetone/cicloesano (1:1, v:v). Si è prelevato circa 1 μ L di tale estratto ed è stata effettuata l'analisi in GC-MS.

I recuperi ottenuti mediante l'estrazione con sonicazione sono riportati nella tabella 3.3.

Tabella 3.3: Valori medi dei recuperi e degli RSD di due repliche sul biochar ottenuti mediante estrazione con sonicazione utilizzando una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v)

IPA deuterato	Sonicazione	
	Recupero %	RSD %
Acenaftene-d10	9	22
Fenantrene-d10	4	3
Crisene-d12	0,4	11

I risultati evidenziano recuperi notevolmente più bassi rispetto alle estrazioni effettuate a riflusso. Pertanto si è deciso di non effettuare altre prove di estrazione con tale metodologia estrattiva e di passare quindi ad effettuare delle estrazioni mediante Soxhlet.

3.1.1.3 Prove di estrazione mediante Soxhlet

Gli IPA dal biochar sono stati estratti mediante Soxhlet per 16 ore con 160 ml di una miscela 1:1 acetone/cicloesano. L'estratto ottenuto è stato concentrato a circa 2 ml usando un evaporatore rotante termostato a 35 °C e, successivamente, è stato portato a secco mediante un debole flusso d'azoto. A questo punto all'estratto sono stati aggiunti 10 µL di TTB alla concentrazione di 12,7 mg/L. La soluzione così ottenuta è stata analizzata mediante GC-MS. I risultati, riportati nella tabella 3.4, evidenziano come questa procedura di estrazione fornisca dei recuperi migliori rispetto alle altre procedure di estrazione testate, seppur ancora non soddisfacenti per quanto riguarda gli IPA a maggior peso molecolare. Per cercare di incrementare il recupero di tali IPA si è provato a variare il rapporto acetone/cicloesano utilizzando una soluzione 5:1 e ad effettuare un'estrazione con solo acetone. I recuperi ottenuti sono rimasti pressoché identici a quelli avuti con la soluzione acetone/cicloesano

(1:1, v:v) con addirittura una diminuzione del recupero del crisene-d10 al 10% (tabella 3.5).

Tabella 3.4: Valori medi dei recuperi e degli RSD delle estrazioni mediante Soxhlet con una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v) per 16 ore di 3 repliche sul biochar

IPA deuterato	Soxhlet acetone/cicloesano (1:1)	
	Recuperi %	RSD %
Acenaftene-d10	75	2
Fenantrene-d10	66	13
Crisene-d12	29	29

Dai risultati ottenuti mediante le varie tecniche di estrazione riportati in tabella 3.5, si può constatare che i recuperi migliori sono quelli delle estrazioni a riflusso con toluene e delle estrazioni mediante Soxhlet utilizzando come estraente una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v) o il solo acetone.

Tabella 3.5: Valori medi dei recuperi delle estrazioni effettuate con le varie tecniche e solventi utilizzati, relativi a 3 repliche sul biochar degli IPA deuterati acenaftene (ACEd), fenantrene (FENd) e crisene (CRId)

	ACEd %	FENd %	CRId %
Estrazione a riflusso			
Acetone/cicloesano (1:1, v:v)	78	41	7
Acetone/cicloesano (1:5, v:v)	56	38	7
Diclorometano	83	50	11
Toluene	69	69	59
Estrazione mediante soxhlet (18 ore)			
Acetone/cicloesano (1:1, v:v)	75	66	29
Acetone/cicloesano (5:1, v:v)	76	37	10
Acetone	84	58	29
Estrazione mediante sonicazione			
Acetone/cicloesano (1:1, v:v)	9	4	0,4

Come metodologia estrattiva su cui lavorare per migliorare ulteriormente i recuperi, attraverso l'effettuazione di altre prove di estrazione, è stata preferita l'estrazione mediante Soxhlet con una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v), sia al riflusso con toluene che all'estrazione mediante Soxhlet con acetone. Il motivo dell'esclusione del toluene è già stato spiegato nella parte relativa all'estrazione a riflusso. Invece, la decisione di non effettuare ulteriori prove mediante Soxhlet con acetone è stata presa nell'ottica della successiva fase di purificazione attraverso SPE. Infatti, l'elevata polarità dell'acetone non consente di effettuare una separazione degli IPA da eventuali contaminanti.

Bisogna comunque sottolineare che l'estrazione mediante Soxhlet, oltre ad aver dato dei buoni recuperi con una discreta riproducibilità, ha il vantaggio di non necessitare di una strumentazione molto costosa, comportando però l'utilizzo di grandi volumi di solvente e lunghi tempi di estrazione.

Si è deciso quindi di verificare, partendo dall'estrazione mediante Soxhlet con acetone/cicloesano (1:1, v:v) della durata di 16 ore, al fine di aumentare l'efficienza di estrazione degli IPA, quanto influisce il tempo di estrazione sull'efficienza di estrazione.

Prima di effettuare tale verifica però ci si è voluti accertare che non vi fossero perdite di IPA durante la procedura analitica. Per fare ciò si è scomposta la procedura in 3 parti:

- Filtrazione
- Concentrazione
- SPE

andando a verificare l'eventuale perdita di IPA in ciascuna di esse.

Verifica della perdita di IPA durante la procedura analitica

Concentrazione

In un pallone da 250 mL sono stati aggiunti 100 mL di una miscela acetone/cicloesano (1:1, v:v) e 100 µL di IPA deuterati 5 mg/L. Si è quindi concentrata al Rotavapor tale soluzione fino a un volume di 2-3 mL. Trasferita in un vial è stata concentrata ulteriormente sotto leggero flusso d'azoto fino a un volume finale di circa 30-40 µL. Aggiunti 10 µL di TTB 12,7 mg/L, si è proceduto all'analisi GC-MS. Dalla elaborazione dei dati si è visto che i recuperi erano del 91% per l'acenaftene-d10, del 100% per il fenantrene-d10 e per il crisene-d12 (tabella 3.6 "bianco concentrazione"). Se ne deduce che la fase di concentrazione determina una perdita di circa il 10% del solo acenaftene-d10. Tale risultato dimostra che la fase di concentrazione è delicata e potrebbe determinare delle perdite. In base a ciò si è quindi deciso di aggiungere prima di tale fase 0,5 mL di n-nonano come *keeper*.

Filtrazione

Per verificare l'eventuale perdita di IPA durante l'operazione di filtrazione dei campioni, sono stati filtrati dei "bianchi filtrazione" ottenuti nel modo seguente. Si effettua un'estrazione mediante Soxhlet con il campione senza aggiungere gli IPA deuterati prima dell'estrazione ma aggiungendo 100 µL di IPA deuterati 5 mg/L dopo aver effettuato l'estrazione e prima della filtrazione. Dopo aver effettuato la filtrazione, la soluzione viene concentrata al Rotavapor e successivamente sotto flusso d'azoto. Aggiunti 10 µL di TTB 12,7 mg/L, viene effettuata l'analisi GC-MS. Conosciuta la perdita di IPA dovuta alla concentrazione mediante Rotavapor e sotto flusso d'azoto, si può ricavare la perdita dovuta alla filtrazione. Dai dati ottenuti si è visto che tale procedura non comporta nessuna perdita di IPA deuterati. I risultati di 3 repliche sono riportati in tabella 3.6, tenendo in considerazione però che sui recuperi indicati non c'è solo l'effetto della filtrazione ma anche quello della concentrazione, in quanto il campione non è stato solo filtrato ma anche concentrato.

3.1.2 SPE

Sono stati infine effettuati sei bianchi procedurali veri e propri, che consistono nell'applicazione della procedura di determinazione degli IPA, mediante estrazione Soxhlet con una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v), in assenza del campione. Tre di questi bianchi procedurali sono stati effettuati inserendo nella procedura analitica anche la purificazione mediante SPE della soluzione estratta e aggiungendo 0,5 mL di n-nonano nella soluzione prima della concentrazione, mentre gli altri tre sono stati effettuati senza clean up e senza l'aggiunta di n-nonano. Ciò è stato fatto per vedere quanto è il recupero ottenuto se viene effettuata tutta la procedura e quanto eventualmente può influire su di esso il clean up mediante SPE. Dai risultati ottenuti (tabella 3.6, "Bianco procedurale con SPE" e "Bianco procedurale senza SPE"), si può constatare che la procedura con tutti i suoi passaggi, compresa la fase di purificazione mediante SPE, comporta delle perdite del 6-8% dei 3 deuterati. Confrontando i recuperi del bianco procedurale senza SPE e di quello con SPE, si può osservare che tale operazione non comporta perdite di IPA, anzi nel caso del "bianco procedurale con SPE" si hanno dei recuperi più alti dovuti però molto probabilmente all'aggiunta del nonano come *keeper* prima della concentrazione.

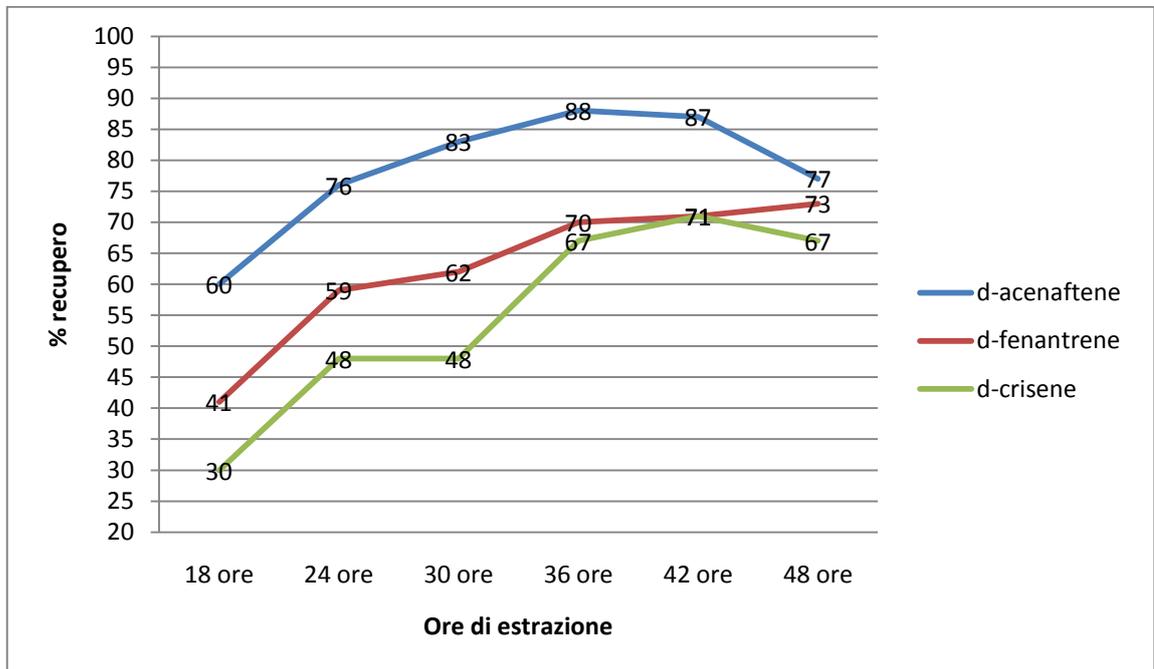
Tabella 3.6: Recuperi degli IPA deuterati acenaftene-d10, fenantrene-d10 e crisene-d12, per le 3 prove denominate “bianco concentrazione”, “bianco filtrazione” e “bianco procedurale con e senza SPE”. Tutte effettuate su 3 repliche.

	Acenaftene-d10		Fenantrene-d10		Crisene-d12	
	Recupero (%)	RSD	Recupero (%)	RSD	Recupero (%)	RSD
Bianco concentrazione	91	10	100	7	100	15
Bianco filtrazione	90	5	92	4	100	1
Bianco procedurale con SPE	87	4	86	1	92	4
Bianco procedurale senza SPE	94	5	93	4	91	2

Valutazione dell'influenza del tempo di estrazione sull'efficienza di estrazione

La procedura utilizzata per verificare quanto influisce il tempo di estrazione sull'efficienza di estrazione è quella del Soxhlet con una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v), messa a punto per l'estrazione degli IPA dopo le varie prove di ottimizzazione. I dettagli di tale procedura sono riportati nella parte relativa all'estrazione mediante Soxhlet del presente capitolo. Per effettuare tale verifica sono state realizzate una serie di estrazioni partendo da un'estrazione di 16 ore e aumentando di volta in volta la durata dell'estrazione di 6 ore fino ad arrivare a un'estrazione di 48 ore. Quindi sono state effettuate 3 repliche con 16 ore di estrazione, 3 con 24 ore, 3 con 30 ore, 3 con 36 ore, 3 con 42 ore e 3 con 48 ore. Ciò è stato fatto in quanto, partendo dalla durata di 16 ore, e aumentando progressivamente di 6 ore ogni volta, si constatava un aumento dell'efficienza di estrazione. Ciò ha consentito di individuare la durata ottimale di un'estrazione efficiente. I risultati di tale lavoro sono di seguito riportati nel grafico 3.2

Grafico 3.2: Valori medi dei recuperi di acenaftene-d10, fenantrene-d10 e crisene-d12, relativi a tre repliche, al variare del tempo di estrazione mediante soxhlet con una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v)



Dai dati ottenuti, riportati nel grafico 3.2 e relativi a un campione di biochar su cui sono state effettuate 3 repliche, si nota come, aumentando i tempi di estrazione, migliori significativamente l'efficacia dell'estrazione. In virtù di tali risultati, e tenuto conto che le percentuali di recupero del fenantrene-d10 e del crisene-d12 rimangono sostanzialmente costanti oltre le 36 ore di estrazione, e che addirittura il recupero dell'acenaftene-d10, tende a diminuire all'aumentare del tempo di estrazione, si è deciso che ai fini della metodica risulta ottimale una durata del tempo di estrazione pari a 36 ore.

Dal confronto dei risultati ottenuti mediante questa estrazione Soxhlet con acetone/cicloesano (1:1, v:v) per 36 ore con i risultati ottenuti dalle altre numerose prove di estrazione effettuate nel lavoro di ottimizzazione del metodo, in cui si sono variati parametri quali metodologia estrattiva, solvente, tempo, temperatura, si è visto che quest'ultima metodologia è quella che dà i recuperi migliori. Pertanto si è scelta tale metodologia estrattiva come definitiva.

3.1.3 Ottimizzazione clean up

Mediante analisi in GC-MS con acquisizione in full scan, per rilevare la presenza di composti che in SIM non si vedono, sono state analizzate le soluzioni provenienti dalle estrazioni mediante Soxhlet con acetone/cicloesano (1:1, v:v). Si è constatato che, oltre agli analiti di interesse, era presente una notevole quantità di interferenti (idrocarburi alifatici). Si è quindi deciso di aggiungere un successivo passaggio di purificazione (*clean up*) consistente in un'estrazione in fase solida (SPE), ovvero in una cromatografia rapida su piccole colonnine commerciali.

La scelta della fase stazionaria da utilizzare nel presente lavoro è stata fatta sulla base di alcune prove di eluizione effettuate utilizzando cicloesano ed una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v). In particolare, sono state confrontate due fasi stazionarie: allumina e silice.

Prova con SPE LC-Allumina-B

La valutazione sulla possibilità di utilizzare l'allumina come fase stazionaria è stata effettuata mediante una serie di prove di eluizione con cicloesano ed acetone/cicloesano (1:1, v:v) su una cartuccia SPE con allumina neutra (3 mL, Sulpeco). In particolare, mediante tali prove di eluizione si è voluto verificare in quale frazione eluiscono gli analiti partendo da un solvente meno polare per poi passare a uno più polare. Si è quindi proceduto nel seguente modo: dopo aver effettuato un'estrazione secondo la procedura definitiva sopra descritta, nella miscela estratta e successivamente concentrata al Rotavapor fino a circa 1 mL sono stati aggiunti 10 µL di IPA mix 10 mg/L. Ciò è stato fatto in quanto, essendo le concentrazioni di IPA derivati dal biochar molto basse, si voleva essere sicuri di vedere la ripartizione degli IPA nelle varie frazioni. Dopo aver effettuato un lavaggio con 4 mL di etile acetato e un condizionamento con 4 mL di cicloesano della cartuccia, si sono posti 0,5 mL della soluzione concentrata al Rotavapor in testa alla cartuccia e sono stati eluiti con 6 frazioni di solvente: le prime 3 costituite da 1 mL di cicloesano e le seconde 3 da 1 mL di acetone/cicloesano (1:1, v:v).

I risultati di tali prove (tabella 5), riportati come percentuali di IPA presenti in una determinata frazione, sono stati ottenuti iniettando circa 1 µL di ciascuna delle 6 frazioni di eluizione in GC-MS. Inoltre, per avere il valore di IPA presenti nella

soluzione iniziale prima della SPE, è stato iniettato 1 µL della soluzione derivante dal Rotavapor. Tale soluzione era stata infatti separata in due aliquote di 0,5 mL di cui una, come sopra detto, è stata posta in testa alla cartuccia per effettuare la SPE.

I calcoli per avere le percentuali dei vari IPA nelle diverse frazioni sono stati effettuati nel seguente modo:

$$X_{ipa} = (A_m/A_f)*100$$

dove A_m è l'area del picco cromatografico derivante dall'analisi della soluzione non sottoposta a SPE; A_f è l'area del picco cromatografico delle analisi delle varie frazioni derivanti dalla SPE.

Per avere dei valori percentuali attendibili si è, inoltre, stati attenti che tutte le frazioni di eluzione fossero di ugual volume (0,5 mL).

Considerando che lo scopo di questa operazione di clean up consiste nell'eliminare possibili interferenti facendoli eluire nella prima frazione, ed eluendo gli IPA successivamente, i risultati di questa prova, riportati in tabella 3.7, sono contrari a quanto sperato in quanto gli IPA intrappolati dalla SPE hanno eluito già nella prima frazione e non si ha quindi ritenzione (tabella 3.7). Inoltre, gli IPA si distribuiscono in varie frazioni anziché concentrarsi in poche. Si è quindi deciso di effettuare la stessa prova utilizzando un altro tipo di SPE.

Tabella 3.7: Concentrazione degli IPA nelle 6 frazioni di eluizione (N = n-nonano, CH = Cicloesano e Ac = Acetone)

IPA SPE LC-alumina-B	1- N %	2- CH %	3- CH %	4- CH %	5- CH/Ac %	6- CH/Ac %	7- CH/Ac %
Naftalene	9	54	30	4	—	—	—
Acenaftilene	7	48	33	6	—	—	—
Acenaftene	10	50	36	—	—	—	—
Fluorene	—	45	33	9	—	—	—
Fenantrene	3	38	36	14	—	—	—
Antracene	3	41	29	8	—	—	—
Fluorantene	—	25	37	18	8	—	—
Pirene	—	35	38	18	7	—	—
Crisene	—	15	25	19	16	2	—
Benzo[<i>a</i>]antracene	—	15	24	20	16	10	—
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	9	—	11	14	30	24	—
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	5	—	2	20	33	25	—
Benzo[<i>a</i>]pirene	—	10	15	18	20	—	—
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	—	—	—	—	37	19	—
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	—	—	—	—	34	17	—
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	—	—	—	—	12	21	—

Prove con SPE DSC-Si silica

Con le stesse modalità di cui sopra, ma utilizzando una cartuccia SPE con silice (6 mL, Sulpeco), sono state effettuate una serie di prove di eluizione con cicloesano ed acetone/cicloesano (1:1, v:v). I risultati ottenuti mediante tali prove sono riportati in tabella 3.8. Dall'analisi di questi dati emerge che gli IPA eluiscono solo in minima parte nella prima frazione, si ha maggiore "ritenzione" rispetto allumina, mentre sono stati rilevati nella seconda e terza frazione gli IPA a minor peso molecolare e nella terza e quarta frazione quelli a maggior peso molecolare. Si è quindi deciso sulla base di tali risultati di adottare questa cartuccia SPE con silice per effettuare un'altra prova di eluizione. In questa prova sono state apportate alcune modifiche rispetto alle procedure precedentemente descritte. In particolare, si è effettuata un'eluizione "umida", ossia si è stati attenti a lasciare un po' di solvente nella cartuccia dopo ogni eluizione, e la cartuccia, una volta caricato in testa alla stessa l'estratto da purificare, è stata eluita con 5 frazioni: la prima costituita da 1 mL di cicloesano e le altre 4 costituite ciascuna da 1 mL di acetone/cicloesano (1:1, v:v). Inoltre, nell'estratto prima della concentrazione al Rotavapor sono stati aggiunti 100 µL di esadecano 10 ppm per individuare quando eluiscono gli idrocarburi alifatici.

L'obiettivo di tale prova era quello di verificare se 1 mL di cicloesano fosse sufficiente ad eliminare possibili interferenti senza però eluire gli IPA, e di individuare la quantità di soluzione acetone/cicloesano sufficiente a fare eluire tutti gli IPA. Dai risultati ottenuti mediante questa prova, riportati in tabella 3.9, si è visto che con 1 mL di cicloesano viene eluita buona parte dell'esadecano, mentre gli IPA vengono completamente eluiti con 3 mL di acetone/cicloesano (1:1, v:v).

Alla luce di questi ultimi risultati si è deciso di utilizzare nella procedura ottimizzata di clean up il seguente sistema eluente: 1 mL di cicloesano per la prima eluizione e 4 mL di acetone/cicloesano per la seconda eluizione. I dettagli di questa procedura, ottenuta dopo le varie prove di ottimizzazione, sono descritti nel capitolo Materiali e Metodi.

Tabella 3.8: Concentrazione degli IPA nelle 6 frazioni di eluizione (N = n-nonano, CH = cicloesano e Ac = acetone)

IPA SPE DSC-Si Silica	1- N %	2- CH %	3- CH %	4- CH %	5- CH/Ac %	6- CH/Ac %	7- CH/Ac %
Naftalene	—	26	74	22	5	—	—
Acenaftilene	—	12	62	39	10	—	—
Acenaftene	—	36	72	16	—	—	—
Fluorene	—	21	80	35	7	—	—
Fenantrene	—	8	47	51	24	3	—
Antracene	—	11	55	53	20	—	—
Fluorantene	—	3	29	41	48	9	—
Pirene	—	5	33	46	40	6	—
Crisene	—	—	14	25	74	20	4
Benzo[<i>a</i>]antracene	—	—	14	25	74	20	4
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	—	—	4	11	63	37	—
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	—	—	4	11	64	37	—
Benzo[<i>a</i>]pirene	—	—	13	13	86	33	9
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	—	—	—	—	47	27	6
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	—	—	—	—	44	35	11
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	—	—	—	—	45	29	7

Tabella 3.9: Concentrazione degli IPA e dell'esadecano nelle 5 frazioni di eluzione (N = n-nonano, CH = cicloesano e Ac = acetone)

IPA SPE DSC-Si Silica	1. N %	2. CH %	3. CH/Ac %	4. CH/Ac %	5. CH/Ac %	6. CH/Ac %
Naftalene			9	49	27	
Acenaftilene				34	28	
Acenaftene			11	17	18	
Fluorene				32	47	
Fenantrene				25	58	
Antracene				22	38	
Fluorantene				12	69	
Pirene				19	61	
Crisene				4	64	
Benzo[<i>a</i>]antracene					68	
Benzo[<i>b</i>]fluorantene					67	
Benzo[<i>k</i>]fluorantene					70	
Benzo[<i>a</i>]pirene					64	
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene					49	
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene					65	
Benzo[<i>ghi</i>]perilene					77	
Esadecano		73				

3.2 Procedura definitiva

La procedura utilizzata per l'analisi degli IPA nel biochar dopo le varie prove di ottimizzazione è schematizzata in figura 3.3. Un esempio di tracciato GC-MS ottenuto dall'analisi del biochar di riferimento è mostrato in figura 3.4.

L'estrazione è eseguita mediante Soxhlet per 36 ore con 100 mL di una soluzione acetone/cicloesano (1:1, v:v), assicurando la minima temperatura di ebollizione. La soluzione proveniente dall'estrazione è quindi filtrata con filtro Büchner, in cui è stato adagiato un filtro in fibra di vetro Whatman GF/C e un sottile strato di celite 500 fine. Dopo aver aggiunto 0,5 mL di nonano come *keeper* (T.D. Bucheli et al. 2004), si è concentrata quindi la soluzione ottenuta (l'estratto) al Rotavapor sino a una volume finale di circa 0,5 mL. Successivamente, per purificare tale soluzione concentrata, si effettua un'estrazione in fase solida (SPE). L'eluizione della cartuccia, effettuata con 1 mL di cicloesano e 4 mL di acetone/cicloesano (1:1, v:v), consente di separare gli analiti di interesse da possibili contaminanti. L'eluato in acetone/cicloesano contenente gli IPA è portato a piccolo volume sotto leggero flusso d'azoto. L'analisi è quindi effettuata in un sistema GC Agilent 6850 interfacciato a un rivelatore MS a quadrupolo Agilent 5875 con acquisizione in SIM.

La procedura è comunque descritta in modo dettagliato nel capitolo Materiali e Metodi.

Figura 3.3: Schema della procedura definitiva per l'analisi degli IPA

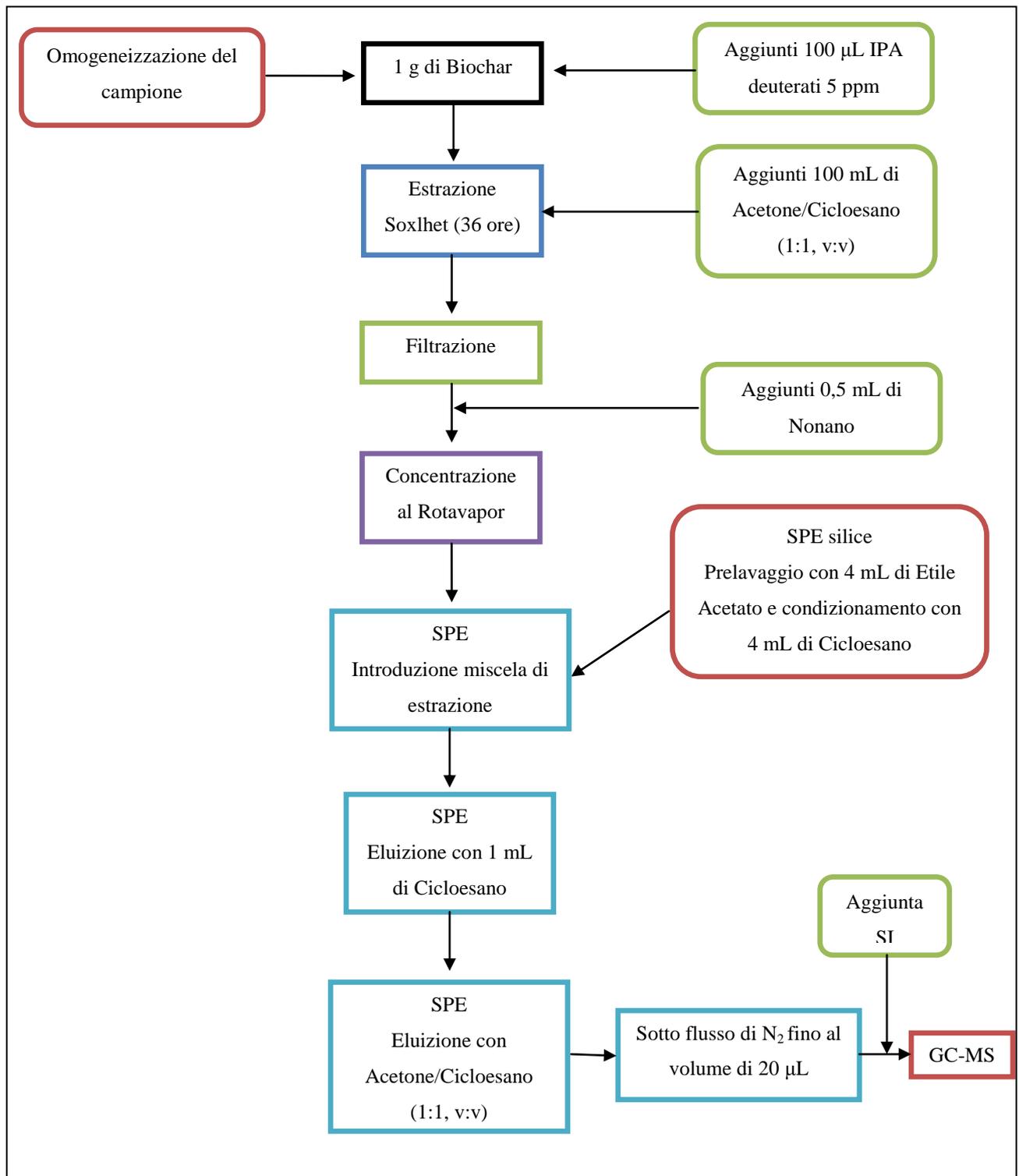
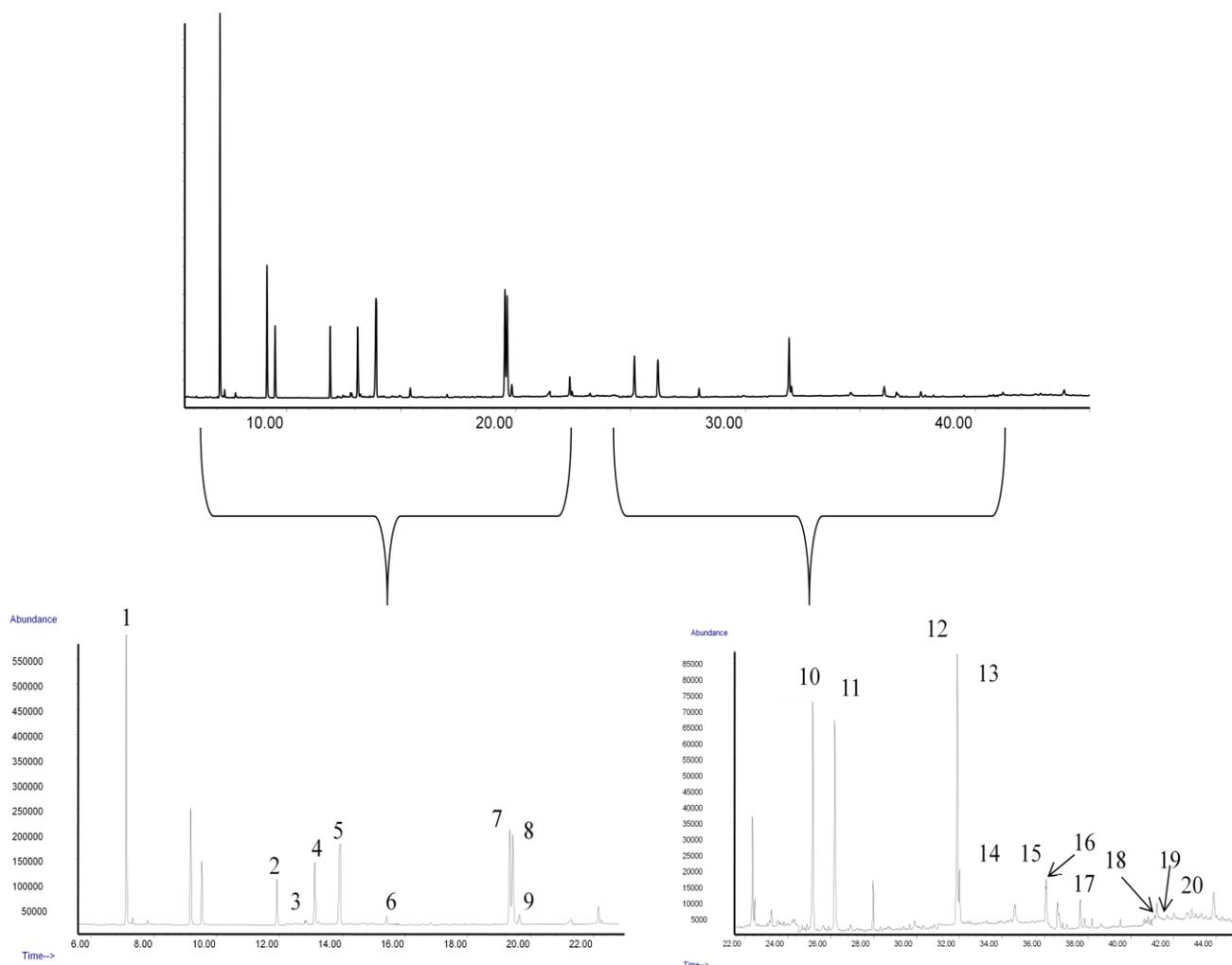


Figura 3.4: Tracciato GC-MS relativo all'analisi degli IPA nel biochar BC-RIF. I numeri dei picchi fanno riferimento alla tabella sottostante.



#	Composto	#	Composto
1	Naftalene	14	Benzo[<i>a</i>]antracene
2	TTB	15	Benzo[<i>b</i>]fluorante
3	Acenaftilene	16	Benzo[<i>k</i>]fluorante
4	Acenaftene-d10	17	Benzo[<i>a</i>]pirene
5	Acenaftene	18	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene
6	Fluorene	19	Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene
7	Fenantrene-d10	20	Benzo[<i>ghi</i>]perilene
8	Fenantrene		
9	Antracene		
10	Fluorantene		
11	Pirene		
12	Crisene-d12		
13	Crisene		

3.3 Validazione del metodo

3.3.1 Calibrazione

L'analisi GC-MS delle soluzioni di calibrazione alle concentrazioni di 0.0025, 0.005, 0.02, 0.25, 0.5 e 1.25 mg/L e allo stesso volume di 0.5 mL ha permesso di determinare la linearità di risposta in funzione della concentrazione degli IPA di interesse. È stato scelto tale intervallo in quanto le concentrazioni di IPA nei vari campioni di biochar ricadono in esso. I risultati ottenuti mostrano un buon intervallo lineare di risposta rispetto alla concentrazione analitica. È possibile analizzare, quindi, soluzioni aventi concentrazioni tra ng/L e mg/L comprendendo un intervallo di 2 ordini di grandezza, utilizzando una sola retta di calibrazione. I coefficienti di correlazione (R^2) sono compresi tra 0,9931 e 0,9999. A titolo di esempio, nelle Fig. 3.5 e 3.6, sono riportate le rette di calibrazione di alcuni IPA. In tali diagrammi sono indicati sull'asse delle ascisse la concentrazione e su quello delle ordinate il rapporto area IPA/area IPA deuterato corrispondente.

Figura 3.5: Curva di calibrazione del pirene con l'utilizzo del fenantrene-d10 come standard interno

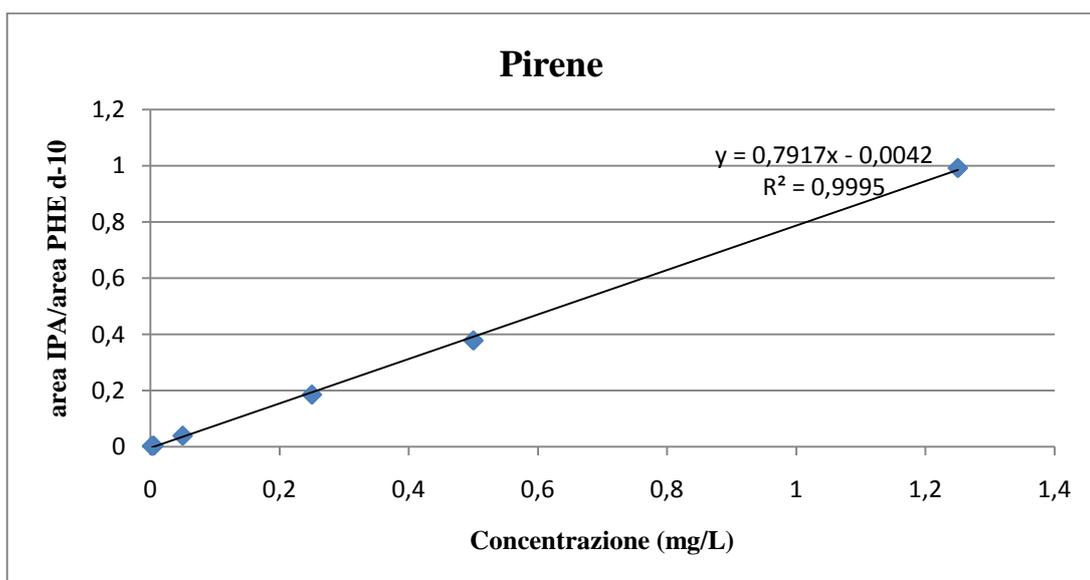
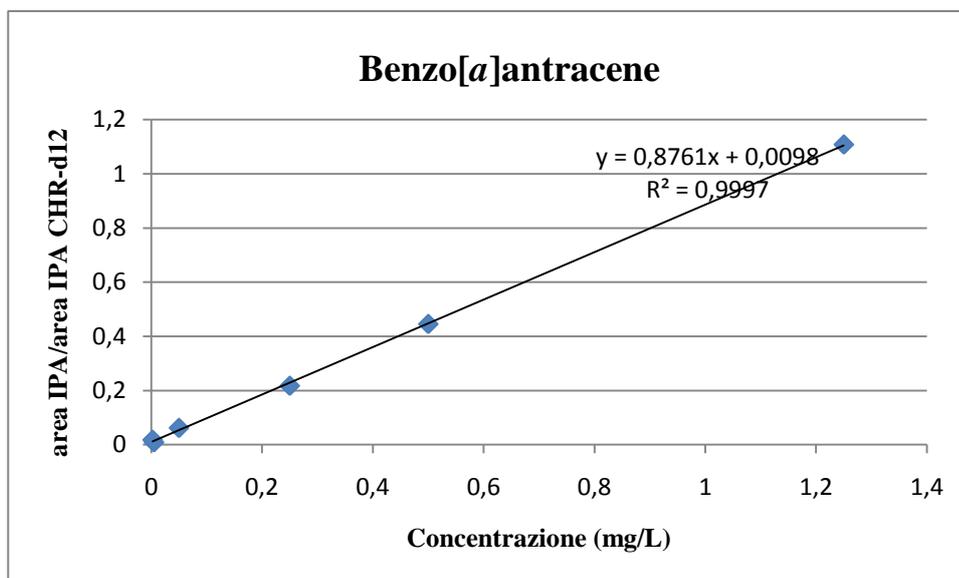


Figura 3.6: Curva di calibrazione del benzo[*a*]antracene con l'utilizzo del crisene-d12 come standard interno



3.3.2 Limite di rivelabilità

La concentrazione minima rilevabile, relativa alla procedura di analisi degli IPA e determinata come descritto nel capitolo Materiali e Metodi, è risultata variare da 0,001 a 0,038 mg/L in relazione all'IPA analizzato. Si è stimato, inoltre, il LOD sul biochar (tabella 3.10) considerando che per la procedura si usano 0.5 g di campione e la soluzione di misurazione è di 0.05 ml.

3.3.3 Limite di quantificazione

I limiti di quantificazione del sistema GC-MS, determinati mediante l'analisi delle soluzioni di calibrazione e con il metodo precedentemente descritto, sono riportati in tabella 3.10.

Tabella 3.10: Limiti di rivelabilità e di quantificazione della procedura analitica ottimizzata

IPA	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Naftalene	0,08	0,2
Acenaftilene	0,01	0,03
Acenaftene	0,03	0,1
Fluorene	0,03	0,1
Fenantrene	0,4	1
Antracene	0,03	0,1
Fluorante	0,08	0,3
Pirene	0,06	0,2
Crisene	0,1	0,4
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,08	0,3
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,2	0,5
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,09	0,3
Benzo[<i>a</i>]pirene	0,2	0,8
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,2	0,7
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	0,3	0,9
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,1	0,4

3.3.4 Precisione

In tabella 3.11 sono riportati i valori medi di concentrazione degli IPA nel biochar BC-RIF e le deviazioni standard relative (RSD percentuale) di quattro repliche consecutive effettuate da un unico operatore. I valori dell'RSD per gli IPA basso bollenti (massa molecolare inferiore a 202 u) sono soddisfacenti, essendo compresi tra 5 e 13%, ad eccezione dell'acenaftene che presenta un RSD del 26%. Ciò potrebbe essere dovuto alla bassa concentrazione di tale IPA.

Tabella 3.11: Concentrazione degli IPA e deviazione standard relativa (%) associata alla loro determinazione nel biochar su 3 repliche.

IPA	Concentrazione $\mu\text{g/g}$	% RSD
Naftalene	1,58	8
Acenaftilene	0,03	13
Acenaftene	0,03	26
Fluorene	0,07	5
Fenantrane	0,71	10
Antracene	0,13	12
Fluorantene	0,30	13
Pirene	0,35	11
Crisene	0,09	11
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,09	9
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,16	9
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,16	37
Benzo[<i>a</i>]pirene	0,17	37
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,14	14
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	0,06	16
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,15	8

I valori di variabilità dei dati sono comunque generalmente bassi e confermano la buona ripetibilità del metodo. Gli unici valori per cui si riscontra un valore di RSD alto sono benzo[*k*]fluorantene (37%) e benzo[*a*]pirene (37%).

Allo scopo di valutare la riproducibilità associata alla procedura di determinazione degli IPA, è stata effettuata una replica dopo 3 settimane. I risultati di tale prova sono riportati in tabella 3.12. Come si può osservare da questi dati, si verifica un generale aumento dell'errore medio associato ai dati, che resta comunque ancora soddisfacente per gli IPA basso bollenti. Si nota inoltre che, non solo si è verificato un generale aumento dell'errore rispetto alle 4 repliche, ma anche che tale errore cresce all'aumentare del peso molecolare degli IPA. Ciò potrebbe essere dovuto alla bassa concentrazione di tali IPA.

Tabella 3.12: Confronto tra concentrazioni di quattro repliche con concentrazioni di una singola analisi effettuata dopo 3 settimane e relativo scarto %.

IPA	Concentrazione media 4 repliche µg/g	Concentrazione singola analisi µg/g	Scarto %
Naftalene	1,58	1,86	+ 17
Acenaftilene	0,03	0,03	1
Acenaftene	0,03	0,04	+ 30
Fluorene	0,07	0,11	+ 51
Fenantrane	0,71	0,87	+ 23
Antracene	0,13	0,11	- 14
Fluorantene	0,30	0,40	+ 31
Pirene	0,35	0,41	+ 17
Crisene	0,09	0,07	- 22
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,09	0,12	+ 30
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,16	0,12	- 25
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,16	0,06	- 61
Benzo[<i>a</i>]pirene	0,17	0,04	- 75
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,14	0,04	- 75
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	0,06	0,04	- 25
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,15	0,07	- 51

3.3.5 Bianco procedurale

I bianchi procedurali sono stati ottenuti applicando la procedura ottimizzata di analisi degli IPA in assenza del campione. I risultati ottenuti mostrano che nel sistema non ci sono fonti di contaminazione. In particolare, non si rileva la presenza di IPA sopra il limite di quantificazione, essendo i picchi coincidenti con il rumore di fondo.

3.3.6 Recupero

I recuperi medi di 3 repliche degli IPA deuterati ottenuti applicando la procedura definitiva di analisi sono riportati nella tabella 3.13. I risultati in tabella mostrano come la procedura ottimizzata di determinazione degli IPA fornisca degli ottimi

recuperi per l'acenaftene-d10 e per il fenantrene-d10, e un buon recupero per il crisene-d12.

Tabella 3.13: Recuperi e RSD dei tre deuterati (acenaftene-d10, fenantrene-d10 e crisene-d10) rispetto all'1,3,5-tertributilbenzene di tre repliche.

IPA deuterati	Recuperi %	RSD %
Acenaftene-d10	88	12
Fenantrene-d10	77	6
Crisene-d12	67	14

3.3.7 Robustezza

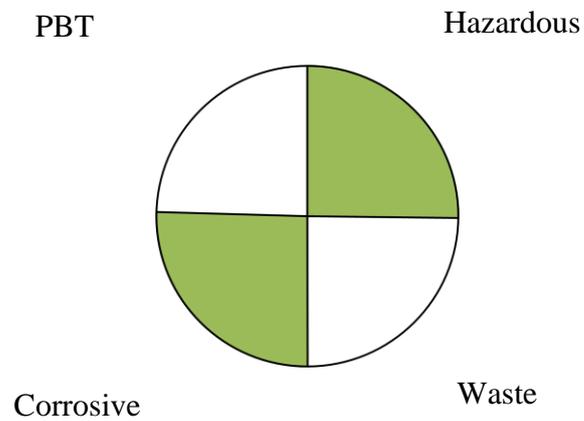
Il metodo è risultato essere sufficientemente robusto. Le variazioni della quantità di campione analizzato, della quantità di standard interno aggiunta, della quantità di solvente utilizzato, infatti, non provocano differenze rilevanti nel recupero degli IPA deuterati e nelle concentrazioni di IPA nelle varie repliche effettuate sullo stesso campione (tabella 3.14).

Tabella 3.14: Recuperi ottenuti variando la quantità di campione analizzato da 3 a 0,5 g, la quantità di standard interno aggiunto da 200 µL a 100 µL 5 ppm la quantità di solvente utilizzato da 500 mL a 100 mL.

IPA deuterati	Campione 3 g % Rec	Campione 0,5 g % Rec	Standard 200 µL % Rec	Standard 100 µL % Rec	Solvente 500 mL % Rec	Solvente 100 mL % Rec
Acenaftene-d10	84	90	88	81	85	89
Fenantrene-d10	71	75	72	65	68	64
Crisene-d12	80	82	81	76	84	78

3.3.8 Greenness

Il profilo di *greenness* del metodo ottimizzato di analisi degli IPA è il seguente:



- **PBT** – No
- **Hazardous** – Sì, essendo il cicloesano è considerato pericoloso secondo la *Toxic Release Inventory* (TRI) dell'EPA
- **Corrosive** – No
- **Waste** – > 50 g

CAPITOLO 4

APPLICAZIONE DELLA METODOLOGIA

4.1 Determinazione di IPA in carboni vegetali

L'ottimizzazione del metodo analitico, su cui si è incentrata la prima parte del presente lavoro, è stato applicato nella seconda parte, all'applicazione dello stesso su campioni di biochar di diversa origine utilizzati in vari studi agronomici per valutare l'effetto del biochar sulle rese agricole e sulla produzione di gas serra. Attraverso tale applicazione ci si poneva come obiettivi la determinazione delle concentrazioni di IPA in campioni rappresentativi di biochar attualmente disponibili sul mercato e l'identificazione dei fattori determinanti la formazione degli IPA nella loro produzione. Infatti, i biochar sono prodotti da varie biomasse e a differenti temperature.

In particolare sono stati analizzati 8 biochar, identificati con le sigle BC-1, BC-2, BC-3, BC-4, BC-5, BC-6, BC-7 e BC-8, e selezionati tra 30 ottenuti da diversi produttori di biochar e laboratori di ricerca nell'ambito di una collaborazione informale tra il laboratorio di chimica analitica del CIRSA e l'USDA-ARS (*US Department of Agriculture – Agricultural Research Service*). Tali biochar sono oggetto di una ricerca in corso dell'USDA-ARS *Biochar and Pyrolysis Initiative*, riguardante gli effetti dell'aggiunta di biochar sulla produzione di gas serra. I 30 biochar, prodotti da varie biomasse ad una temperatura di pirolisi che va da 410°C a 850°C e con un tempo di residenza da secondi a ore, rappresentano un campione di quelli attualmente disponibili sul mercato e che verrà indicato con la sigla USDA nell'ambito di questa tesi.

Si è quindi proceduto all'analisi di char prodotti dalla pirolisi di biomassa erbacea (*Panicum virgatum*) a diverse condizioni di pirolisi al fine di verificare, utilizzando la stessa biomassa e lo stesso sistema pirolitico, l'effetto della temperatura e del tempo di residenza sulla concentrazione degli IPA.

Infine, si è determinata la concentrazione di IPA in char ottenuti dalla pirolisi di biomassa algale (*Botryococcus braunii*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*).

Al fine di ottenere informazioni sulle caratteristiche chimiche dei biochar da analizzare, prima di effettuare la determinazione degli IPA, essi sono stati sottoposti ad analisi elementare e a pirolisi analitica

4.1.1 IPA nei biochar

La tabella 4.1a, 4.1b e la figura 4.1 riportano le concentrazioni dei singoli IPA (esprese in $\mu\text{g/g}$ di campione e relative a due repliche) determinate nei biochar BC-1, BC-2, BC-3, BC-4, BC-5, BC-6, B-7 e BC-8. I valori della deviazione standard relativa (RSD) per i diversi IPA variano dall'1% al 141%. In particolare, gli RSD più alti sono stati sempre riscontrati per gli IPA ad alto peso molecolare. Ciò molto probabilmente è dovuto alla bassa concentrazione di tali IPA che in alcuni casi raggiunge quasi il limite di rilevabilità.

I recuperi degli IPA deuterati (tabella 4.2), ottenuti applicando il metodo analitico ai biochar, sono confrontabili con quelli riportati nel capitolo "Ottimizzazione del metodo" e ottenuti dall'applicazione dello stesso sul biochar di BC-RIF, confermando quindi la solidità del metodo sviluppato. In particolare, per i tre IPA deuterati sono stati ottenuti dei recuperi tra il 100% e il 60% ,con l'unica eccezione del biochar BC-4 per il quale sono stati ottenuti dei recuperi del 48% per l'acenaftene- d_{10} , del 43% per il fenantrene- d_{10} e del 35% per il crisene- d_{12} .

Tabella 4.1a: Concentrazioni di IPA nei biochar BC-1, BC-2, BC-3 e BC-4.

IPA	BC-1		BC-2		BC-3		BC-4	
	µg/g	RSD %						
Naftalene	1,57	37	1,71	5	2,39	9	0,44	9
Acenaftilene	0,50	4	0,30	40	0,04	43	0,01	40
Acenaftene	0,62	36	0,31	119	0,05	24	0,01	47
Fluorene	0,25	3	0,16	25	0,10	11	0,05	40
Fenantrane	0,25	58	0,30	1	0,56	8	0,31	32
Antracene	0,03	45	0,04	32	0,07	5	0,03	69
Fluorantene	0,14	81	0,08	59	0,11	16	0,08	71
Pirene	0,07	30	0,07	13	0,08	7	0,08	78
Crisene	0,05	43	0,02	23	0,02	7	0,02	93
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,04	35	0,02	1	0,05	15	0,04	83
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,02	51	0,05	51	0,04	43	0,04	28
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,02	57	0,01	45	0,04	109	0,02	27
Benzo[<i>a</i>]pirene	0,02	14	0,02	11	0,10	104	0,01	14
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,02	20	0,01	141	0,13	141	n.d.	n.d.
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	0,02	141	0,01	141	0,01	141	0,01	141
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,01	26	0,01	141	0,01	141	0,01	n.d.
Totale	3,63		3,12		3,8		1,16	

Tabella 4.1b: Concentrazioni di IPA nei biochar BC-5, BC-6, BC-7 e BC-8.

IPA	BC-5		BC-6		BC-7		BC-8	
	µg/g	RSD %						
Naftalene	0,47	6	0,78	16	0,49	3	3,36	22
Acenaftilene	0,02	14	0,10	65	0,05	18	0,10	27
Acenaftene	0,07	95	0,24	51	0,22	1	0,11	50
Fluorene	0,08	31	0,59	56	0,26	10	1,13	23
Fenantrane	0,27	1	0,49	39	0,33	22	2,70	27
Antracene	0,03	7	0,19	18	0,12	45	0,33	33
Fluorantene	0,11	1	0,10	137	0,09	59	0,21	69
Pirene	0,12	21	0,16	8	0,07	20	0,10	71
Crisene	0,03	39	0,42	41	0,17	30	0,09	43
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,04	29	0,46	56	0,08	6	0,17	17
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,05	44	0,29	16	0,05	13	0,07	38
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,02	40	0,39	26	0,07	10	0,06	57
Benzo[<i>a</i>]pirene	0,05	11	0,32	12	0,06	40	0,22	76
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,02	9	0,27	20	n.d.	n.d.	0,03	10
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	0,01	32	0,21	21	0,19	98	0,06	77
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,02	11	n.d.	77	n.d.	n.d.	0,08	76
Totale	1,41		5,01		2,25		8,82	

Tabella 4.2: Recuperi e RSD dei tre deuterati (acenaftene-d10, fenantrene-d10 e crisene-d10) di due repliche sui biochar

Biochar ↓	IPA → deuterati	Acenaftene-d10	Fenantrene-d10	Crisene-d12
BC-1	Recupero %	65	64	62
	RSD	2	0	5
BC-2	Recupero %	74	71	64
	RSD	8	3	2
BC-3	Recupero %	93	77	60
	RSD	24	24	22
BC-4	Recupero %	48	43	35
	RSD	12	14	33
BC-5	Recupero %	95	93	88
	RSD	4	0	4
BC-6	Recupero %	70	76	82
	RSD	26	24	8
BC-7	Recupero %	76	77	89
	RSD	0	8	6
BC-8	Recupero %	86	89	100
	RSD	4	0	8

Figura 4.1: Concentrazione di IPA nei biochar

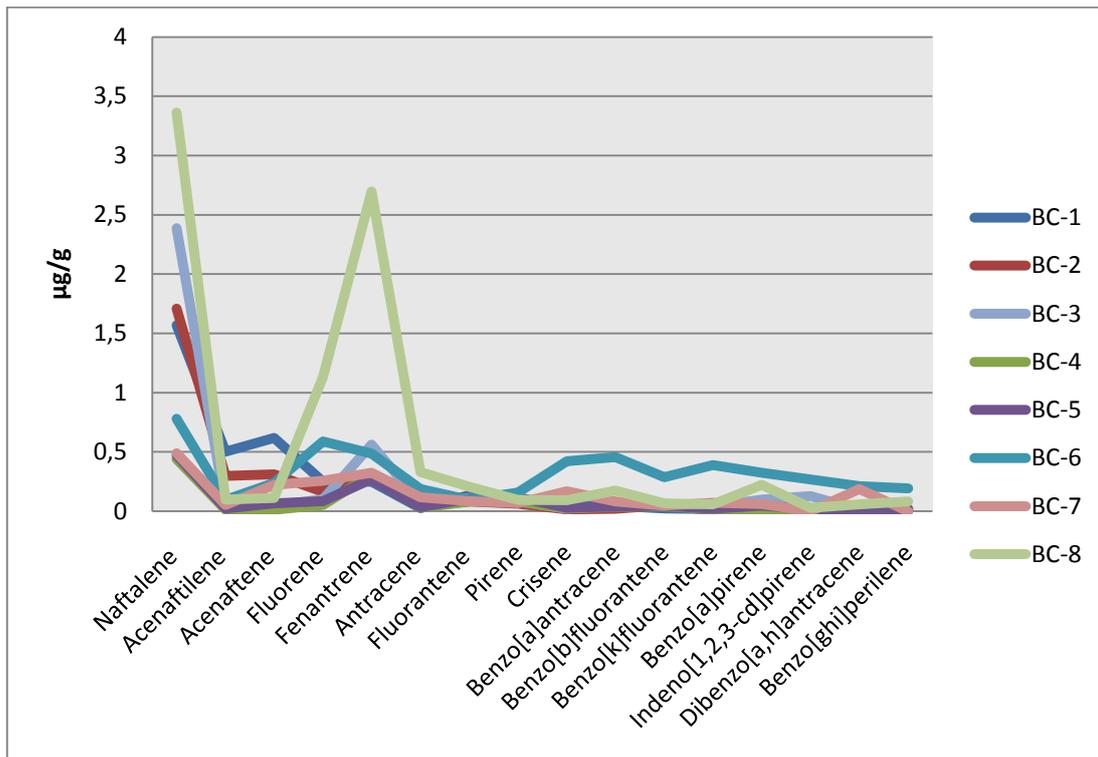
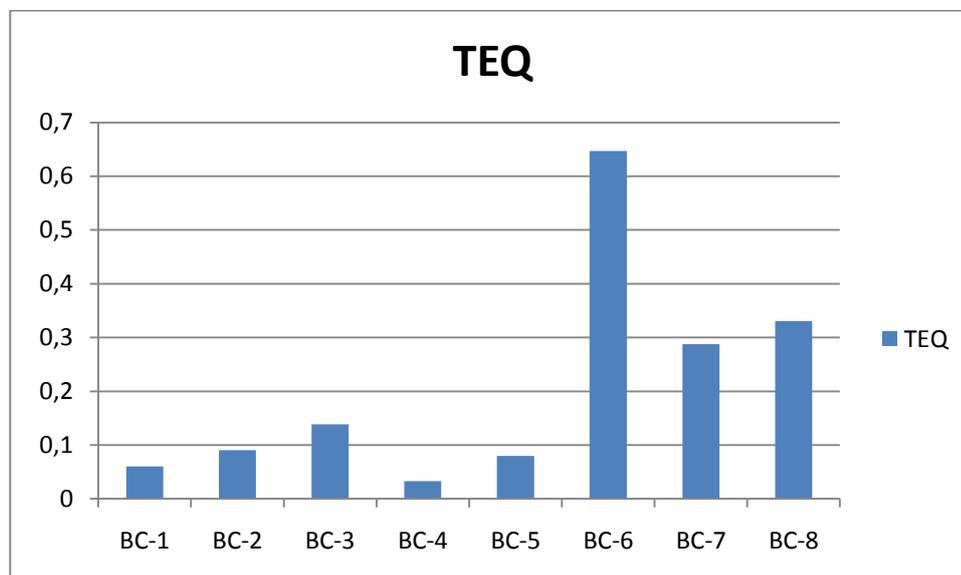


Tabella 4.3: Fattori di tossicità equivalenti (TEF) utilizzati per il calcolo della Tossicità equivalente (TEQ) (Larsen e Larsen, 1998)

IPA	TEF
Fenantrane	0,0005
Antracene	0,0005
Fluorantene	0,05
Pirene	0,001
Crisene	0,03
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,005
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,1
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,05
Benzo[<i>a</i>]pirene	1
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,1
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	1,1
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,2

Figura 4.2: Tossicità equivalente dei biochar



Nelle tabelle 4.1a e 4.2b e in figura 4.1 si può vedere che gli 8 biochar presi in esame presentano, escluso il naftalene, concentrazioni di IPA generalmente inferiori a 0,5µg/g. Se si vanno a considerare le concentrazioni totali di IPA relative ai vari biochar, ottenute dalla somma delle concentrazioni dei singoli IPA, si

riscontrano delle differenze. Si passa infatti da 8,82 µg/g per il biochar BC-7 a 1,41 µg/g per BC-5. Il naftalene è risultato essere l'IPA a maggiore concentrazione in tutti i biochar.

Le maggiori concentrazioni degli IPA ad alto peso molecolare, che sono anche i più tossici, sono state riscontrate nei biochar BC-6 e BC-8. In particolare, è interessante osservare, essendo il benzo[*a*]pirene l'IPA più tossico e dichiarato cancerogeno per l'uomo dallo IARC, come nei biochar BC-6 e BC-8 si hanno delle concentrazioni di tale IPA pari rispettivamente a 0,39 µg/g e 0,22 µg/g contro una media negli altri biochar di circa 0,04 µg/g. Il fatto che i biochar BC-6 e BC-8 presentano le concentrazioni più alte degli IPA più tossici è ben visibile in figura 4.2, in cui è riportata la tossicità equivalente (TEQ) dei vari biochar ottenuta moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun IPA per il TEF corrispondente (tabella 4.3) e sommando i diversi contributi

Nel biochar BC-8 si nota una concentrazione di fenantrene pari a 2,7 µg/g e, come si può vedere nella figura 1, notevolmente superiore a quella riscontrata negli altri biochar.

Dal punto di vista ambientale, per un possibile uso dei biochar nei suoli finalizzato a migliorarne la produttività nonché a contribuire alla mitigazione dei cambiamenti climatici, come già descritto nel capitolo introduttivo, sono molto interessanti i biochar BC-1, BC-2, BC-4 e BC-5, che presentano la minor concentrazione assoluta di IPA ottenuta dalla somma delle singole concentrazioni, nonché una concentrazione degli IPA ad alto peso molecolare che varia da 0,01 a 0,02 contro una concentrazione notevolmente più alta negli altri biochar presi in esame.

Le distribuzioni percentuali dei singoli IPA nei diversi biochar, come si può vedere in figura 4.3, non sono simili. Ciò che si riscontra confrontando tali distribuzioni percentuali è che gli IPA più abbondanti nei vari biochar sono sempre il naftalene e il fenantrene. È interessante notare inoltre che il biochar in cui si ha una distribuzione percentuale dei singoli IPA un po' più uniforme è il BC-6. In particolare, mentre negli altri biochar si nota che gli IPA ad alto peso molecolare (dal benzo[*a*]antracene fino al benzo[*ghi*]perilene) rappresentano circa l'1-2% degli IPA totali, nel biochar BC-6 tali IPA raggiungono quasi il 10 % degli IPA totali.

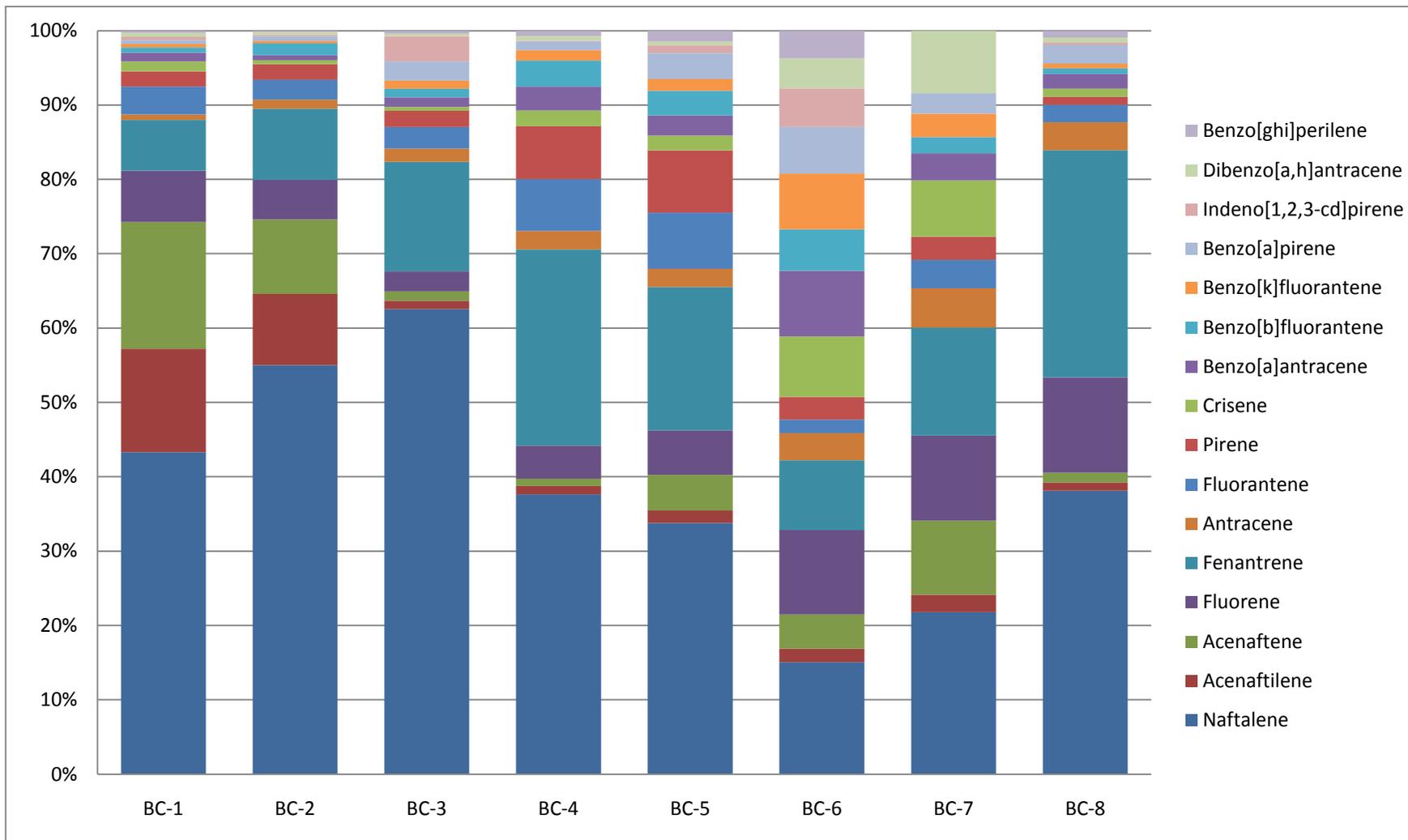


Figura 4.3: Distribuzione percentuale dei singoli IPA nei biochar USDA

4.1.2 IPA nei char da *Panicum virgatum*

Il metodo analitico sviluppato in questa tesi è stato applicato inoltre a char prodotti dalla pirolisi di biomassa erbacea (*Panicum virgatum*) a diverse condizioni di pirolisi con un pirolizzatore da banco, al fine di verificare, utilizzando la stessa biomassa e lo stesso sistema pirolitico, l'effetto della temperatura e del tempo di residenza sulla concentrazione degli IPA. I risultati di tali analisi sono riportati nelle tabelle 4.5a e 4.5b. I recuperi degli IPA deuterati, ottenuti applicando il metodo analitico ai char, sono riportati in tabella 4.4. Da tali risultati si nota come il metodo sviluppato presenta degli ottimi recuperi anche in questo caso, confermando quindi la sua solidità. In particolare, per i tre IPA deuterati sono stati ottenuti dei recuperi tra il 60 e l'83% per l'acenaftene-d₁₀, tra il 75 e l'85% per il fenantrene-d₁₀ e tra l'89 e il 100% per il crisene-d₁₂. È interessante notare come i recuperi più bassi sono quelli dell'acenaftene-d₁₀. Ciò è molto probabilmente dovuto al fatto che essendo l'IPA deuterato più volatile durante l'eliminazione del solvente si verifica un po' di perdita di tale deuterato, come si è potuto anche constatare in fase di ottimizzazione del metodo.

Tabella 4.4: Recuperi (REC) e RSD dei tre deuterati (acenaftene-d₁₀, fenantrene-d₁₀ e crisene-d₁₀) di due repliche sui char prodotti a diverse condizioni di pirolisi.

IPA	450°C 5 min		550°C 5 min		650°C 5 min		450°C 20 min		550°C 20min		650°C 20min	
	REC %	RSD %	REC %	RSD %	REC %	RSD %	REC %	RSD %	REC %	RSD %	REC %	RSD %
Acenaftene-d ₁₀	60	30	70	5	83	-	81	10	80	2	71	8
Fenantrene-d ₁₀	75	2	83	4	85	-	87	5	85	5	85	9
Crisene-d ₁₂	89	9	100	9	100	-	100	5	100	5	100	25

Tabella 4.5a: Concentrazione di IPA nei char prodotti da panico con diverse temperature di pirolisi (450, 550 e 650°C) e con un tempo di residenza di 5 minuti.

IPA	450°C 5 min		550°C 5 min		650°C 5 min	
	µg/g	RSD %	µg/g	RSD %	µg/g	RSD %
Naftalene	0,08	23	0,13	8	0,12	92
Acenaftilene	0,01	141	0,01	31	0,03	24
Acenaftene	0,05	23	0,04	64	0,04	40
Fluorene	0,27	38	0,10	86	0,24	19
Fenantrane	0,16	36	0,17	53	0,20	12
Antracene	0,03	69	0,02	58	0,03	30
Fluorantene	0,10	14	0,05	38	0,06	2
Pirene	0,11	31	0,05	38	0,06	13
Crisene	0,03	59	0,02	14	0,06	9
Benzo[a]antracene	0,11	38	0,04	1	0,05	31
Benzo[b]fluorantene	0,10	39	0,08	111	0,10	42
Benzo[k]fluorantene	0,05	36	0,05	64	0,06	4
Benzo[a]pirene	0,14	44	0,10	70	0,21	109
Indeno[1,2,3-cd]pirene	0,05	118	0,05	68	n.d.	n.d.
Dibenzo[a,h]antracene	0,07	124	0,03	68	0,06	13
Benzo[ghi]perilene	0,05	121	0,03	65	n.d.	n.d.
Totale	1,41		0,97		1,32	

Tabella 4.5b: Concentrazione di IPA nei char prodotti da panico con diversi tempi di residenza (450, 550 e 650°C) e con un tempo di residenza di 20 minuti.

IPA	450°C 20 min		550°C 20 min		650°C 20 min	
	µg/g	RSD %	µg/g	RSD %	µg/g	RSD %
Naftalene	0,20	7	0,44	10	0,35	91
Acenaftilene	0,01	2	0,03	24	0,04	101
Acenaftene	0,02	54	0,07	68	0,08	100
Fluorene	0,07	49	0,18	7	0,17	79
Fenantrane	0,13	13	0,39	51	0,37	61
Antracene	0,02	36	0,06	82	0,08	88
Fluorantene	0,05	2	0,15	57	0,14	76
Pirene	0,06	22	0,15	56	0,19	56
Crisene	0,03	57	0,09	75	0,19	108
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,03	59	0,15	112	0,11	81
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,06	103	0,30	20	0,37	68
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,05	80	0,21	101	0,13	42
Benzo[<i>a</i>]pirene	0,09	75	0,14	29	0,11	55
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,04	30	0,03	65	n.d.	n.d.
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	0,03	67	0,19	104	0,23	16
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,03	33	0,35	127	n.d.	n.d.
Totale	0,92		2,93		2,56	

Le concentrazioni totali di IPA relative ai vari char, ottenute dalla somma delle concentrazioni dei singoli IPA, variano da 0,92 a 2,93 µg/g. I valori della deviazione standard relativa (RSD) per i diversi IPA determinati nei char variano dall'1% al 141%. In particolare, gli RSD più alti sono stati quasi sempre riscontrati per gli IPA ad alto peso molecolare. Ciò molto probabilmente è dovuto alla bassa concentrazione di tali IPA che in alcuni casi raggiunge quasi il limite di rilevabilità.

Per indagare l'effetto della temperatura sulla formazione e quindi sulla concentrazione degli IPA nei char di panico, sono stati determinati gli IPA nei char prodotti a 450°C, 550°C e 650°C, mantenendo costante il tempo di residenza a 5 minuti o a 20 minuti. I risultati sono riportati in figura 4 e 5. Dai risultati ottenuti non si notano particolari differenze fra le concentrazioni di IPA determinate nei char prodotti a diverse temperature. Si nota solo, nel caso della pirolisi con un tempo di residenza di 20 minuti, un leggero aumento delle concentrazioni degli IPA ad alto peso molecolare con l'aumentare della temperatura da 450 a 650°C. In particolare, si nota un incremento nella concentrazione degli IPA ad alto peso molecolare passando

da 450°C a 550°C. Si passa, infatti, da una concentrazione media di circa 0,05 µg/g a una concentrazione media di 0,20 µg/g con picchi di 0,40 µg/g. Tali risultati non consentono comunque di sostenere che effettuare delle pirolisi a bassa temperatura (< 450°C) permette la produzione di char a minor concentrazione di IPA. È altresì importante tuttavia evidenziare che le concentrazioni dei vari IPA, come visto anche nei biochar considerati, dipendono, oltre che dalla temperatura, anche dalla biomassa di partenza e dal tipo di sistema di produzione (pirolisi, gassificazione), quindi se si vuole produrre un char a bassa concentrazione di IPA si dovrebbero tenere in considerazione tutte e tre queste variabili.

Figura 4.4: Concentrazione di IPA nei char prodotti da panico con differenti temperature (450, 550, 650°C) e con un tempo di residenza di 5 minuti.

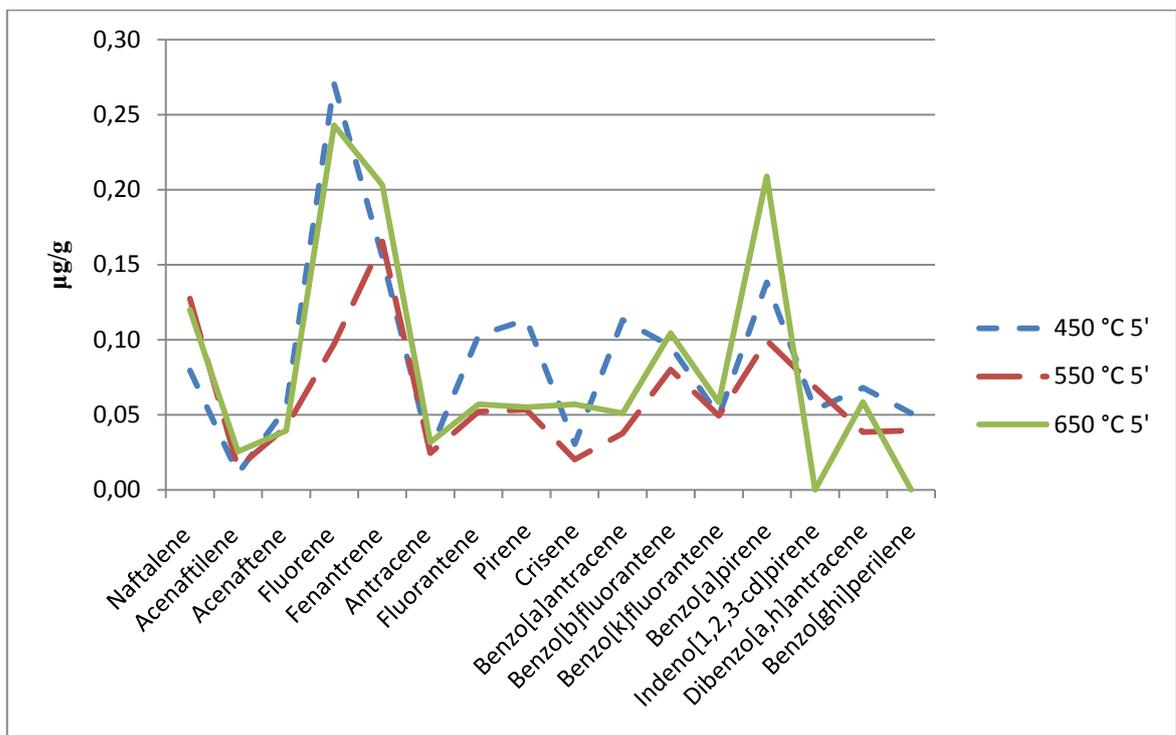
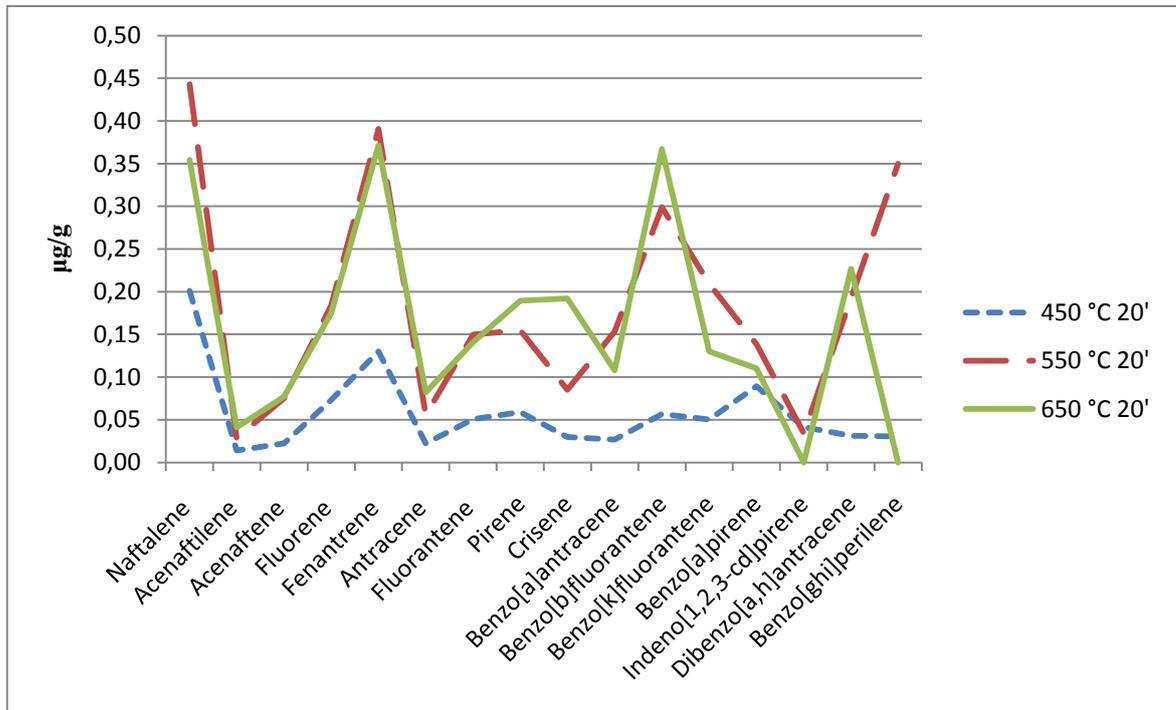
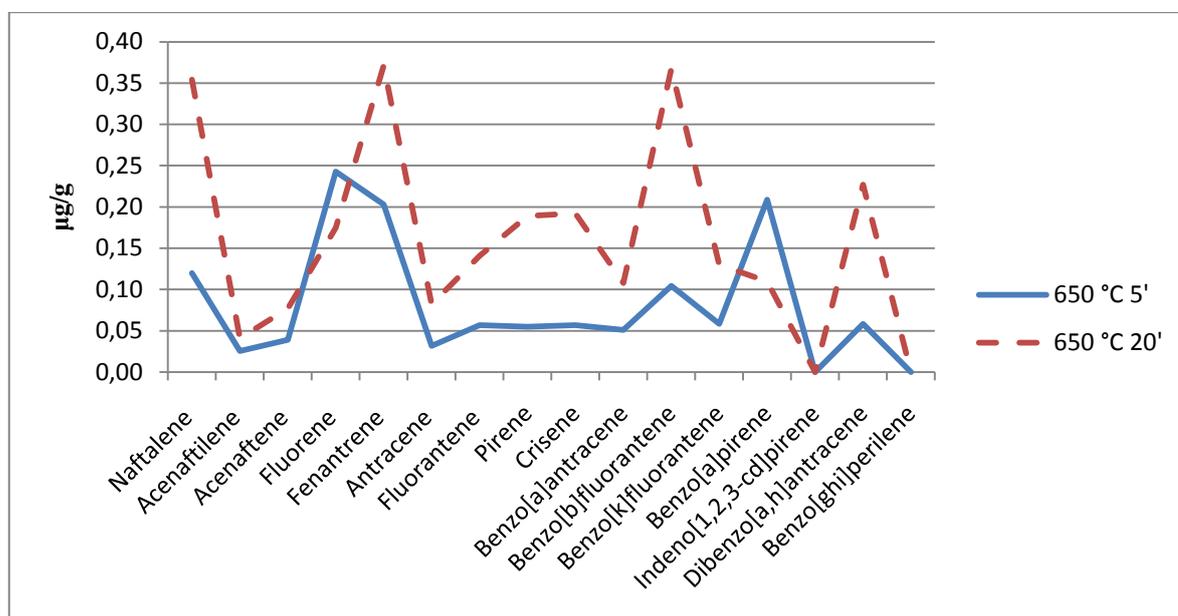


Figura 4.5: Concentrazione di IPA nei char prodotti da panico con differenti temperature (450, 550 e 650°C) e con un tempo di residenza di 20 minuti.



I risultati relativi alle concentrazioni degli IPA nei char ottenuti dalla pirolisi di panico con differenti tempi di residenza sono riportati nelle tabelle 4.5a e 4.5b. Da tale risultati emerge che l'aumento del tempo di residenza porta un leggero aumento delle concentrazioni di tutti gli IPA. In particolare, come si può vedere in figura 4.7, ciò è evidente per i biochar prodotti a 550°C e 650°C.

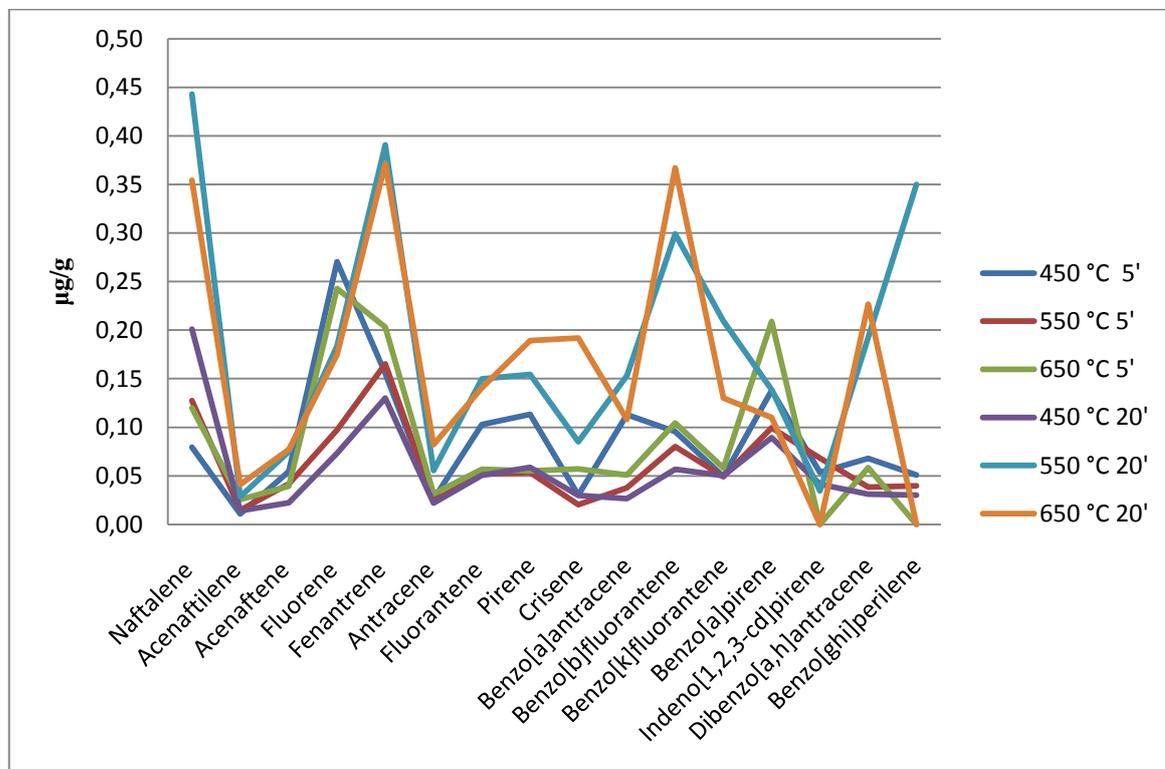
Figura 4.6: Concentrazione di IPA nei char prodotti da panico con differenti tempi di residenza (5 e 20 minuti).



In figura 4.7 sono confrontate le concentrazioni dei vari IPA presenti nei char di panico prodotti a diverse temperature e/o tempi di residenza. In tale figura è possibile osservare che ad influenzare maggiormente la concentrazione di IPA, per temperature superiori ai 550°C, è il tempo di residenza. Infatti, come si può vedere in figura 4.7, i due char che presentano la maggior concentrazione di IPA sono quelli prodotti a 550°C e a 650°C per 20 minuti.

Da tali risultati, tuttavia, non emergono differenze tali, nelle concentrazioni di IPA determinate nei vari char, per poter dire quali sono le migliori condizioni pirolitiche, al fine di avere dei char a minore concentrazione di IPA con il sistema di produzione e la biomassa utilizzati in questa sede.

Figura 4.7: Concentrazione di IPA nei char prodotti da panico con differenti temperature (450, 550 e 650) e con differenti tempi di residenza (5 e 20 minuti).



4.1.3 IPA nei char da microalghe

Mediante la metodica analitica ottimizzata nell'ambito di questa tesi sono stati determinati gli IPA in alcuni char ottenuti dalla pirolisi a 500°C per 5 minuti delle seguenti 3 microalghe: *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*.

I recuperi dei tre IPA deuterati (tabella 4.6), ottenuti applicando il metodo analitico ai char da microalghe, variano tra il 60 e l'83% per l'acenaftene-d₁₀, tra il 75 e l'85% per il fenantrene-d₁₀ e tra l'89 e il 100% per il crisene-d₁₂.

Tabella 4.4: Recuperi dei tre deuterati (acenaftene-d10, fenantrene-d10 e crisene-d10) di una repliche sui char ottenuti da microalghe

IPA deuterato	<i>Scenedesmus</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Botryococcus</i>
	Recupero %	Recupero %	Recupero %
Acenaftene-d10	57	68	65
Fenatrene-d10	74	72	74
Crisene-d12	84	97	95

I risultati relativi alle concentrazioni degli IPA riscontrate in tali char sono riportati in tabella 4.5. Dall'osservazione di tali risultati si può notare in primo luogo come le concentrazioni dei vari IPA siano inferiori rispetto a quelle determinate in tutti gli altri char esaminati ed ottenuti dalla pirolisi di biomasse lignocellulosiche. In particolare, è interessante notare come le concentrazioni degli IPA ad alto peso molecolare rilevate nei char ottenuti da *Botryococcus* e *Scenedesmus* (0,02-0,04 µg/g) siano notevolmente inferiori a quelle rilevate negli altri char considerati in questo lavoro.

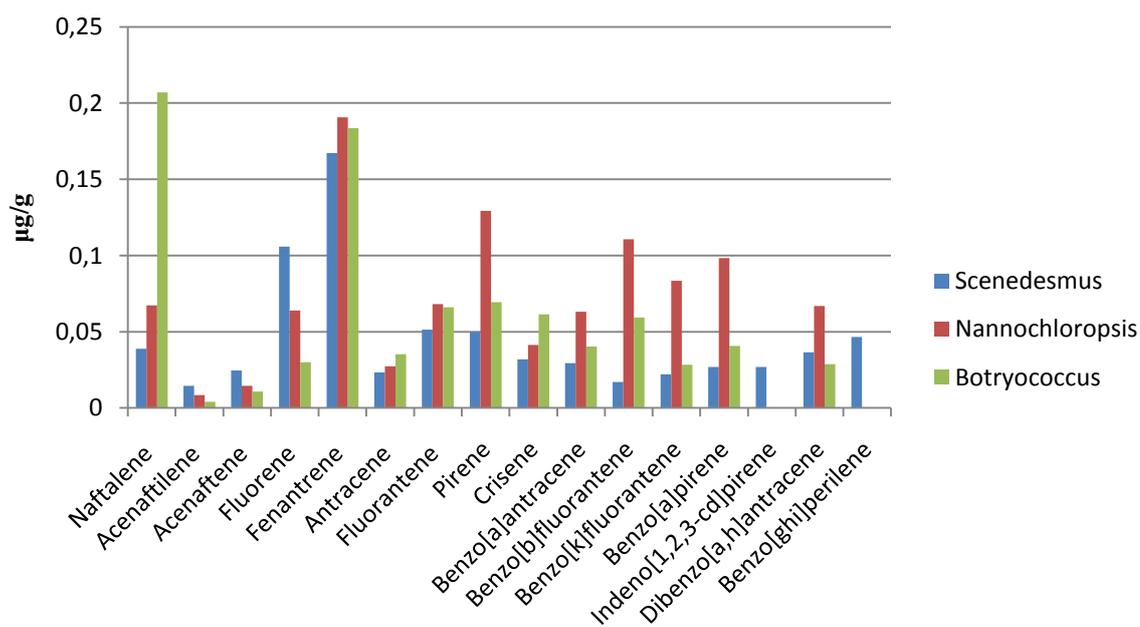
In secondo luogo, è interessante notare come le concentrazioni dei vari IPA nei 3 biochar (figura 4.8) considerati siano simili, ad eccezione di una leggera differenza per quanto riguarda il char prodotto da *Nannochloropsis* che presenta delle concentrazioni più alte degli IPA ad alto peso molecolare.

Ciò è evidente anche se si osserva la distribuzione percentuale dei singoli IPA riportata in figura 4.9. Da tale grafico si può infatti evincere che la distribuzione percentuale dei singoli IPA, ad eccezione del fenantrene, nei diversi char è simile. Ciò non accade nella totalità dei biochar e char presi in esame, ove si è osservato, come in questo caso, una concentrazione di fenantrene più alta rispetto agli altri IPA, ma, a differenza di ciò che si può osservare in figura 4.9, una differenza notevole tra la concentrazione degli IPA a basso peso molecolare e quelli ad alto peso molecolare.

Tabella 4.5: Concentrazione di IPA nei char prodotti da biomasse algali.

IPA	<i>Scenedesmus</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Botryococcus</i>
	µg/g	µg/g	µg/g
Naftalene	0,04	0,07	0,21
Acenaftilene	0,01	0,01	0,01
Acenaftene	0,02	0,06	0,01
Fluorene	0,11	0,19	0,03
Fenantrane	0,17	0,03	0,18
Antracene	0,02	0,07	0,04
Fluorantene	0,05	0,13	0,07
Pirene	0,05	0,04	0,07
Crisene	0,03	0,06	0,06
Benzo[a]antracene	0,03	0,11	0,04
Benzo[b]fluorantene	0,02	0,30	0,06
Benzo[k]fluorantene	0,02	0,08	0,03
Benzo[a]pirene	0,03	0,10	0,04
Indeno[1,2,3-	0,03	n.d.	n.d.
Dibenzo[a,h]antracene	0,04	0,07	0,03
Benzo[ghi]perilene	0,05	n.d.	n.d.
Totale	0,72	1,32	1,6

Figura 4.8: Concentrazione di IPA nei char prodotti da biomasse algali



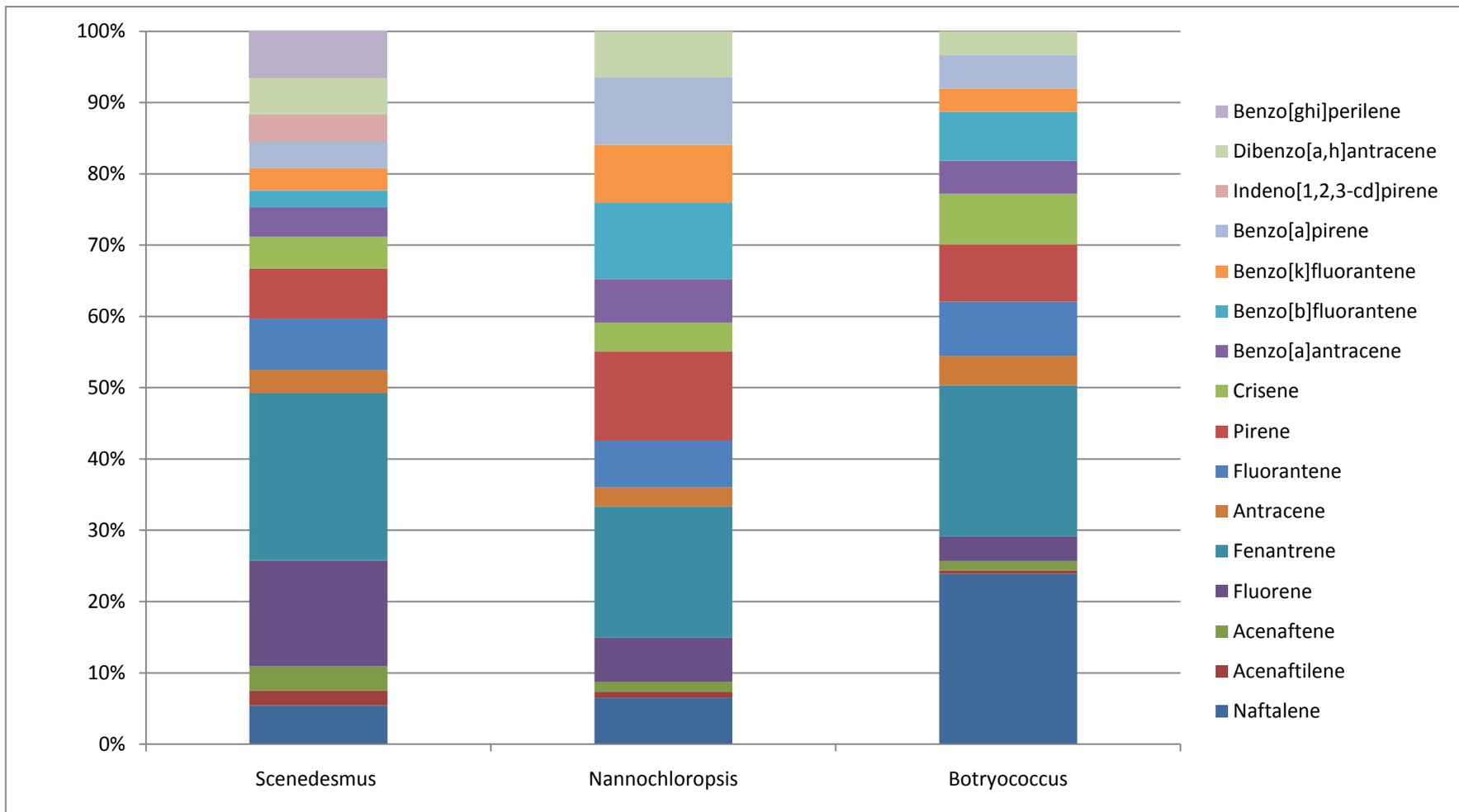


Figura 4.9: Distribuzione percentuale dei singoli IPA nei char da microalghe

4.1.4 Confronto tra le concentrazioni di IPA e le caratteristiche dei biochar/char

Confrontando tutti i dati ottenuti sulle concentrazioni di IPA nei biochar e char presi in esame si nota come tra un biochar e l'altro possono sussistere delle differenze anche significative. Si passa ad esempio da una concentrazione totale di tutti gli IPA di 8,82 µg/g a una concentrazione di 1,2 µg/g per biochar provenienti dalla pirolisi di diverse biomasse a diverse temperature (tabella 4.6).

Per quanto riguarda la relazione tra la concentrazione di tali analiti e i parametri di pirolisi, nei char di panico si è potuto constatare come utilizzando la stessa materia prima e variando solo o la temperatura di pirolisi o il tempo di residenza non si hanno delle marcate differenze nelle concentrazioni degli IPA, le cui concentrazioni totali variano nell'intervallo 0,92 µg/g - 2,6 µg/g. In particolare si è potuto osservare che all'aumentare della temperatura da 450°C a 650°C o del tempo di residenza da 5 a 20 minuti si verificava solo un leggero aumento delle concentrazioni degli IPA ad alto peso molecolare.

Tuttavia, prendendo in considerazione tutti i biochar analizzati, si nota che si possono avere alte concentrazioni di IPA anche a basse temperature di pirolisi come nel caso del biochar BC-6 che è stato prodotto a 350°C. Ciò mette in luce il ruolo importante sia dei parametri di pirolisi che della biomassa di partenza nella formazione degli IPA.

Con riferimento sempre all'insieme dei biochar presi in esame, le concentrazioni più alte di IPA sia ad alto che a basso peso molecolare si riscontrano nel biochar BC-6 e BC-8. In tali biochar si ha una concentrazione del benzo[*a*]pirene che può arrivare anche a 0,35 µg/g e in generale una concentrazione degli IPA ad alto peso ossia di benzo[*a*]antracene, benzo[*b*]fluorantene, benzo[*k*]fluorantene, dibenzo[*a,h*]antracene e benzo[*ghi*]perilene, che varia da 0,21 a 0,41 µg/g. Se si confronta la concentrazione del benzo[*a*]pirene rilevata in tale biochar con la concentrazione massima di questo analita nei suoli prevista dalle norme vigenti (DLgs 152/06), che è pari a 0,1 µg/g, ci si rende conto che la concentrazione degli IPA potrebbe essere un aspetto da valutare se si decide di utilizzare un biochar per fini agronomici.

È interessante notare come nei char prodotti dalla pirolisi di microalghe le concentrazioni dei vari IPA siano inferiori rispetto a tutti i biochar studiati in questa tesi e ottenuti dalla pirolisi di biomasse lignocellulosiche. Ciò potrebbe essere

rilevante dal punto di vista agronomico perché tali biochar, presentando una concentrazione di azoto (5,5%) superiore a quella presente nella maggior parte dei biochar prodotti dalle biomasse lignocellulosiche, potrebbero essere utilizzati come fonte a rilascio lento di azoto per i suoli.

Sui campioni di biochar e char presi in esame è stata condotta l'analisi elementare. I risultati di tali analisi sono riportati nelle tabella 4.6, 4.7 e 4.8. In tabella 4.6, in particolare, sono riportati i contenuti di carbonio, idrogeno, azoto e ossigeno dei biochar. Come si evince dai risultati riportati in tale tabella, i contenuti di carbonio e ossigeno variano rispettivamente tra il 57 e il 91% e tra il 12 e il 4%. Si può notare una corrispondenza tra questi due elementi: in particolare, all'aumentare del carbonio si ha un diminuzione dell'ossigeno e viceversa. Il campione BC-4 che presenta la massima concentrazione di carbonio, pari al 91,6%, è infatti anche quello che ha la concentrazione più bassa di ossigeno. Si può osservare anche che, nel range di temperature di pirolisi (350-550°C) a cui sono stati prodotti i vari biochar, non vi è una corrispondenza esatta tra aumento della temperatura e aumento del contenuto di carbonio. È evidente quindi che sul contenuto di carbonio, anche se in un intervallo non molto ampio di temperature di pirolisi e soprattutto a temperature non molto alte (< 600°C), vi è un'influenza della biomassa di partenza.

Spesso, quando si usa il biochar per migliorare le qualità agronomiche di un terreno, un fattore limitante è rappresentato dalla quantità di azoto disponibile. Su tale aspetto, dall'analisi delle concentrazioni di azoto dei vari biochar sono emersi alcuni dati molto interessanti relativi in particolare a BC-6 e ad BC-7, che presentano rispettivamente una concentrazione del 7,52% e del 7,43%, discostandosi molto dalle altre concentrazioni, ad eccezione dei char da microalghe, che sono tutte tra 0,32% e 0,83%. Tale differenza è molto probabilmente dovuta sia al fatto che tali biochar sono stati prodotti a temperature di pirolisi più basse rispetto agli altri sia alla materia prima di partenza (residuo solido ottenuto dalla produzione di etanolo da cereali). In tabella 5.1 si vede inoltre che le concentrazioni di idrogeno variano tra il 2,42% e il 4,81%, mentre quelle di zolfo tra lo 0% e lo 0,96%. Tali valori di concentrazione dello zolfo e dell'idrogeno corrispondono a quelli presenti in letteratura per la maggior parte dei biochar.

Tabella 4.6: Composizione elementare, biomassa di partenza e temperatura di pirolisi dei biochar

Id.	Pirolisi °C	Biomassa	C	H	N	O	S
BC-1	500	Segatura di legno	69.5	3.06	0.32	13.1	0.01
BC-2	500	Segatura di legno	62.9	2.80	0.32	11.8	0.01
BC-3	475	Scarti di legno	81.5	2.42	0.36	7.7	0.01
BC-4	550	Scarti di legno	91.4	2.89	0.38	4.60	0.00
BC-5	n/a	Legno duro	56.9	2.77	0.41	10.5	0.41
BC-6	350	Residuo di grano distillato	68.6	4.81	7.52	6.6	0.96
BC-7	400	Residuo di grano distillato	69.4	4.31	7.43	5.9	0.90
BC-8	400	Scarti di legno	79.8	3.73	0.83	11.9	0.01

In tabella 4.7 viene riportata la composizione elementare dei char di biomasse algali. Dai risultati emerge come i char prodotti da microalghe, in particolare da *Scenedesmus sp.*, mostrino una concentrazione di azoto (5,5%) leggermente inferiore a quella dei biochar BC-6 e BC-7, ma superiore a quella presente nella maggior parte dei biochar prodotti dalle biomasse lignocellulosiche terrestri riportate in questo studio e in generale nella maggior parte delle biomasse utilizzate per la produzione di biochar (Torri C. et al., 2010). Ciò è interessante dal punto di vista agronomico in quanto un char ricco in azoto potrebbe essere utilizzato come fonte a rilascio lento di azoto per i suoli. Si nota inoltre come tali char, rispetto agli altri analizzati nell'ambito di questa tesi, che hanno tutti una concentrazione di carbonio che varia tra il 60% e il 91%, presentano una percentuale di carbonio nettamente inferiore variante tra il 21% e il 37%, determinata molto probabilmente dall'elevato contenuto in ceneri. Le concentrazioni di idrogeno, ossigeno e zolfo, invece, non si differenziano molto da quelle ottenute dalle analisi degli altri biochar presi in esame.

Tabella 4.7: Composizione elementare char da biomasse algali

Biomassa	C	H	N	O	S
<i>Nannochloropsis gatidana</i>	21,1	1,6	3,6	6,1	0,9
<i>Scenedesmus sp.</i>	37,4	3	5,5	10,4	0
<i>Botryococcus braunii</i>	26,6	1,5	1,9	8,5	0

La composizione elementare di un char dipende dalla materia prima e dai processi di produzione. Si è voluto verificare, per una determinata materia prima, quanto la composizione elementare del char possa essere influenzata dalla temperatura e dal tempo di residenza della pirolisi. Per verificare ciò sono state effettuate le analisi elementari di 6 char di panico prodotti a differenti temperature e/o tempo di residenza. Dai risultati riportati in tabella 4.8 non si notano all'aumentare della temperatura o del tempo di residenza differenze significative nelle concentrazioni dei vari elementi. Con l'aumento della temperatura e del tempo di residenza si verifica solo una leggera diminuzione dell'idrogeno che passa dal 3,9% della biomassa pirolizzata a 450°C per 5 min all'1,7% del char ottenuto con una pirolisi a 650°C per 20 min, e una piccolo aumento del carbonio che passa dal 67,2 del char ottenuto a 450°C per 5 minuti al 71% del char ottenuto a 650°C per 20 minuti. Tali differenze, essendo molto piccolo, però potrebbero essere determinate dalla precisione del metodo. Per quanto riguarda, invece, l'azoto e lo zolfo, il primo rimane costante intorno allo 0,5%, mentre il secondo non è mai presente.

Tabella 4.8: Composizione elementare di char ottenuti da pirolisi di panico a differente temperatura e/o tempo di residenza

Panico	C	H	N	O	S
450 °C 5 min	67,2	3,9	0,5	14,8	0
450 °C 20 min	68,9	3,3	0,5	17,1	0
550 °C 5 min	68,8	2,6	0,4	11,8	0
550 °C 20 min	69,1	2,3	0,4	11,9	0
650 °C 5 min	68,9	1,8	0,4	10,1	0
650 °C 20 min	71,2	1,7	0,4	7,2	0

Tabella 4.9: Superficie (SA, m² g⁻¹), umidità (H₂O, peso %), sostanze volatili (VM), carbonio fisso (FC) e ceneri (peso % sulla sostanza secca). Rese in µg g⁻¹ e rapporto benzene/toluene (B/T) da Py-GC-MS.

Biochar	SA	H₂O	VM	FC	Ceneri	Py rese	B/T	IPA totali µg/g
BC-1	1	4.40	29.1	44	14	3600	1.1	3,62
BC-2	10	3.6	24.5	50	22.1	2700	1.2	3,12
BC-3	251	8.70	18.2	74	7.97	720	2.0	3,8
BC-4	106	1.33	15.2	84	1.03	910	1.9	1,16
BC-5	34	6.29	34.7	36	29	4300	1.0	1,41
BC-6	0.28	1.75	45.7	44	11.5	7700	0.3	5,01
BC-7	0.28	1.97	37.6	50	11.9	6800	0.3	2,25
BC-8	3.5	3.71	26.8	70	3.7	4500	1.2	8,82

Tabella presa da D. Fabbri, C. Torri e K. Spokas, inviato per la pubblicazione Journal of Analytical and Applied Pyrolysis

In tabella 4.9 sono riportate superficie, umidità, sostanze volatili, carbonio fisso, rese e rapporto benzene/toluene (B/T) da Py-GC-MS dei vari biochar considerati in questa tesi insieme alle concentrazioni totali di IPA determinate in tali biochar. Mettendo a confronto tali caratteristiche con le concentrazioni totali di IPA non si sono trovate marcate relazioni tra tali caratteristiche e le concentrazioni totali.

4.2 Determinazione degli IPA in suoli trattati e non trattati con biochar

Nel presente lavoro si sono infine effettuate delle prove per verificare l'efficienza del metodo ottimizzato nella determinazione degli IPA in suoli ammendati con biochar. In particolare, si è fatto ricorso a campioni di suolo già trattati con biochar BC-RIF.

Per quanto riguarda l'efficienza del metodo, si sono ottenuti dei recuperi dell'86% per l'acenaftene-d₁₀, del 91% per il fenantrene-d₁₀ e del 96% per il crisene-d₁₂, mentre i valori degli RSD variano dal 27% all'1%. Tali risultati, anche se ottenuti su due sole repliche, dimostrano che il metodo analitico sviluppato si potrebbe utilizzare anche per la determinazione degli IPA nei suoli ammendati con biochar.

I risultati relativi alle concentrazioni degli IPA in tali suoli sono riportati in tabella 4.10 insieme alle concentrazioni degli IPA determinate nel biochar BC-RIF. Da tali risultati emerge innanzitutto come il metodo sviluppato in questa tesi riesca ad apprezzare le piccole differenze di concentrazione di IPA tra i suoli trattati e quelli non trattati. In particolare, si vede che i suoli non trattati con biochar sono praticamente privi di IPA con concentrazioni per gli IPA a basso peso molecolare poco sopra il LOD, e sotto il LOD invece per quelli ad alto peso molecolare. È interessante notare invece come nel suolo trattato con il biochar BC-RIF si riescono ad identificare e a quantificare quasi tutti gli IPA. Nello specifico, si osservano delle concentrazioni che variano da 5 a 40 ng/g, con una concentrazione leggermente più alta riscontrata per gli IPA ad alto peso molecolare. Se si osservano tali concentrazioni, e si confrontano inoltre con quelle di IPA nel biochar, si evince che gli IPA presenti nel suolo trattato probabilmente derivano dal biochar. Ciò potrebbe trovare conferma nel fatto che le concentrazioni leggermente più alte sono riscontrate per gli IPA ad alto peso molecolare che sono anche i più resistenti alla degradazione microbica. Bisogna tuttavia evidenziare sia il fatto che il naftalene, che è l'IPA più abbondante nel biochar, non viene determinata nel suolo trattato con biochar sia che si tratta sempre di concentrazioni prossime al LOD. Affermare quindi con certezza che gli IPA presenti nel suolo derivano dal biochar non è possibile.

Tabella 4.10: Concentrazione di IPA in suoli trattati e non trattati con biochar

IPA	BC-RIF		Suolo + BC-RIF		Suolo	
	ng/g	RSD %	ng/g	RSD %	ng/g	RSD %
Naftalene	2300	23	< LOD	-	< LOD	-
Acenaftilene	30	26	5	21	4	22
Acenaftene	50	26	7	16	7	11
Fluorene	100	21	12	12	14	33
Fenantrane	900	7	28	15	< LOD	-
Antracene	290	20	8	23	4	27
Fluorantene	470	17	27	7	14	3
Pirene	440	14	25	8	13	8
Crisene	120	26	10	18	< LOD	-
Benzo[<i>a</i>]antracene	150	17	17	1	10	4
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	220	37	40	12	< LOD	-
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	130	51	9	21	< LOD	-
Benzo[<i>a</i>]pirene	230	36	27	12	< LOD	-
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	160	52	30	22	< LOD	-
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	50	55	18	12	< LOD	-
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	140	29	20	4	< LOD	-
Totale	5780		288		68	

4.3 Confronto con la letteratura

Un confronto diretto con una metodologia analitica per la determinazione degli IPA nel biochar non è possibile in quanto in letteratura non è ad oggi presente un metodo specifico per la determinazione degli IPA in tale matrice.

Si è quindi deciso di confrontare la procedura analitica sviluppata nell'ambito di questa tesi con alcune procedure presenti in letteratura per la determinazione degli IPA in matrici complesse quali char, coal, soot, suolo e sedimenti.

In letteratura sono presenti vari studi in cui è stata effettuata la determinazione degli IPA in matrici complesse quali char, coal, soot, suolo e sedimenti.

Di particolare interesse è uno studio (R.A. Brown et al., 2006) in cui sono stati determinati gli IPA in char da legno, in quanto tale matrice è molto simile ai biochar analizzati in questa tesi. In tale studio viene utilizzata una procedura (D.L.

Poster et al., 2003a,b) sviluppata per la determinazione degli IPA nel particolato da motori diesel. In tale procedura, dopo l'aggiunta degli IPA deuterati, l'estrazione viene effettuata mediante Soxhlet per 18 ore con diclorometano. L'estratto viene quindi concentrato al Rotavapor fino a raggiungere un volume finale di 0,5 mL. Successivamente, per purificare tale soluzione concentrata, viene effettuata un'estrazione in fase solida (SPE) utilizzando per l'eluizione diclorometano. L'eluato così ottenuto viene analizzato in GC/MS.

Tale procedura riportata in letteratura è stata applicata, come suddetto, in uno studio per determinare gli IPA in char da legno. In particolare, in questo studio sono stati determinati gli IPA in char ottenuti dalla pirolisi di xilema di *Pinus Rigida* a 450 °C, 525°C e 1000°C per 30 minuti. Le concentrazioni degli IPA determinate in tale lavoro sono riportate in tabella 5.8 insieme alle concentrazioni ottenute in questa tesi per il biochar BC-3 (prodotto dalla pirolisi di biomassa lignea a 475°C). È opportuno comunque specificare che nello studio non vengono riportate informazioni sui recuperi e sugli RSD ottenuti.

È molto interessante, essendo i char analizzati in tale lavoro simili ad alcuni biochar considerati in questa tesi, effettuare un confronto fra le concentrazioni riportate in tale studio e quelle ottenute in questa tesi (tabella 4.11). Dal confronto si nota come le concentrazioni riportate per i char prodotti a 450°C e 525°C sono molto simili a quelle determinate in alcuni biochar. Se si osservano, infatti, le concentrazioni riportate in tabella 5.8, si nota come l'IPA più abbondante è sempre il naftalene ma più in generale come le concentrazioni dei singoli IPA, ad eccezione del benzo[*a*]pirene e dell'indeno[1,2,3-*cd*]pirene, sono quasi uguali. Inoltre, anche le concentrazioni totali di IPA sono pressoché identiche.

Tabella 4.11: Concentrazione degli IPA in char da legno prodotti mediante pirolisi a diverse temperature e nel biochar BC-3.

IPA	BC-3	Char 450°C	Char 525°C	Char 1000°C
	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
Naftalene	2,39	1,77	2,35	0,35
Acenaftilene	0,04	0,006	0,01	0,02
Acenaftene	0,05	0,07	0,05	0,05
Fluorene	0,10	0,31	0,12	0,06
Fenantrane	0,56	0,52	0,45	0,22
Antracene	0,07	0,19	0,08	0,02
Fluorantene	0,11	0,05	0,04	0,05
Pirene	0,08	0,08	0,05	0,04
Crisene	0,02	0,07	0,04	0,02
Benzo[<i>a</i>]antracene	0,05	0,07	0,03	0,02
Benzo[<i>b</i>]fluorantene	0,04	0,02	0,02	0,03
Benzo[<i>k</i>]fluorantene	0,04	0,007	0,007	0,03
Benzo[<i>a</i>]pirene	0,10	0,03	0,03	0,02
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pirene	0,13	0,02	0,02	0,03
Dibenzo[<i>a,h</i>]antracene	0,01	0,009	0,006	0,02
Benzo[<i>ghi</i>]perilene	0,01	0,03	0,02	0,03
Totale	3,8	3,2	3,3	1

Tabella presa da R.A. Brown et al., 2006

In uno studio molto interessante (Jonker M. T. O. et al., 2002) è stata effettuata la determinazione degli IPA in fuliggine di varia origine e in carbone fossile e vegetale mediante diversi solventi. In particolare, in tale studio è stata valutata l'efficienza estrattiva dei solventi e delle miscele di solventi seguenti: diclorometano, toluene, toluene/metanolo(1:6), toluene/etanolo(1:4), benzene/etanolo (3:2), benzene/1-propanolo (3:1), e n-esano/acetone (3:1). La procedura utilizzata per valutare l'efficienza estrattiva dei vari solventi prevede l'estrazione mediante Soxhlet per 16 ore con 70 mL di solvente (o miscela). L'estratto è concentrato al Rotavapor e sotto leggero flusso d'azoto. Tutti gli estratti ottenuti sono poi purificati mediante SPE (4 g) con allumina utilizzando per l'eluizione 30 mL di esano. L'eluato così ottenuto viene analizzato in GC/MS.

I risultati di tale studio relativi al carbone vegetale, che costituisce la matrice più simile a quella studiata in questa tesi, sono riportati in tabella 4.12. Da tali risultati si può notare come il solvente che presenta la migliore capacità estrattiva è il toluene.

È necessario però sottolineare che non vengono determinati tutti i 16 IPA prioritari dell'EPA ma 13 IPA e, inoltre, che l'efficienza estrattiva non è riferita agli IPA effettivamente estratti attraverso l'uso di surrogati. I recuperi dei vari IPA, infatti, sono stati calcolati considerando il recupero ottenuto dal migliore solvente di estrazione come il 100% di recupero.

Tabella 4.12: Recuperi relativi (%) degli IPA da carboni vegetali mediante l'utilizzo di diversi solventi di estrazione

Solvente	Carbone vegetale % recupero
Diclorometano	61
Toluene	100
Toluene/metanolo (1:6)	51
Toluene/etanolo (1:4)	71
Benzene/etanolo (3:2)	79
Benzene/1-propanolo (3:1)	65
n-esano/acetone (3:1)	61

Tabella presa da Jonker M. T. O. et al., 2002

Sulla base dei risultati riportati in tabella 4.12 si è deciso nella presente tesi, in fase di ottimizzazione del metodo, di effettuare delle prove di estrazione a riflusso in cui valutare la capacità estrattiva degli IPA nel biochar dei seguenti solventi: toluene, diclorometano e di una miscela cicloesano/acetone. Si è utilizzato una miscela con cicloesano al posto dell'n-esano, utilizzato nello studio riportato in letteratura, perché meno tossico. I risultati relativi a tali prove hanno mostrato come i vari solventi forniscano recuperi sostanzialmente confrontabili, ad eccezione del toluene che ha consentito di ottenere dei recuperi sostanzialmente migliori per il crisene deuterato. Sulla base di tali risultati e in considerazione della tossicità del diclorometano e del toluene, si è deciso di scartare diclorometano e toluene, e di effettuare delle estrazioni utilizzando una miscela cicloesano/acetone variando prima i rapporti tra i due solventi e poi i tempi di estrazione. Un notevole incremento dei recuperi si è verificato con l'aumento dei tempi di estrazione. Si è passati ad esempio da un recupero del crisene-d12 del 30% con 18 ore di estrazione a un

recupero del 70% con 36 ore. Si è quindi arrivati alla procedura definitiva che prevede un'estrazione mediante Soxhlet con una miscela acetone/cicloesano (1:1, v:v) e un tempo di estrazione di 36 ore.

Pur non essendo presente in letteratura un metodo ottimizzato per la determinazione degli IPA nel biochar, si è visto che in uno studio (Li D. et al., 2011) è stata effettuata la determinazione di tali analiti in biochar ottenuti dalla pirolisi di segatura di legno di melo. In particolare, per tale determinazione è stato utilizzato un metodo ottimizzato per la determinazione degli IPA nel suolo o in sedimenti. La procedura utilizzata prevedeva l'estrazione mediante Soxhlet per 16 ore con 300 mL di una soluzione acetone/n-esano (1:1, v:v), e per la fase di clean up un'estrazione in fase solida utilizzando una cartuccia SPE con allumina. La soluzione così ottenuta veniva analizzata in GC-MS operante in SIM. In tale procedura si prevedeva l'aggiunta di un surrogato degli IPA per il calcolo del recupero, ma in conclusione non sono state fornite informazioni relative ai recuperi ottenuti o altre informazioni relative alle figure di merito del metodo. È stato invece riferito che, mediante la procedura utilizzata, gli unici IPA dei quali veniva riscontrata la presenza nei biochar analizzati erano il naftalene, che presentava una concentrazione di 3,29 µg/g, il fluorene e il fenantrene per i quali veniva indicata rispettivamente una concentrazione di 0,02 e 0,1 µg/g. Confrontando tale procedura con la procedura utilizzata in fase di ottimizzazione del metodo, che prevedeva un'estrazione di 16 ore mediante Soxhlet con una soluzione di acetone/cicloesano (1:1, v:v), si nota che le due procedure sono molto simili. L'unica differenza è rappresentata dall'utilizzo del cicloesano al posto dell'n-esano. In base ai dati relativi al metodo utilizzato in fase di ottimizzazione, il quale presentava dei recuperi estremamente bassi per gli IPA ad alto peso molecolare, si può affermare che molto probabilmente il metodo utilizzato in tale lavoro per la determinazione degli IPA presenta dei recuperi estremamente bassi degli IPA più pesanti, e quindi che tali analiti non sono stati individuati e quantificati nei biochar considerati.

In letteratura è presente un studio (M.B. Fernandes et al., 2003) in cui è stata effettuata la determinazione degli IPA in charcoal prodotto da legna e da paglia, in char prodotti da incendi e in fuliggine da camino. In tale studio, la procedura analitica utilizzata per determinare gli IPA prevede, dopo l'aggiunta di due IPA

deuterati in ogni campione, un'estrazione mediante bagno ad ultrasuoni (40 kHz) per 1 ora con 70 mL di n-esano. Gli estratti vengono filtrati e successivamente concentrati al Rotavapor. Il clean up è effettuato mediante una cartuccia SPE con silice. In particolare, una volta caricato in testa alla cartuccia l'estratto da purificare, l'eluizione per separare gli idrocarburi alifatici da quelli aromatici è effettuata con n-esano, n-esano/toluene (1:3, v:v), etil acetato e metanolo. L'eluato contenente gli IPA è portato a piccolo volume sotto leggero flusso d'azoto. L'analisi è quindi effettuata in un sistema GC/MS operante in SIM. I recuperi ottenuti mediante tale procedura sono del 70% con valori di RSD che variano dal 5% al 30%. Gli IPA determinati includono solo quelli a peso molecolare superiore a 178 u di cui viene riportata la concentrazione totale ma non le singole concentrazioni degli IPA. Le concentrazioni totali di IPA ottenute sono: 0,07 µg/g per il charcoal da legna, 0,12 µg/g per il charcoal da paglia, 8,14 µg/g per la fuliggine da camino e < 0,01 per il char da incendi.

Operando un confronto tra le concentrazioni di IPA riportate nel suddetto lavoro e quelle determinate nell'ambito di questa tesi nei biochar presi in esame, è possibile osservare che le concentrazioni riportate nel presente lavoro per quanto riguarda i char da legna e da paglia e il char da incendi sono inferiori a quelle determinate per i biochar, mentre per quanto riguarda la fuliggine da camino la concentrazione riportata è superiore. La procedura utilizzata nello studio di cui sopra per determinare gli IPA nelle matrici suddette, pur richiedendo un tempo di estrazione notevolmente inferiore a quello del metodo ottimizzato per il biochar nel presente lavoro, viene effettuata con un solvente più tossico. Dal punto di vista dei recuperi, invece, i due metodi sono confrontabili, mentre gli RSD sono inferiori nel metodo già presente in letteratura.

Una procedura analitica simile a quella ottimizzata in questa tesi è riportata in letteratura per la determinazione degli IPA nel suolo (T. D. Bucheli et al., 2004). In particolare, in tale metodologia, dopo aver pretrattato i campioni di suolo e aggiunti 20 µl di IPA deuterati 20 ppm, gli IPA vengono estratti mediante Soxhlet per 36 ore con n-esano. Il solvente viene quindi eliminato al Rotavapor fino a raggiungere un volume finale di 6-8 mL, e la soluzione ottenuta viene poi purificata mediante passaggio su colonna cromatografica. Dopo che la colonna è pulita con 25 mL di n-esano, l'eluizione è effettuata con 80 mL di n-esano. L'eluato ottenuto è concentrato

sotto leggero flusso d'azoto. Dopo l'aggiunta dello standard interno, l'analisi è effettuata in un sistema GC-MS. I recuperi di tale procedura variano dal 32% al 96% mentre il LOQ tra 0,1 e 0,2 µg/Kg.

Confrontando tale procedura con quella sviluppata nel presente lavoro, si nota in primo luogo che in entrambe l'estrazione degli IPA viene effettuata mediante Soxhlet per 36 ore. I due metodi quindi presentano delle estrazioni molto lunghe, che comportano costi in termini di tempo e di energia consumata. Nel caso della metodologia per la determinazione degli IPA nei suoli, tuttavia, il solvente utilizzato è l'n-esano, che è più tossico sia dell'acetone che del cicloesano. È opportuno comunque specificare che nello studio appena citato non viene riportata la quantità di solvente utilizzata per l'estrazione. Dal punto di vista dei recuperi e del LOQ, invece, i due metodi sono confrontabili, mentre non vengono fornite informazioni sull'esattezza, precisione e robustezza del metodo.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

Nel corso del presente lavoro è stato sviluppato e ottimizzato un nuovo metodo analitico per la determinazione degli IPA nel biochar con una dettagliata valutazione delle principali figure di merito.

Durante la fase di ottimizzazione si è potuto constatare che la determinazione di composti in traccia come gli IPA, in una matrice complessa come il biochar, è particolarmente difficile e richiede l'attuazione di misure specifiche durante l'intera procedura analitica, dalle fasi pre-analitiche di conservazione e trattamento a quelle più direttamente strumentali di quantificazione finale, ciò al fine di ridurre gli errori (contaminazioni, perdite) dell'informazione analitica.

Per poter sviluppare il metodo è stata condotta un'approfondita ricerca bibliografica sui metodi finora utilizzati per la determinazione degli IPA da matrici complesse simili al biochar quali carbone, char e fuliggine. Da tale ricerca si è visto che sono pochi i metodi validati per tali matrici – in alcuni studi vengono applicati metodi validati per altre matrici (R.A. Brown et al., 2006) – e molto spesso non sono descritti in maniera dettagliata. Inoltre, tali metodi spesso utilizzano solventi tossici, purificazioni su colonna cromatografica che richiedono una notevole quantità di solvente, e non sempre sono accompagnati da recuperi soddisfacenti.

Tali metodi, inoltre, seppur efficaci per l'estrazione degli IPA da matrici quali il sedimento o il carbone, non sono risultati idonei all'obiettivo che ci si era prefissati. La matrice biochar è pertanto risultata molto diversa da quelle citate e per le quali è già presente in letteratura un metodo per la determinazione degli IPA.

Il metodo sviluppato in questa tesi, oltre ad avere un buon grado di greenness, essendo i solventi utilizzati non molto tossici, presenta:

- recuperi dal 90 al 80% per l'acenaftene-d10 e per il fenantrene-d10, e un buon recupero del 70% per il crisene-d12;

- precisione con degli RSD su 5 repliche in tempi diversi intorno al 15-20% per gli IPA a basso peso molecolare e tra il 25-35% per gli IPA ad alto peso molecolare;
- una buona robustezza. In particolare, si è constatato che, variando la quantità di campione analizzato da 3 a 0,5 g, la quantità di standard interno aggiunto da 200 µL a 100 µL 5 ppm, la quantità di solvente utilizzato da 500 mL a 100 mL, non si hanno differenze rilevanti nel recupero degli IPA deuterati e nelle concentrazioni di IPA nelle varie repliche effettuate sullo stesso campione;
- una discreta risposta rispetto alla concentrazione analitica con coefficienti di correlazione compresi tra 0,9931 e 0,9999;
- dei limiti di rivelabilità che variano tra 0,01 e 0,4 ng/g in relazione all'IPA analizzato.

Nella seconda parte della tesi la procedura analitica ottimizzata è stata applicata a un campione rappresentativo dei biochar attualmente disponibili sul mercato, prodotti da varie biomasse con differenti temperature di pirolisi e tempo di residenza. Mediante tale applicazione si è potuta constatare la robustezza del metodo il quale ha presentato quasi per tutti i biochar degli ottimi recuperi degli IPA deuterati e dei buoni RSD. In particolare si sono avuti dei recuperi variabili tra il 60% e il 100% e degli RSD mediamente del 30-60%. Per quanto riguarda gli RSD si sono avute però anche punte del 140% per alcuni IPA ad alto peso molecolare, determinate molto probabilmente dalla concentrazione prossima al LOD di tali IPA.

Mediante l'applicazione del metodo sviluppato in questa tesi si è potuto quindi effettuare per la prima volta uno studio sulla concentrazione degli IPA in biochar di diversa origine.

Confrontando tutti i dati ottenuti sulle concentrazioni di IPA nei biochar presi in esame, si vede come tra un biochar e l'altro ci possono essere delle differenze di concentrazione significative: si passa ad esempio da una concentrazione totale di tutti gli IPA di 8,82 µg/g a una concentrazione di 0,7 µg/g.

Dai dati sulle concentrazioni di IPA nei biochar si nota come tali analiti sono presenti in tutti i biochar presi in considerazione in questa tesi, anche in quelli prodotti a temperature basse (350°C). Mettendo a confronto le caratteristiche dei biochar con le concentrazioni totali di IPA non si sono trovate marcate relazioni tra tali caratteristiche e le concentrazioni totali.

Considerando la concentrazione di benzo[*a*]pirene, che è l'IPA più tossico e dichiarato cancerogeno per l'uomo dallo IARC, determinata nei vari biochar analizzati, si nota come vi siano dei biochar che hanno una concentrazione di tale IPA notevolmente superiori rispetto ad altri. In particolare si è determinata una concentrazione del benzo[*a*]pirene variabile tra 0,39 µg/g e il LOD.

In questa tesi si è voluto, inoltre, determinare il valore di tossicità equivalente (TEQ) dei vari biochar ottenuto moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun IPA per il TEF corrispondente. Dai risultati ottenuti si vede come tale valore varia da 0,64 a 0,03 µg/g, dimostrando quindi che determinati biochar presentano livelli di tossicità equivalente molto diverse.

La metodologia analitica è stata anche applicata a char prodotti dalla pirolisi di biomassa erbacea (*Panicum virgatum*) a diverse condizioni di pirolisi. Dai risultati si nota che esistono delle differenze nelle concentrazioni dei vari IPA tra le condizioni più drastiche (650°C per 20 minuti) e quelle più blande (450°C per 5 minuti). In particolare le condizioni più drastiche danno char con concentrazioni di IPA più alte.

Infine si è determinata la concentrazione degli IPA in char ottenuti dalla pirolisi di biomassa algale: *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*. Dai risultati ottenuti si è potuto constatare che le concentrazioni dei vari IPA sono inferiori rispetto a tutti i biochar e char studiati in questa tesi e ottenuti dalla pirolisi di biomasse lignocellulosiche. In particolare, è interessante notare come le concentrazioni degli IPA ad alto peso molecolare nei char ottenuti da *Botryococcus* e *Scenedesmus* (0,02-0,04 µg/g) siano notevolmente inferiori a quelle rilevate negli altri biochar e char considerati in questo lavoro. Bisogna però sottolineare che tali char sono caratterizzati da un alto contenuto in ceneri.

Sulla base dei risultati ottenuti si ritiene opportuno sottolineare il fatto che per alcuni biochar il problema della presenza di IPA potrebbe essere tutt'altro che

trascurabile. Pertanto, si può sostenere che effettuare la determinazione di tali analiti in tutti i biochar, prima di utilizzarli per fini agronomici o ambientali, dovrebbe essere un aspetto da valutare. Inoltre, essendo stato verificato che la concentrazione degli IPA dipende sia dalle caratteristiche della biomassa e del sistema pirolitico sia dalla temperatura e dal tempo di residenza, si può affermare che, se nella produzione di biochar commerciali viene variato anche uno solo di questi parametri, ciò può comportare delle variazioni significative nella concentrazione degli IPA.

Nell'ultima parte di questa tesi si sono effettuate delle prove per verificare l'efficienza del metodo ottimizzato nella determinazione degli IPA in suoli ammendati con biochar. Sulla base dei risultati ottenuti, anche se sono necessarie ulteriori verifiche, si evince che il metodo è adatto per consentire l'utilizzo dello stesso per la determinazione degli IPA in suoli ammendati con biochar. In particolare, si sono ottenuti dei recuperi dell'86% per l'acenaftene-d₁₀, del 91% per il fenantrene-d₁₀ e del 96% per il crisene-d₁₂, mentre i valori degli RSD variano dal 27% all'1%. Tali risultati, anche se ottenuti su due sole repliche, dimostrano le potenzialità del metodo analitico per la determinazione degli IPA in suoli trattati con biochar.

BIBLIOGRAFIA

- Andelman J.B., Suess M.J., Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment. *Bull World Health Organ*, 43 (1970) 479.
- Antal M. J., Grønli M., The art, science and technology of charcoal production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42 (2003) 1619-1640.
- Blackwell P., Shea S., Storer P., Solaiman Z., Kerkmans M., Stanley I., Improving wheat production with deep banded oil mallee charcoal in Western Australia. In “The First Asia-Pacific Biochar Conference” Terrigal, Australia (2007).
- Brown R.A., Kercher A.K., Nguyen T.H., Nagle C.D., Ball W.P., Production and characterization of synthetic wood chars for use as surrogates for natural sorbents. *Organic Geochemistry*, 37 (2006) 321–333.
- Bucheli T. D., Blum F., Desaulles A, Gustafsson O., Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere*, 56 (2004) 1061–1076.
- Chan K. Y., Van Zwieten L., Meszaros I., Downie A., Joseph S., Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. *Aus. J. Soil Res.*, 45 (2007) 629–634.
- Demirbas A., 2004. Effects of temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 72 (2004) 243-248.
- Fabbri D., Torri C., Mancini I., Pyrolysis of cellulose catalysed by nanopowder metal oxides: production and characterisation of a chiral hydroxylactone and its role as building block. *Green Chem.*, 9 (2007) 1374.

- Fabbri D., Torri C., Spokas K., inviato per la pubblicazione *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*.
- Fellet G., Marchiol L., Delle Vedove G., Peressotti A., Application of biochar on mine tailings: Effects and perspectives for land reclamation. *Chemosphere*, 83 (2011) 1262–1267.
- Fernandes M.B., Brooks P., Characterization of carbonaceous combustion residues: II. Nonpolar organic compounds. *Chemosphere*. 53 (2003) 447–458.
- Flotron V., Houessou J., Bosio A., Delteil C., Bermond A., Camel V.J., Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using microwave-assisted solvent extraction Comparison with other extraction methods. *Journal of Chromatography, A* 999 (2003) 175–184.
- Garcia-Perez M., The formation of polyaromatic hydrocarbons and dioxins during pyrolysis. Washington State University (2008).
- Gewend P.M., Hites R.A., Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the northeastern United States, *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 45 (1981) 2359–2367.
- Gupta A. K, Lilley D. G., Thermal destruction of wastes and plastics. *Plastics and the Environment*, (2003) 629-696.
- Hartman J., Hemicellulose as Barrier Material, Licentiate thesis, Royal Institute of Technology, Stockholm, (2006).
- Jonker M.T.O., Koelmans A., Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soot and Sediment: Solvent Evaluation and Implications for Sorption Mechanism. *Environmental Science & Technology*, 36 (2002).

- Kammen D.M., Lew D.J., Review of Technologies for the Production and Use of Charcoal. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, USA (2005).
- Knicker H., Almendros G., Gonzruez-Vila F. L Martin F., Llidemann H. D., Spectroscopic examination of the transformation of organic nitrogen in plant biomass during thermal treatment, *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (1996) 1053-1060.
- Larsen J.C., Larsen P.B., Air Pollution and Health. Chemical carcinogens, (1998) 33–56.
- Ledesma E.B., Marsh N.D., Sandrowitz A.K., Wornat, M.J., Global kinetic rate parameters for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of catechol, a model compound representative of solid fuel moieties. *Energy and Fuels*, 16 (2002) 1331-1336.
- Lehmann J., da Silva Jr J.P., Steiner C., Nehls T., Zech W., Glaser, B., Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant & Soil*, 249 (2003) 343-357.
- Lehmann J., Gaunt J., Rondon M., Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems – a review. *Mitigat. Adaptat. Strateg. Global Change*, 11 (2006) 403–427.
- Lehmann J., A handful of carbon. *Nature*, 447 (2007a) 143-144.
- Lehmann J., Joseph S., Biochar for environmental management: science and technology. In: Earthscan, London (2009).
- Li D., Hockaday W.C., Masiello C.A., Alvarez P.J.J., Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting. *Soil Biology & Biochemistry*, 43 (2011) 1732-1737.

- Mohan D., Pitonan R. C. U., Steele P H., Pyrolysis of wood biomass for bio-oil: A critical review. *Energy and Fuels*, 20 (2006) 848-889.
- Ohkouchi N., Kawamura K., Kawahata H., Distributions of three and seven rings Polynuclear Aromatic Hydrocarbons on Deep Sea Floor in Central Pacific. *Environmental Science Technology*, 33 (1999) 3086-3090.
- Okimori Y., Ogawa M., Takahashi F., Potential of CO₂ emission reductions by carbonizing biomass waste from industrial tree plantation in south Sumatra, Indonesia. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 8 (2003) 261-280.
- Paris O., Zollfrank C., Zickler G. A., Decomposition and carbonisation of wood biopolymers - a microstructural study of softwood pyrolysis. *Carbon*, 43 (2005) 53-66.
- Poster D.L., Benner Jr. B.A., Schantz M.M., Sander L.C., Wise S.A., Vangel M.G., Determination of methylsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulate-related standard reference materials. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 23 (2003a) 113–139.
- Poster, D.L., Lopez de Alda, M.J., Sanchez, M.M., Sander, L.C., Wise, S.A., Vangel, M.G., Development and analysis of three diesel particulate-related standard reference materials for the determination of chemical, physical, and biological characteristics. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 23 (2003b) 141–191.
- Rondon M. A., Lehmann J., Ramirez J., Hurtado M., Biological nitrose fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. *Biol. Fert. Soils*, 43 (2007) 699–708.
- Rutherford D. W., Wershaw R. L., Cox L. G., Changes in Composition and Porosity Occurring during the Thermal Degradation of Wood and Wood Components. *Scientific Investigation Report*, (2004).

- Schmidt M.W.I. and Noack, A.G., Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogeochemical Cycles*, 14 (2000) 777- 793.
- Simoneit B.R.T., Biomarker PAHs in the Environment. PAHs and Related Compounds. *The handbook of environmental chemistry*, 3-1 (1998) 175 – 222.
- Skodras G., Grammelis P., Basinas P. , Kakaras E., Sakellaropoulos G., Pyrolysis and combustion characteristics of biomass and waste-derived feedstock. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45 (2006) 3791-3799.
- Soclo H.H., Garrigues P., Edwald M., Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Costal Marine Sediments-Case Studies in Cotomou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Marine Pollution Bulletin*, 40 (2000), 387-396.
- Strevos V., Panerson M., Zymly V., Fisher K., Evans T., Nelson P. F., Fundamental aspects of biomass carbonization. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 79 (2007) 91-100.
- Tenaglia M., Venturini E., Raffaelli R., Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura – Accreditemento e certificazione, 2002.
- Tomaszewski J.E., Werner D., Luthy R.G., Activated carbon amendment as treatment for residual DDT in sediment from a superfund site in San Francisco Bay, Richmond, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (2007) 2143–2150.
- Torri C., Adamiano A., Fabbri D., Lindfors C., Mont, A., Oasmaa A., Comparative analysis of pyrolysate from herbaceous and woody energy crops

by Py-GC with atomic emission and mass spectrometric detection. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 88 (2010) 175–180.

- Williams P. T., Besler S., The influence of temperature and heating rate on the slow pyrolysis of biomass. *Renewable Energy*, 7 (1996) 233-250.
- Yamato M., Okimori Y., Wibowo I. F., Anshori S., Ogawa M., (2006). Effects of the application of charred bark of *Acacia mangium* on the yield of maize, cowpea and peanut, and soil chemical properties in South Sumatra, Indonesia. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52 (2006) 489–495.