

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

*Dottorato di Ricerca in
Valorizzazione e Gestione delle Risorse Agro-forestali
(indirizzo Bonifica e Difesa del Suolo)*

**Caratterizzazione molecolare
di sostanze umiche da suolo vulcanico**

Docente guida
Chiar.mo Prof.
Alessandro Piccolo

Candidata
Dr. Gabriella Fiorentino

Coordinatore
Chiar.mo Prof.
Antonio Cioffi

Anni Accademici 2002/2005

*A tutti coloro che mi hanno
sostenuto in questo cammino.*

Un grazie di cuore.

INDICE

CAPITOLO 1: LE SOSTANZE UMICHE	pg. 1
1.1 La sostanza organica naturale	pg. 1
1.2 Caratteristiche chimiche delle sostanze umiche	pg. 5
1.3 Origine delle sostanze umiche	pg. 6
1.4 Caratteristiche conformazionali e strutturali delle sostanze umiche	pg. 8
1.5 Caratterizzazione molecolare delle sostanze umiche	pg. 12
CAPITOLO 2: OBIETTIVO E DESCRIZIONE DELLA TESI	pg. 17
CAPITOLO 3: PARTE SPERIMENTALE	pg. 21
3.1 I suoli	pg. 21
3.2 Procedura di estrazione e purificazione delle sostanze umiche	pg. 22
3.3 Contenuto in ceneri e composizione elementare delle sostanze umiche	pg. 24
3.4 Procedura di frazionamento	pg. 24
<u>3.4.1 Estrazione dei lipidi liberi</u>	pg. 25
<u>3.4.2 Transesterificazione con trifluoruro di boro</u>	pg. 25
3.4.2.1 Estrazione liquido-liquido	pg. 26
3.4.2.2 Vantaggi dell'estrazione in fase solida (SPE)	pg. 27
3.4.2.3 Estrazione su fase solida (SPE)	pg. 29
3.4.3 Idrolisi alcalina	pg. 30
<u>3.4.4 Trattamento con acido iodidrico</u>	pg. 31
<u>3.4.5 Trattamento del residuo finale</u>	pg. 32
3.4.5.1 Estrazione liquido-liquido	pg. 33
3.4.5.2 Estrazione su fase solida (SPE)	pg. 33
3.4.5.3 Metilazione del residuo	pg. 34
3.4.5.4 Metodo DFRC	pg. 36
3.5 Tecniche di spettrometria di massa	pg. 37
<u>3.5.1 Analisi GC/MS</u>	pg. 37
3.5.1.1 Derivatizzazione dei campioni	pg. 38
3.5.1.2 Analisi quantitativa	pg. 39
3.5.2 Pirolisi-GC/MS	pg. 40

<u>3.5.3 Analisi ESI/MS</u>	pg. 41
3.5.3.1 <i>Infusione diretta</i>	pg. 41
3.5.3.2 <i>Cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione (HPSEC) analitica on-line con ESI/MS</i>	pg. 42
3.6 Tecniche spettroscopiche	pg. 42
<u>3.6.1 Analisi DRIFT</u>	pg. 42
<u>3.6.2 Analisi CPMAS-¹³C-NMR</u>	pg. 43
3.7 Modellistica molecolare	pg. 43
Appendice 1	pg. 44
Capitolo 4: RISULTATI	pg. 50
4.1 Analisi GC/MS	pg. 50
<u>4.1.1 Frazione dei lipidi liberi</u>	pg. 51
4.1.1.1 <i>Lipidi liberi nel campione HA Vico</i>	pg. 51
4.1.1.2 <i>Lipidi liberi nel campione HUM 1 Vico</i>	pg. 53
4.1.1.3 <i>Lipidi liberi nel campione HUM 2 Vico</i>	pg. 55
<u>4.1.2 Frazione dopo transesterificazione</u>	pg. 58
4.1.2.1 <i>Transesterificato nel campione HA Vico</i>	pg. 58
4.1.2.2 <i>Transesterificato nel campione HUM 1 Vico</i>	pg. 61
4.1.2.3 <i>Transesterificato nel campione HUM 2 Vico</i>	pg. 64
4.1.3 <i>Frazione dopo idrolisi alcalina</i>	pg. 66
4.1.3.1 <i>Idrolizzato nel campione HA Vico</i>	pg. 66
4.1.3.2 <i>Idrolizzato nel campione HUM 1 Vico</i>	pg. 68
4.1.3.3 <i>Idro lizzato nel campione HUM 2 Vico</i>	pg. 70
<u>4.1.4 Frazionamento del campione FA Vico</u>	pg. 72
<u>4.1.5 Frazione dopo acido iodidrico</u>	pg. 73
<u>4.1.6 Frazioni derivanti dal trattamento del residuo finale</u>	pg. 74
<u>4.1.7 Efficienza complessiva della procedura di frazionamento</u>	pg. 74
4.2 Pirolisi-GC/MS	pg. 76
4.3 Analisi ESI/MS	pg. 78
<u>4.3.1 Spettri di massa ESI per infusione diretta</u>	pg. 78
4.3.2 <i>Spettri di massa ESI con HPSEC analitica on-line</i>	pg. 82

4.4 Analisi DRIFT	pg. 83
4.5 Analisi CPMAS-¹³C-NMR	pg. 87
Appendice 2	pg. 91
Capitolo 5: DISCUSSIONE	pg. 144
5.1 Analisi GC/MS	pg. 144
<u>5.1.1 Frazione dei lipidi liberi</u>	pg. 147
5.1.1.1 Lipidi liberi nel campione HA Vico	pg. 147
5.1.1.2 Lipidiliberi nel campione HUM 1 Vico	pg. 149
5.1.1.3 Lipidi liberi nel campione HUM 2 Vico	pg. 151
<u>5.1.2 Frazione dopo transesterificazione</u>	pg. 152
5.1.2.1 Transesterificato nel campione HA Vico	pg. 152
5.1.2.2 Transesterificato nel campione HUM 1 Vico	pg. 154
5.1.2.3 Transesterificato nel campione HUM 2 Vico	pg. 155
<u>5.1.3 Frazione dopo idrolisi alcalina</u>	pg. 156
5.1.3.1 Idrolizzato nel campione HA Vico	pg. 156
5.1.3.2 Idrolizzato nel campione HUM 1 Vico	pg. 157
5.1.3.3 Idrolizzato nel campione HUM 2 Vico	pg. 159
<u>5.1.4 Frazione dopo acido iodidrico</u>	pg. 159
<u>5.1.5 Frazioni derivanti dal trattamento del residuo finale</u>	pg. 161
5.1.6 Efficienza complessiva della procedura di frazionamento	pg. 161
5.2 Pirolisi-GC/MS	pg. 165
5.3 Analisi ESI/MS	pg. 169
<u>5.3.1 Spettri di massa ESI per infusione diretta</u>	pg. 169
<u>5.3.2 Spettri di massa ESI con HPSEC analitica on-line</u>	pg. 172
5.4 Analisi DRIFT	pg. 174
5.5 Analisi CPMAS-¹³C-NMR	pg. 176
Capitolo 6: MODELLISTICA MOLECOLARE	pg. 180
Appendice 3	pg. 186
Capitolo 7: CONCLUSIONI	pg. 191
BIBLIOGRAFIA	pg. 196

CAPITOLO 1

LE SOSTANZE UMICHE

1.1 La sostanza organica naturale

La sostanza organica naturale è una delle componenti fondamentali di tutti gli ecosistemi sia naturali sia agricoli e viene studiata da più di duecento anni, dal momento che è proprio dall'ammontare di sostanza organica in un suolo che ne dipendono proprietà quali la capacità tamponante, la capacità di ritenzione idrica, la capacità di legare i metalli, la stabilità degli aggregati delle particelle di suolo e l'assorbimento di composti organici idrofobici. Tutte queste proprietà, escludendo l'ultima, controllano la fertilità dei suoli, di fondamentale importanza per la sopravvivenza del genere umano. La presenza di sostanza organica nei suoli, però, non è solo un fattore determinante per la fertilità, ma serve anche come serbatoio di carbonio della biosfera, in grado di "sequestrare" l'anidride carbonica e ridurre la quantità che viene immessa nell'atmosfera.

In termini generali, la sostanza organica naturale comprende l'insieme delle sostanze organiche presenti nei suoli, nei sedimenti e nelle acque. Nell'ambito specifico dello studio della chimica organica dei suoli, quando si parla di sostanza organica del suolo (SOM), di humus o di sostanza umica si fa sempre riferimento ad un'enorme quantità di molecole di natura ed origine diversa, indicando però in maniera più specifica la componente non vivente che deriva dall'attività microbica e dalle

trasformazioni chimiche cui sono soggette tutte quelle sostanze, contenenti carbonio, depositate sul suolo (Hayes & Swift, 1978).

L'evoluzione della sostanza organica del suolo dipende dall'insieme dei processi cui i residui biologici sono sottoposti, quali la mineralizzazione, l'umificazione e l'interazione con la frazione minerale. La mineralizzazione della sostanza organica, favorita in ambienti ben aerati e con un'intensa attività biologica, porta alla decomposizione del materiale organico ad anidride carbonica ed acqua e si verifica in presenza di microrganismi eterotrofi che necessitano di energia e di fonti di azoto per lo svolgimento delle proprie funzioni e la sintesi dei propri composti. L'umificazione, d'altro canto, prevede una serie complessa di reazioni che portano alla formazione di macromolecole con una struttura sempre più lontana da quella d'origine, man mano che l'umificazione procede. Inoltre, la velocità di degradazione, oltre ad essere influenzata dalla resistenza intrinseca delle molecole, dipende anche dalla loro interazione con la frazione minerale: si possono formare, infatti, dei complessi molto stabili che aumentano il generale stato di aggregazione e la stabilità del suolo e rallentano i processi di degradazione microbica della sostanza organica, in quanto l'interazione con le argille o l'intrappolamento nei micropori degli aggregati del suolo possono esercitare una vera e propria protezione fisica contro l'attacco microbico.

L'accumulo o la diminuzione di sostanza organica nel suolo dipende anche dalla quantità e qualità dei residui biologici che arrivano al suolo, dal tipo di microflora presente e da un insieme di altri fattori, quali le condizioni climatiche, le proprietà del suolo, l'uso del suolo e così via.

Quindi, la complessità della SOM deriva da un lato dalla diversità delle classi dei composti di origine organica presenti nel suolo e dalla loro diversa composizione,

dall'altro dalla variabilità dei processi di trasformazione che prendono atto nel suolo (Saiz-Jimenez, 1996). Ne risulta un insieme di interrelazioni estremamente diversificato. Tuttavia, è proprio la complessità della SOM che ne determina l'importanza dell'azione esercitata e, di conseguenza, la costante attualità nel campo della ricerca scientifica: le strade seguite dall'attività di studio di questa complessa rete di interrelazioni comprendono sia lo studio della dinamica della sostanza organica nel suolo (Zech & Guggenberger, 1996) sia la caratterizzazione e la definizione del ruolo dei diversi composti che ne entrano a far parte e ne determinano il tipo di interazione con le componenti inorganiche del suolo e con l'ecosistema in generale (Piccolo, 1996). Pur giungendo all'identificazione di diverse serie di composti che rientrano nelle classi di sostanze tipiche della chimica organica (lipidi, carboidrati, proteine etc), l'attribuzione del ruolo e dell'attività specifica (Stevenson, 1994), svolti da tali composti nell'ambito della chimica del suolo, resta piuttosto complessa, a causa della variabilità e peculiarità legate all'origine e ai processi di formazione e delle diverse interazioni con i fattori climatici e con la componente inorganica del suolo.

L'analisi del comportamento della sostanza organica nel suolo ha portato all'identificazione della SOM non più come insieme unico ma risultante di diversi compartimenti tra loro collegati. Sulla base della diversa stabilità biochimica, la SOM si distingue in gruppi eterogenei di sostanze, identificate attraverso i loro tempi di permanenza e residenza nel suolo, che vanno dai residui organici indecomposti che giungono al terreno, ai prodotti semplici della decomposizione, che costituiscono la frazione labile della SOM, alla parte attiva, temporalmente intermedia, che è il substrato dell'attività biologica del suolo, fino agli accumuli più complessi di sostanze

recalcitranti, che ne costituiscono la frazione stabile, ossia il nucleo principale di accumulo del carbonio organico nel suolo (Andreux, 1996).

Dal punto di vista chimico, la frazione labile della SOM è costituita da biopolimeri cellulari come carboidrati, amminoacidi, peptidi, amminozuccheri, lipidi e da strutture più difficilmente metabolizzabili come cere, grassi, resine, lignine ed emicellulose (Piccolo, 1996). Tali biopolimeri, derivanti dalla degradazione chimica e biochimica dei residui degli organismi vegetali e animali che pervengono al suolo in seguito a morte o a senescenza e dalla re-sintesi operata dalla flora microbica (Cheshire & Hayes, 1990), costituiscono la lettiera o l'orizzonte più superficiale nei suoli indisturbati: le sostanze più semplici quali amminoacidi, zuccheri, acidi organici mono e di-carbossilici, avendo alta solubilità nella soluzione del suolo, sono prontamente disponibili come fonte energetica per la flora microbica e per questo hanno un tempo di residenza nel suolo molto breve. Sostanze a più alto peso molecolare, quali proteine, acidi nucleici e polisaccaridi, vengono idrolizzate dai microrganismi a composti semplici e successivamente utilizzati come fonte di energia, mentre cere, grassi, resine e lignine sono difficilmente attaccabili dai microrganismi e pertanto persistono nel suolo per periodi più lunghi. In particolare, i carboidrati del suolo sono qualitativamente e quantitativamente la componente più importante della frazione labile (Cambardella & Elliot, 1992). Essi costituiscono fino al 25% della sostanza organica totale (Stevenson, 1994) e sono considerati un'importante fonte di energia per il mantenimento e lo sviluppo dell'attività pedo-microbiologica (Insam, 1996).

Le frazioni umificate rappresentano, invece, la componente più stabile e recalcitrante della sostanza organica, di cui arrivano a costituire fino al 65%, con un tempo di residenza medio che varia nei diversi ecosistemi da alcune decine a diverse

centinaia d'anni. Queste frazioni sono strettamente correlate con le parti labili della sostanza organica, essendo direttamente coinvolte nei processi di accumulo, dinamica e stabilizzazione della sostanza organica stessa (Piccolo, 1996). L'humus assume così un ruolo centrale nel ciclo biogeochimico del carbonio organico, mediando le varie fasi che vanno dall'incorporazione del carbonio organico che perviene al terreno alle trasformazioni biochimiche che mediano il ritorno del carbonio sotto forma di anidride carbonica nell'atmosfera (Schlesinger, 1997).

1.2 Caratteristiche chimiche delle sostanze umiche

Le sostanze umiche sono tipicamente costituite da tre componenti distinte in base alle differenti caratteristiche di solubilità in alcali o acidi: gli acidi fulvici (FA) sono quella frazione che si solubilizza sia in soluzioni alcaline sia in soluzioni acide, gli acidi umici (HA) sono la frazione che si solubilizza in soluzione alcalina ma che precipita in soluzioni acide ($\text{pH} < 3$) e l'umina (HUM), infine, è la frazione insolubile in qualsiasi condizione di pH (Stevenson, 1994). Sebbene alla base di queste variazioni nella solubilità ci siano differenze chimiche e fisiche, la separazione delle tre frazioni è solo operativa e non indica, per esempio, l'esistenza di tre tipi distinti di molecole organiche (Hayes *et al.*, 1989).

Per quanto riguarda le caratteristiche chimiche, secondo quanto riportato in letteratura, gli acidi umici e l'umina hanno dimensioni molecolari apparenti superiori a quelle degli acidi fulvici ed un minore contenuto in ossigeno, normalmente associato ad un più alto contenuto in carbonio. È stato calcolato che il rapporto ossigeno/carbonio (O/C) negli acidi umici è mediamente 0.50, mentre è 0.70 negli acidi fulvici. Tale differenza è espressione di un più alto contenuto di gruppi carbossilici negli acidi fulvici

rispetto agli acidi umici ed all'umina. Essa conferisce a queste componenti dell'humus una differente acidità totale, derivante dalla presenza di gruppi carbossilici ed alcolici, cosicché l'acidità per gli acidi fulvici varia mediamente tra 640 e 1420 mol/kg di sostanza organica, mentre per gli acidi umici è compresa mediamente tra 560 e 890 mol/kg di sostanza organica (Stevenson, 1994).

Il rapporto idrogeno/carbonio (H/C) riflette il grado di insaturazione di acidi umici, fulvici ed umina e risulta essere approssimativamente 1.0 per gli acidi umici e fulvici e 1.5 per l'umina. Tutto ciò si riflette nella solubilità degli acidi fulvici in acqua, a tutti i valori di pH, mentre gli acidi umici diventano insolubili quando i gruppi carbossilati vengono protonati a bassi valori di pH.

1.3 Origine delle sostanze umiche

L'origine delle sostanze umiche viene attribuita alla degradazione chimica e biologica dei residui provenienti dai tessuti vegetali ed animali ed all'attività di sintesi dei microrganismi. I prodotti che si formano in tali processi tendono, poi, ad associarsi in strutture organiche complesse, più stabili dei materiali di partenza e, di conseguenza, in grado di resistere a lungo nel suolo.

I primi tentativi di sviluppare teorie generali circa la formazione delle sostanze umiche, argomento tuttora centrale nell'attività di ricerca, sono rappresentati dalle cosiddette ipotesi della lignina e dei polifenoli (Flaig, 1966; Flaig, 1988; Haider *et al.*, 1975). Tali ipotesi si basano sulla degradazione differenziale subita dalle sostanze che compongono i tessuti dei residui vegetali e sui successivi processi di risintesi mediati dalla flora microbica, che porterebbero alla formazione di polimeri umici. Le polimerizzazioni si svilupperebbero a partire dalle sostanze ritenute più stabili, quali la

lignina, i prodotti da essa derivati ed i polifenoli sintetizzati dai microrganismi, con successive reazioni di ossidazione e condensazione, favorite dalla presenza di composti azotati, quali le proteine derivanti dalle sintesi microbiche stesse.

Tuttavia, tali ipotesi oggi possono ritenersi superate, dal momento che recenti investigazioni sulla SOM, basate sull'utilizzo di tecniche avanzate come la pirolisi accoppiata alla spettrometria di massa e la spettroscopia NMR (Saiz-Jimenez, 1994; Piccolo & Conte, 1998), hanno evidenziato l'importanza del contributo dei costituenti alifatici ed in particolare dell'esterificazione come modalità di legame per i biopolimeri organici durante il processo di umificazione (Grasset & Amblès, 1998). Le sostanze di natura alifatica provengono sia dai prodotti di degradazione dei residui vegetali sia dal metabolismo e dalla sintesi microbica. Nei suoli si possono distinguere diverse fonti di composti alifatici, come i lipidi liberi, i biopolimeri difficilmente idrolizzabili, quali cutani e suberani, ed i biopolimeri, quali cutine e suberine, che coprono rispettivamente le parti aeree e quelle sotterranee delle piante. Questi ultimi, in particolare, sono correlati alle più importanti proprietà derivanti dalla presenza di legami esterei nella sostanza organica del suolo (Almendros & Sanz, 1991; Naafs & van Bergen, 2002; Nierop, 1998; Nierop *et al.*, 2003; Naafs *et al.*, 2005). Le fasi iniziali della formazione delle sostanze umiche hanno luogo tramite processi di incorporazione dei vari prodotti alchilici poco solvatati nella soluzione circolante del suolo sulle superfici solide del suolo e nelle frazioni stabili della SOM ed attraverso la loro ripartizione idrofobica nella sostanza organica preesistente, con un accumulo progressivo reso possibile da una preservazione selettiva di queste sostanze all'interno dei domini idrofobici della sostanza organica umificata, dove sono protette da ulteriori biodegradazioni (Jambu *et al.*, 1993; Lichtfouse *et al.*, 1995; Almendros *et al.*, 1996; Spaccini *et al.*, 2000).

Questi risultati evidenziano il coinvolgimento di interazioni idrofobiche multiple tra le molecole umiche ed i composti organici freschi selettivamente espulsi dalla soluzione del suolo come principale motivazione per la resistenza delle sostanze umiche alla biodegradazione ed il loro accumulo a lungo termine nei suoli (Lichtfouse *et al.*, 1998; Spaccini *et al.*, 2002).

1.4 Caratteristiche conformazionali e strutturali delle sostanze umiche

L'enorme eterogeneità chimica e la variabilità conformazionale delle sostanze umiche, insieme alla complessa varietà delle reazioni chimiche coinvolte nel loro accumulo e delle caratteristiche ambientali in cui si formano, ne hanno reso di difficile definizione la struttura chimica. Le tecniche di indagine chimico-fisica messe a punto negli ultimi venti anni hanno consentito di raccogliere una serie di informazioni riguardanti le proprietà conformazionali e, di conseguenza, le caratteristiche strutturali di tali sostanze. Un'attenta analisi dei processi attivi nella formazione e nella preservazione delle sostanze umiche nei suoli, alla luce degli ultimi risultati spettroscopici, microscopici e pirolitici ottenuti, mostra l'inconsistenza del tradizionale modello dei polimeri umici, in cui le molecole della SOM erano viste come polimeri con strutture chimiche distintive, diverse da quelle dei materiali di partenza, sintetizzate da reazioni di sintesi secondarie a partire dai prodotti di degradazione delle piante (Schnitzer, 1972; Gosh & Schnitzer, 1980).

Un insieme di tecniche analitiche indipendenti ha rivelato in maniera significativa la presenza nelle sostanze umiche di prodotti relativamente piccoli, indipendenti gli uni dagli altri, sostenendo il concetto che questi materiali organici sono costituiti da associazioni di diverse molecole a basso peso molecolare, tenute insieme da

legami ad idrogeno ed interazioni idrofobiche. Un corollario di questo modello è la struttura micellare, ossia la disposizione delle molecole organiche in soluzione acquosa in maniera tale da formare regioni idrofiliche esterne, all'interfaccia con le molecole d'acqua, che includono una fase organica costituita da regioni idrofobiche (von Wandruszka *et al.*, 1999). Questo nuovo concetto di sostanze umiche, emerso di recente, trova pieno sviluppo nella descrizione supramolecolare della natura della SOM, formulata da Piccolo (2002) ed ormai generalmente accettata (Wershaw, 2004; Sutton & Sposito, 2005). Piccolo e colleghi (1999) hanno dimostrato che le alte dimensioni molecolari delle sostanze umiche, ipotizzate da Gosh e Schnitzer (1980) e ritenute importanti nei modelli di Wershaw (1986) e di Engebtretson e von Wandruszka (1994), sono solo apparenti. In funzione del pH del mezzo e della presenza di acidi organici a numero crescente di atomi di carbonio o di gruppi carbossilici, è possibile ottenere, infatti, miscele di aggregati umici aventi dimensioni molecolari decrescenti. Tale decremento progressivo è stato inizialmente attribuito all'alterazione delle interazioni idrofobiche deboli che stabilizzano le sostanze umiche in soluzione, a causa dell'assorbimento degli acidi organici nelle fasi apolari delle sostanze umiche e delle conseguenti repulsioni elettrostatiche tra le cariche negative dei gruppi carbossilici, generate per effetto dei rapidi cambiamenti di pH nelle colonne di cromatografia ad esclusione molecolare in bassa pressione (LPSEC), usate per gli studi delle sostanze umiche in soluzione. Questi risultati hanno poi trovato conferma anche con la tecnica cromatografica ad alta prestazione (HPSEC), capace di fornire una ben maggiore riproducibilità analitica rispetto a quella ottenibile in bassa pressione (Piccolo *et al.*, 1999; Cozzolino *et al.*, 2001). L'aggiunta di piccole quantità di HCl ($<10^{-6}$ M) o di un acido monocarbossilico (10^{-7} M) alla fase mobile dell'HPSEC, mantenendo costante la

forza ionica, oppure alle soluzioni umiche prima dell'analisi HPSEC risulta sufficiente a far collassare le conformazioni umiche, apparentemente grandi, in frazioni di dimensioni molecolari minori, ma di maggiore stabilità termodinamica (Conte & Piccolo, 1999). La spiegazione logica di tale comportamento risiede nel guadagno di energia che dipende dalla formazione di legami ad idrogeno quando, abbassato il pH, le funzioni carbossiliche umiche si protonano. In altre parole, le molecole umiche, una volta protonate, tendono ad abbandonare la debole conformazione adottata a pH neutro e stabilizzata da interazioni di natura idrofobica, per formare legami intermolecolari ad idrogeno relativamente più forti. Se analizzati nelle stesse condizioni del materiale umico, né polimeri neutri né polimeri carichi negativamente, come i polisaccaridi o i polistirensulfonati, subiscono cambiamenti nei volumi di eluizione in HPSEC, confermando indirettamente la natura non polimerica delle sostanze umiche (Piccolo & Conte, 2000; Piccolo *et al.*, 2000; Piccolo *et al.*, 2001). Altre variazioni significative si riscontrano nell'assorbività molare globale registrata dal rivelatore UV. Queste modificazioni nell'assorbanza UV degli acidi umici possono essere spiegate con il fenomeno dell'ipocromismo (Cantor & Schimmel, 1980; Freifelder, 1982), ossia l'alterazione dell'orientamento reciproco tra i momenti dei dipoli di transizione nei gruppi cromofori ed i dipoli indotti nei gruppi cromofori vicini. Quando i cromofori vengono separati per riduzione delle dimensioni conformazionali delle associazioni umiche, vi è una diminuzione dell'assorbività molare ed una riduzione dell'intensità di assorbanza nei cromatogrammi. Quindi l'effetto ipocromico, osservato nello studio delle interazioni delle sostanze umiche con acidi organici e minerali (Conte & Piccolo, 1999; Piccolo *et al.*, 1999; Cozzolino *et al.*, 2001), concorre ad indicare che le sostanze umiche sono aggregazioni di molecole debolmente associate. Infatti, se gli acidi umici

fossero dei polimeri covalenti, a forza ionica costante, una diminuzione del pH ne provocherebbe un raggomitolo, con conseguente aumento dell'assorbività molare e dell'intensità dei cromatogrammi rispetto ai cromatogrammi controllo. Al contrario, la diminuzione dell'assorbanza è evidenza che l'assorbività molecolare totale del materiale umico eluito è minore di quella del controllo. Questo fenomeno può, quindi, essere attribuito alla separazione dei gruppi cromofori, piuttosto che alla compattazione delle molecole umiche in gomitioli. Tutto ciò fa ritenere che l'aggiunta di acidi alle soluzioni umiche modifica le aggregazioni, dando origine a componenti più piccole, eluite a tempi di ritenzione più elevati.

Anche tecniche di analisi completamente diverse hanno prodotto risultati a sostegno della nuova visione della struttura molecolare delle sostanze umiche del suolo. La tecnica spettroscopica di risonanza magnetica nucleare multidimensionale (Simpson, 2002), ad esempio, ha evidenziato nelle soluzioni di sostanze umiche comportamenti di aggregazione e di disaggregazione simili a quelli descritti da Piccolo (2001). Inoltre, misure di spettrometria di massa in fase liquida con interfaccia ad elettrospray (ESI/MS) sia a bassa (Pfeifer *et al.*, 2001; Piccolo & Spiteller, 2003) che ad alta risoluzione (Stenson *et al.*, 2003) hanno fornito distribuzioni di masse molecolari con valori medi intorno a 1000 Da, ben al di sotto di quelli misurati con metodi tradizionali come l'ultracentrifugazione (Stevenson, 1994).

L'insieme di questi risultati evidenzia chiaramente l'inadeguatezza del modello polimerico, indicando che le sostanze umiche in soluzione si comportano piuttosto come autoassociazioni supramolecolari di molecole eterogenee relativamente piccole (<1000 Da), tenute insieme da forze di legame di natura prevalentemente idrofobica. La stabilità termodinamica di tali conformazioni in soluzione è attribuita alla tendenza, guidata

dall'entropia, ad escludere molecole d'acqua dalle associazioni umiche, con conseguente diminuzione dell'energia molecolare totale (Piccolo, 2002).

1.5 Caratterizzazione molecolare delle sostanze umiche

La necessità di chiarire il ruolo che il materiale umico svolge nelle dinamiche ambientali induce il bisogno di sviluppare, nell'ambito della realtà del modello supramolecolare, metodi volti alla separazione delle varie molecole umiche ed alla determinazione della loro struttura, per ottenerne una precisa caratterizzazione molecolare e chimico-fisica.

La caratterizzazione delle sostanze umiche si è sempre basata su metodi degradativi, con l'obiettivo di produrre semplici composti che fossero rappresentativi delle unità strutturali principali delle macromolecole umiche (Stevenson, 1994). Ogni tipo di degradazione presenta, comunque, una serie di vantaggi e di limitazioni. Da un lato, i metodi drastici, come quelli ossidativi o riduttivi, determinano la degradazione del materiale di partenza in frammenti così diversi dagli originali da impedire la ricostruzione della struttura iniziale. Infatti, alcuni composti subiscono, nelle condizioni di reazione utilizzate, modifiche sostanziali cosicché i prodotti finali identificati possono originarsi da una grande varietà di unità strutturali e non essere indicativi dunque delle macromolecole di origine. Per esempio, l'ossidazione alcalina con permanganato di potassio, ampiamente utilizzata per la caratterizzazione delle sostanze umiche, ha portato all'identificazione di acidi benzencarbossilici ed acidi dicarbossilici (Schnitzer, 1972), derivando i primi dall'ossidazione della catene laterali associate con i composti policiclici aromatici oppure dalla rottura degli anelli aromatici contenenti ossigeno ed i secondi dall'ossidazione dei composti a catena lineare oppure dei sistemi

ad anello più labili. L'esigenza di minimizzare l'alterazione del materiale di partenza e la formazione di sottoprodotti indesiderati ha spinto all'utilizzo di agenti ossidanti in condizioni acide, come l'acido peracetico (Schnitzer & Skinner, 1974), ma i risultati non si sono dimostrati molto diversi da quelli ottenuti con il permanganato di potassio o con l'ossido di rame in condizioni alcaline. Anche l'ossidazione con ipoclorito di sodio ha portato all'identificazione di una grande varietà di acidi benzenpolicarbossilici insieme a quantità relativamente elevate di acidi carbossilici alifatici, mentre l'assenza di strutture fenoliche è, in tal caso, imputabile alla rottura degli anelli aromatici. Le tecniche riduttive, per quanto meno drastiche di quelle ossidative, hanno mostrato comunque delle limitazioni notevoli. Per esempio, il metodo della riduzione con amalgama di sodio, che rompe i legami eteri, oltre a saturare i doppi legami e ridurre i gruppi funzionali contenenti ossigeno, presenta l'inconveniente della deidrossilazione dei prodotti di reazione e della possibile riossidazione dei prodotti più labili in presenza di ossigeno molecolare (Martin *et al.*, 1974).

D'altro canto, le procedure degradative più blande, come le idrolisi acide o basiche, generano quantità di prodotti identificabili molto basse, dell'ordine di poche unità percentuali rispetto al materiale di partenza. Per tale ragione, i prodotti rilasciati in queste condizioni non sempre possono considerarsi rappresentativi della composizione complessiva delle sostanze umiche, visto che un'alta percentuale del materiale originale rimane inalterato. Tuttavia, si può almeno assumere che la formazione di sottoprodotti e l'alterazione di strutture diagnostiche labili siano minimizzate nelle condizioni di reazione adoperate. Spesso, infatti, le procedure idrolitiche, sia acide sia basiche, sono state utilizzate per rimuovere proteine, carboidrati ed altri costituenti alifatici, come

passo di purificazione preliminare delle sostanze umiche per poi sottoporle ad ulteriori caratterizzazioni chimiche e chimico-fisiche.

Un metodo di degradazione “ideale” dovrebbe essere blando, ma al tempo stesso fornire quantità considerevoli di prodotti di degradazione di complessità molecolare limitata, minimizzando la formazione di artefatti. Sebbene esso non esista per le sostanze umiche a causa della possibile grande varietà di legami tra le diverse molecole costitutive, l’abbinamento di procedure degradative con forza crescente e di analisi spettroscopiche appropriate può rappresentarne una buona approssimazione. Infatti, attraverso l’applicazione combinata di tecniche, prima separative e poi spettroscopiche, in più fasi si possono ricavare indizi rilevanti circa l’organizzazione gerarchica delle differenti unità nelle macromolecole. È, infatti, verosimile che le relazioni funzionali nelle sostanze umiche dipendano soprattutto dal modo in cui i blocchi costitutivi specifici formano strutture flessibili che comprendono diversi raggruppamenti definiti dalla condensazione variabile delle strutture (Wershaw, 1986; Hayes & Swift, 1990; Almendros *et al.*, 1998). È dunque importante distinguere i diversi tipi di legame che tengono unita la matrice umica, per rimuoverne i costituenti in maniera selettiva.

Un contributo fondamentale per la caratterizzazione della sostanza organica è oggi fornito dall’applicazione di tecniche analitiche specifiche. Tecniche avanzate di recente sviluppo, quali la termochemolisi effettuata in presenza di idrossido di tetrametilammonio (TMAH), la risonanza magnetica nucleare al carbonio-13 in fase solida (CPMAS-¹³C-NMR), la spettrometria di massa in fase liquida con interfaccia ad elettrospray (ESI/MS), in infusione diretta o accoppiata alla cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione (HPSEC), hanno dato un notevole sostegno a questo tipo di studi strutturali, in considerazione della potenzialità di caratterizzazione diretta del

materiale organico, senza necessità di estrazioni e frazionamenti. La termochemolisi con TMAH è un metodo di degradazione termica altamente selettivo che idrolizza e metila i legami esterei e quelli eterici presenti nella sostanza umica e consente l'identificazione dei prodotti di reazione tramite gas-cromatografia/spettrometria di massa, convertendo i composti polari in derivati meno polari, sufficientemente volatili per le analisi gas-cromatografiche (Chefetz *et al.*, 2002). L'applicazione di tale tecnica alle sostanze umiche consente di raccogliere informazioni strutturali fondamentali per la loro caratterizzazione chimica (Martín *et al.*, 1995; Grasset & Amblès, 1998). Di indiscussa utilità è anche il supporto della risonanza magnetica nucleare al carbonio-13 in fase solida (Conte *et al.*, 2004), specialmente se utilizzata dopo trattamenti selettivi volti a chiarire l'organizzazione gerarchica delle varie unità presenti nelle associazioni umiche (Almendros *et al.*, 1998). In tal caso, questa tecnica consente di seguire le variazioni della composizione del materiale organico e di far luce sulle componenti macromolecolari collegate da diversi tipi di legame con stabilità progressiva. Negli ultimi anni è stata valutata, infine, l'applicazione della tecnica ESI/MS anche alle sostanze umiche (Leenheer & Croue, 2003; Richardson, 2004). L'interesse in questa tecnica spettrometrica nasce dai vantaggi che presenta, essendo un processo di ionizzazione estremamente delicato. La presunta produzione di ioni umici non frammentati, senza la formazione di artefatti molecolari, infatti, consente di caratterizzare le sostanze umiche attraverso la valutazione della distribuzione della massa molecolare (Piccolo & Spiteller, 2003), contribuendo così ad ottenere informazioni basilari sulla struttura chimica dei blocchi molecolari costituenti la materia organica.

Pertanto l'applicazione combinata delle tecniche descritte alle frazioni separate dai materiali umici attraverso l'uso sequenziale di diversi trattamenti degradativi, più o meno blandi, mirati alla rimozione selettiva dei costituenti umici, sembra rappresentare un approccio innovativo e promettente per un'accurata caratterizzazione molecolare della sostanza organica naturale.

CAPITOLO 2

OBIETTIVO E DESCRIZIONE DELLA TESI

La sostanza organica naturale è ampiamente distribuita nei suoli, nelle acque e nei sedimenti e consiste di un'autoassociazione supramolecolare dei prodotti di decomposizione dei residui vegetali ed animali e dei loro metaboliti microbici. Le caratteristiche umiche quali la dimensione, la composizione chimica, la struttura molecolare dei costituenti e la varietà di gruppi funzionali variano ampiamente in funzione dell'origine del materiale umico.

Per comprendere il ruolo che il materiale umico svolge nelle dinamiche ambientali, risulta necessaria una precisa caratterizzazione molecolare e chimico-fisica di acidi umici, acidi fulvici ed umina: tale caratterizzazione consente, ad esempio, di mettere in relazione la struttura molecolare delle sostanze umiche con la chimica delle diverse classi di contaminanti con cui esse interagiscono e di predire così il destino e le dinamiche di tali inquinanti negli ecosistemi naturali.

Gli studi sulle componenti organiche del suolo non sono numerosi a causa della complessità ed eterogeneità del materiale umico e delle difficoltà ad ottenere estrazioni riproducibili delle varie sue frazioni dai suoli. Tuttavia, i metodi per estrarre, purificare e, soprattutto, caratterizzare le sostanze umiche devono essere considerati come uno strumento necessario per studiare l'impatto che la frazione umificata della materia organica del suolo ha a livello ambientale.

Un contributo notevole allo studio delle sostanze umiche è stato fornito dal modello conformazionale sviluppato di recente (Piccolo, 2002) secondo cui, in base a tecniche cromatografiche ad esclusione molecolare a bassa ed alta pressione, le sostanze umiche, piuttosto che macromolecole polimeriche, sono descritte come associazioni supramolecolari di molecole eterogenee a basso peso molecolare (<1000 Da), tenute insieme da forze relativamente deboli (Van der Waals, p-p, CH-p). La formazione di tali associazioni pseudo-micellari, formate da domini idrofobici in stretto contatto con domini idrofilici, spiegherebbe inoltre la capacità che le sostanze umiche hanno di regolare la mobilità dei contaminanti organici attraverso un loro adsorbimento all'interno dei domini idrofobici supramolecolari.

La consapevolezza della realtà del modello supramolecolare induce il bisogno di studiare come poter efficacemente separare le varie molecole umiche e determinarne la struttura. Questo lavoro di tesi ha voluto contribuire a questa esigenza attraverso l'applicazione combinata di più tecniche, prima separative e poi spettroscopiche, al fine di ottenere maggiori informazioni sulle caratteristiche molecolari dei costituenti della sostanza organica naturale.

Il punto di partenza è stato lo sviluppo di una procedura analitica di frazionamento delle sostanze umiche. Data l'eterogeneità di tali materiali, i metodi degradativi drastici non sono stati considerati efficaci, in quanto non consentono l'identificazione di molecole labili che vengono alterate e trasformate in strutture molto diverse da quelle originali esistenti nelle sostanze umiche. È stata ritenuta più vantaggiosa, invece, una rimozione selettiva dei costituenti umici, attraverso una serie di estrazioni e di blande reazioni idrolitiche volte alla separazione di frazioni omogenee di classi molecolari, più facilmente identificabili.

L'analisi degli estratti organici mediante gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) ha consentito l'identificazione dei composti estratti, basata sul confronto dei loro spettri di massa con quelli dei composti presenti nelle librerie disponibili in rete, fornendo dati circa la loro struttura, composizione elementare e peso molecolare. L'utilizzo di rette di taratura, costruite con concentrazioni note di standard rappresentativi dei composti presenti nei campioni, ha allo stesso tempo consentito l'analisi quantitativa dei singoli componenti di ogni frazione analizzata alla GC/MS, contribuendo ad un'accurata caratterizzazione della composizione delle frazioni estratte.

Informazioni strutturali sui residui solidi finali risultanti dai vari passaggi della procedura di frazionamento sono state ricavate attraverso l'utilizzo della pirolisi - gas-cromatografia/spettrometria di massa (Py-GC/MS) (Martín *et al.*, 1995; Guignard *et al.*, 2000) Essa è stata condotta come termochemolisi, attraverso l'uso di un agente derivatizzante come l'idrossido di tetrametilammonio (TMAH), per facilitare il passaggio in fase gassosa dei prodotti di pirolisi. Le frazioni solubili in acqua che si sono venute via via separando durante il frazionamento molecolare sono state studiate con la tecnica di spettrometria di massa in fase liquida con interfaccia ad elettrospray (ESI/MS) (Piccolo & Spiteller, 2003). Essa è stata impiegata sia in infusione diretta che accoppiata alla cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione (HPSEC) analitica. Da un lato, la tecnica di pirolisi-GC/MS ha permesso l'identificazione dei composti frammentati che derivano dalla degradazione termica-pirolitica dei campioni. Dall'altro, la tecnica ESI/MS ha dato informazioni circa la distribuzione dei pesi molecolari medi pesati e numerici dei campioni, contribuendo in entrambi i casi ad analizzare la struttura chimica dei blocchi molecolari costituenti della materia organica di partenza.

Un ulteriore contributo allo sviluppo di questo studio è stato dato da analisi di tipo spettroscopico, come la spettroscopia infrarossa in riflettanza diffusa a trasformata di Fourier (DRIFT) (Capriel, 1997) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare al carbonio-13 in fase solida (CPMAS-¹³C-NMR) (Conte *et al.*, 2004).

Inoltre, in questa tesi si è tentato un approccio iniziale di combinazione dei risultati del frazionamento molecolare con l'uso di modelli molecolari. I composti rappresentativi ottenuti da ogni fase della procedura analitica di frazionamento sono stati sottoposti a simulazioni dinamiche mediante il software di modellistica molecolare 3D Materials Studio (Accelrys). In un futuro, l'analisi delle proprietà sia strutturali sia dinamiche delle configurazioni all'equilibrio di tali sistemi molecolari permetterà di avere informazioni circa le geometrie molecolari, le conformazioni, le associazioni fisiche e chimiche e la mobilità dei componenti presi in considerazione. Questi studi di modellistica potranno rappresentare uno strumento per la comprensione delle interazioni deboli tra le molecole umiche nelle loro strutture supramolecolari. Tuttavia, qui si riporta soltanto uno studio preliminare che deve essere ancora approfondito ed ampliato.

CAPITOLO 3

PARTE SPERIMENTALE

3.1 I suoli

I suoli presi in considerazione in questo lavoro di tesi sono di provenienza italiana. Il primo è stato campionato a Vico, vicino Roma, e il secondo a Portici, in provincia di Napoli. In entrambi i casi si tratta di suoli di origine vulcanica: Portici sorge infatti alle falde dell'ancora attivo vulcano Vesuvio, mentre il complesso di Vico, posto immediatamente a sud dei Monti Cimini, è uno strato vulcanico con caldera centrale di sprofondamento, oggi occupato dal lago omonimo, e con un cono più giovane, Monte Venere, sorto all'interno della caldera stessa. Entrambi i suoli sono stati campionati nello strato superficiale (0-20 cm). Il campionamento è stato effettuato, nel caso del suolo di Vico, ad un'altitudine di 900 m, presso il Monte Fogliano, sotto una vegetazione di *Fagus sylvatica*, nel caso del suolo di Portici, invece, ad un'altitudine di 100 m, presso il Parco Gussone, sotto una vegetazione dominata da *Quercus ilex*.

In passato, vari studi pedologici sono stati effettuati sul sistema vulcanico di Vico (Quantin *et al.*, 1985; Lulli *et al.*, 1988), considerando i diversi tipi di suolo alle varie altitudini, e, più di recente, le caratteristiche pedologiche e geografiche di questi suoli sono state correlate alle caratteristiche strutturali degli acidi umici da essi estratti (Conte *et al.*, 2003). Il suolo campionato a 900 m ed utilizzato in questo lavoro di tesi è stato inizialmente classificato come Typic Dystrandept ed in seguito come Allic

Fulviudand (ICOMAND, 1986). Tale suolo, sottoposto ad un regime climatico udico, presenta caratteristiche tipicamente andiche (Quantin *et al.*, 1985), con contenuto di allofani piuttosto alto (2-5%). È stato evidenziato che l'elevato contenuto allofanico nei suoli andici favorisce l'accumulo di materiale organico, per il gran numero di complessi che si formano tra l'alluminio degli allofani ed i gruppi funzionali contenenti ossigeno delle molecole umiche (Yonebayashi & Hattori, 1989). In tal modo si può spiegare il contenuto di materiale organico piuttosto elevato nel campione preso in esame (14.5%).

Per quanto riguarda il suolo di Portici, le informazioni disponibili in letteratura sono più limitate (Amalfitano *et al.*, 1995).

Le principali proprietà pedologiche dei due suoli esaminati sono riportate in *Tabella 3.1* in Appendice 1.

3.2 Procedure di estrazione e purificazione delle sostanze umiche

L'estrazione delle sostanze umiche dai suoli indicati nel paragrafo precedente è stata effettuata seguendo una procedura standard (Stevenson, 1994). 200 g di suolo, seccato all'aria e setacciato a 2 mm, sono stati sospesi in rapporto 1:5 (w/v) in una soluzione 1 M di NaOH e 0.25 M di $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e lasciati in agitazione per 12 h in atmosfera di azoto. La miscela è stata poi centrifugata per 20 minuti a 7000 rpm in modo da separare l'estratto alcalino dalla fase solida, su cui la stessa procedura estrattiva è stata ripetuta altre due volte, con agitazioni di una sola ora. Dopo filtrazione dell'estratto alcalino su lana di vetro, gli acidi umici (HA) sono stati precipitati con HCl al 37% fino a pH 1. Una successiva centrifugazione e filtrazione su lana di vetro è servita a separare gli acidi fulvici (FA), rimasti in soluzione nel surnatante, dagli acidi umici precipitati.

La purificazione degli acidi umici si è effettuata mediante tre processi di dissoluzione in NaOH 0.1 M e riprecipitazione a pH 1 per addizione di HCl al 37%. Dopo ogni processo di dissoluzione/riprecipitazione il surnatante è stato allontanato mediante centrifugazione per 20 minuti a 4000 rpm. Gli acidi umici così trattati sono stati ulteriormente purificati mediante agitazione per 48 h in una soluzione di HCl/HF 0.5% (v/v), per allontanare gli eventuali silicati ancora presenti, dializzati in tubi da dialisi Spectrapore con cut-off molecolare di 3500 D, fino alla scomparsa di NaCl, ed infine liofilizzati.

Gli acidi fulvici, rimasti in soluzione dopo la precipitazione degli acidi umici a pH 1, sono stati passati su colonna di Amberlite XAD-8, precedentemente condizionata con HCl 1 M e neutralizzata con eluizioni di acqua distillata. Il materiale umico è rimasto adsorbito sulla colonna XAD per effetto di interazioni di natura idrofobica, mentre il materiale idrofilico non umico è stato eluito fuori dalla colonna. Gli acidi fulvici adsorbiti sono stati poi eluiti lavando la colonna XAD con NaOH 1 M, velocemente portati a pH 5 con HCl 1 M, dializzati in tubi da dialisi Spectrapore con cut-off molecolare di 3500 D, fino alla scomparsa di NaCl, ed infine liofilizzati.

Altri campioni utilizzati in questo lavoro di tesi sono il residuo di suolo rimanente dopo l'estrazione degli acidi umici e fulvici con NaOH e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, ripetutamente lavato con acqua distillata fino al raggiungimento di pH neutro, che sarà indicato con la sigla HUM 1, e lo stesso residuo di suolo sottoposto per due volte ad un trattamento volto all'eliminazione della parte minerale, mediante agitazione per 12 h in atmosfera di azoto con una soluzione di HF 10% e HCl 5% (v/v), successivamente dializzato in tubi da dialisi Spectrapore con cut-off molecolare di 3500 D, fino alla scomparsa di NaCl, ed infine liofilizzato, che sarà indicato con la sigla HUM 2.

3.3 Contenuto in ceneri e composizione elementare delle sostanze umiche

Il contenuto in ceneri dei suoli e delle sostanze umiche utilizzate in questo studio è stato determinato per differenza di peso prima e dopo l'ignizione in muffola a 750° C per 8 h di 50-100 mg di campione, risultando sempre inferiore al 5% in peso per ciascun campione.

L'analisi elementare dei singoli campioni è stata effettuata con un analizzatore Interscience EA 1108 CHN della Fisons Instruments. Pochi milligrammi di ogni campione, pesati in una piccola capsula di stagno, sono stati totalmente mineralizzati a 1020° C sotto flusso di ossigeno. La CO₂, l'H₂O e l'N₂ sviluppati sono stati separati per gas-cromatografia e rivelati con un rivelatore a conduttività termica. La determinazione quantitativa di C, H e N si è ottenuta mediante integrazione dei picchi dei gas sviluppati dalla degradazione delle sostanze organiche usando il software fornito dalla casa costruttrice dello strumento, in relazione a curve di calibrazione precedentemente sviluppate con sostanze a composizione elementare nota.

Nella *Tabella 3.2* e nella *Tabella 3.3*, in Appendice 1, sono riportati i contenuti di C, H e N dei suoli campionati, rispettivamente, nella caldera di Vico e nel Parco Gussone di Portici e delle relative frazioni umiche studiate in questo lavoro di tesi.

3.4 Procedura di frazionamento

I principali passaggi della procedura analitica di frazionamento sviluppata per gli acidi umici e le altre frazioni di sostanza organica del suolo sono schematizzati nella *Figura 3.1*, in Appendice 1.

3.4.1 Estrazione dei lipidi liberi

500 mg di campione nel caso degli acidi umici e 2 g nel caso degli acidi fulvici e dell'umina, sia tal quale sia purificata, sono stati seccati in stufa a 40° C e poi trattati con una miscela 2:1 (v/v) di diclorometano/metanolo per 2 h a temperatura ambiente su agitatore magnetico, per estrarre i lipidi liberi, cioè i lipidi non legati alla sostanza organica per mezzo di legami chimici covalenti. L'estratto organico ed il residuo solido sono stati separati mediante centrifugazione in tubi di teflon per 25 minuti a 7000 rpm. Rimosso il surnatante, il residuo è stato di nuovo sottoposto ad estrazione su agitatore magnetico con una miscela 2:1 (v/v) di diclorometano/metanolo per 12 h a temperatura ambiente e, dopo centrifugazione per 25 minuti a 7000 rpm, il surnatante è stato aggiunto a quello raccolto precedentemente. Nei primi stadi di sviluppo della procedura di frazionamento, l'estratto lipidico totale, ridotto il volume a 5 mL per evaporazione della miscela di solventi col rotavapor, è stato frazionato su colonna di silice, usando eluenti a polarità crescente (n-esano, toluene e metanolo). In seguito, si è preferito effettuare il frazionamento dell'estratto lipidico totale utilizzando cartucce d'amminopropile per l'estrazione in fase solida (SPE), secondo la procedura descritta in seguito nel paragrafo 3.4.2.3.

3.4.2 Transesterificazione con trifluoruro di boro

Il residuo rimanente dopo l'estrazione dei lipidi liberi, asciugato all'aria, è stato trattato in tubi di teflon con tappo a vite con 15 mL di BF₃-CH₃OH al 12%, in modo da effettuare la transesterificazione dei monomeri esterificati presenti nel residuo e dare origine a prodotti solubili in cloroformio (Kolattukudy *et al.*, 1975; Almendros & Sanz, 1989; Almendros & Sanz, 1991), secondo la reazione:



in cui R', nel nostro caso, è il gruppo CH₃ del metanolo e il BF₃, in quanto acido di Lewis, agisce da catalizzatore.

La miscela di reazione è stata riscaldata a 90°C per 12 h, poi, dopo raffreddamento, il residuo è stato separato dal surnatante mediante centrifugazione per 15 minuti a 7000 rpm e sottoposto per altre due volte a reazione di transesterificazione con 10 mL di BF₃-CH₃OH, nelle stesse condizioni riportate sopra. I surnatanti riuniti insieme sono stati trattati con un eccesso di acqua per distruggere il complesso trifluoruro di boro-metanolo e sono stati sottoposti ad un'estrazione liquido-liquido con cloroformio (per tre volte con 40 mL di solvente), ottenendo così una fase acquosa ed una organica. La fase acquosa è stata dializzata in tubi da dialisi Spectrapore con cut-off molecolare di 3500 D, fino alla scomparsa di NaCl, e poi liofilizzata; quella organica è stata seccata con Na₂SO₄ anidro per eliminare l'acqua residua e filtrata su filtro Whatman GF/C a microfibra di vetro per la rimozione dei sali.

L'estratto organico totale, a questo punto, è stato sottoposto a due differenti procedure di frazionamento, messe a confronto tra loro, come mostrato in *Figura 3.2*, in *Appendice 1*: la tradizionale estrazione liquido-liquido e la più innovativa estrazione su fase solida (SPE).

3.4.2.1 Estrazione liquido-liquido

L'estratto lipidico in cloroformio, intensamente colorato per la presenza di materiali fenolici, è stato trattato in un imbuto separatore con 20 mL di KOH 1 N, in

modo da separare la sottofrazione alifatica dalla sottofrazione aromatica, secondo la procedura tradizionalmente riportata in letteratura (Kolattukudy *et al.*, 1975; Almendros & Sanz, 1989; Almendros & Sanz, 1991). La fase organica è stata lavata con HCl 3 N, per rimuovere le tracce residue di basi, e la frazione alifatica si è recuperata dalla fase organica seccata con Na₂SO₄ anidro e filtrata su filtro Whatman GF/C a microfibra di vetro. La frazione aromatica, invece, è stata ricavata dalla fase acquosa acidificata mediante estrazione liquido-liquido con etere etilico (per tre volte con 20 mL di solvente).

3.4.2.2 Vantaggi dell'estrazione in fase solida (SPE)

La tecnica SPE è considerata una delle più efficienti tecniche attualmente disponibili per una preparazione dei campioni rapida e selettiva e la sua versatilità ne permette l'utilizzo nell'ambito di un'ampia gamma di settori. È un metodo molto efficace per la purificazione dei campioni così come per l'isolamento dei composti e la rimozione dei reagenti in eccesso e molte tecniche quantitative (HPLC, GC, UV) ne prevedono l'utilizzo come primo passo nella procedura di preparazione dei campioni. È una tecnica molto utilizzata anche per la separazione delle componenti lipidiche, in matrici sia biologiche che alimentari (Gutiérrez *et al.*, 1998; Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino, 2000).

Le fasi stazionarie più comunemente utilizzate nell'estrazione in fase solida sono costituite da particelle di silice chimicamente modificate con gruppi funzionali, covalentemente legati in superficie, che ne determinano la selettività cromatografica ed il meccanismo estrattivo. I principali meccanismi di estrazione sono tre: fase normale, fase inversa e scambio ionico. Le estrazioni in fase normale sono usate per estrarre

analiti polari da solventi organici non polari e, essendo il meccanismo di ritenzione basato sui legami H e sulle interazioni dipolo-dipolo e p-p tra gli analiti polari e la fase stazionaria, il campione va caricato sulla colonna con un solvente non polare ed eluito con solventi organici polari in combinazione con solventi organici non polari. Le estrazioni in fase inversa servono, invece, ad estrarre analiti organici idrofobici o anche polari da una matrice acquosa: le catene idrocarburiche presenti sia sull'analita sia sulla fase stazionaria sono attratte vicendevolmente dalle forze di dispersione di van der Waals a bassa energia e l'eluizione va effettuata poi con solventi organici, quali metanolo o acetonitrile, in combinazione con acqua, acidi, basi o altri solventi. Infine, nel caso di analiti carichi in campioni acquosi o organici a bassa forza ionica, si possono utilizzare fasi stazionarie che presentano carica opposta rispetto a quella dell'analita da trattenere e le eluizioni vanno fatte poi con tamponi ad alta forza ionica o con acidi o basi forti.

Se messa a confronto con i convenzionali metodi estrattivi, la tecnica SPE presenta numerosi vantaggi: oltre ad essere più semplice e veloce, richiede quantità minori sia di campione che di solventi, consentendo dunque di risparmiare tempo e materiali. Inoltre, l'estrazione in fase solida può essere considerata una tecnica eco-compatibile, data la drastica riduzione della quantità di solventi tossici necessari per l'estrazione.

Per tali ragioni, si è considerato opportuno sperimentare l'utilizzo della tecnica di estrazione su fase solida come alternativa alla procedura di separazione di una frazione alifatica ed una frazione aromatica attraverso il tradizionale dibattimento liquido-liquido.

3.4.2.3 Estrazione su fase solida (SPE)

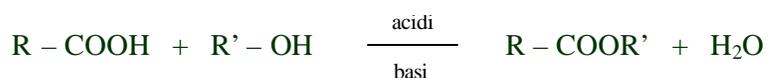
Sono stati messi a confronto due metodi estrattivi utilizzando cartucce d'amminopropile per l'estrazione in fase normale (Strata NH₂ 500 mg/3 ml, Phenomenex). In entrambi i casi, l'estratto in cloroformio derivante dal trattamento con BF₃-CH₃OH è stato portato a secco mediante rotavapor ed il residuo è stato ripreso in una quantità minima di:

- 1) una miscela 4:1 (v/v) di *n*-esano-cloroformio, nel primo caso (Gutiérrez *et al.*, 1998), caricato sulla colonna SPE, precedentemente condizionata con 4 mL di *n*-esano, ed eluito per forza di gravità con:
 - a. 8 mL di *n*-esano;
 - b. 6 mL di una miscela 5:1 (v/v) di *n*-esano/cloroformio;
 - c. 10 mL di cloroformio;
 - d. 10 mL di una miscela 98:2 (v/v) di etere etilico/acido acetico.
- 2) una miscela 2:1 (v/v) di diclorometano/isopropanolo, nel secondo caso (Bull *et al.*, 2000), caricato sulla colonna SPE, precedentemente condizionata con 4 mL di *n*-esano, ed eluito per forza di gravità con:
 - a. 8 mL di una miscela 2:1 (v/v) di diclorometano/isopropanolo;
 - b. 8 mL di una miscela 98:2 (v/v) di etere etilico/acido acetico.

I due metodi estrattivi hanno dato risultati equivalenti alla successiva analisi GC/MS, quindi per semplicità si è utilizzato il secondo metodo, in maniera tale da ottenere solo due frazioni: la prima, eluita con diclorometano ed isopropanolo, è indicata come frazione neutra e la seconda, eluita con etere etilico ed acido acetico, è indicata come frazione acida.

3.4.3 Idrolisi alcalina

Il residuo solido rimanente dopo la reazione di transesterificazione con trifluoruro di boro e metanolo è stato sottoposto ad idrolisi alcalina, in maniera tale da assicurare la rottura di tutti i legami esterei ancora presenti nella sostanza organica e non precedentemente modificati dalla reazione di transesterificazione, secondo la seguente reazione:



in cui R', nel nostro caso, è il gruppo CH₃ del metanolo e il catalizzatore è la base KOH.

Il residuo proveniente dalla reazione di transesterificazione, asciugato all'aria, è stato sospeso in 50 mL di CH₃OH con KOH 1 N e lasciato reagire a ricadere per 2 h a 70° C. Tornata a temperatura ambiente, la miscela di reazione viene centrifugata in tubi di teflon per 10 minuti a 3000 rpm e il surnatante rimosso. Inizialmente si è provato ad effettuare delle estrazioni a valori differenziati di pH, acidificando il surnatante con HCl al 37% in maniera graduale ed estraendolo mediante dibattimento liquido-liquido con diclorometano (per tre volte con 50 mL di solvente) prima a pH 11, poi a pH 7 ed infine a pH 2 (Naafs & van Bergen, 2002), ma le differenze tra i tre estratti non sono risultate significative per cui si è deciso di effettuare un'unica estrazione a pH 2. Il residuo, però, è stato ulteriormente estratto due volte con metanolo (10 mL) e due volte con diclorometano (10 mL) a temperatura ambiente per 15 minuti su agitatore, centrifugando la sospensione dopo ogni estrazione per 10 minuti a 3000 rpm. I surnatanti riuniti insieme sono stati poi acidificati con HCl al 37% fino a pH 2 e, dopo aggiunta di acqua, estratti mediante dibattimento liquido-liquido con diclorometano (per

tre volte con 100 mL di solvente), separando in tal modo la fase acquosa da quella organica (Nierop *et al.*, 2003). La fase acquosa è stata dializzata in tubi da dialisi Spectrapore con cut-off molecolare di 3500 D, fino alla scomparsa di NaCl, e poi liofilizzata. Le quantità residue di campione così ottenute sono generalmente risultate molto scarse (= 0.2 mg). La fase organica è stata seccata con Na₂SO₄ anidro per eliminare l'acqua residua e filtrata su filtro Whatman GF/C a microfibra di vetro per la rimozione dei sali.

3.4.4 Trattamento con acido iodidrico

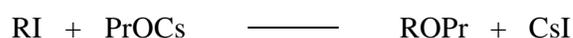
Il residuo solido rimanente dopo la reazione di idrolisi alcalina è stato sottoposto a trattamento con acido iodidrico (HI), un classico reagente utilizzato per la rottura dei legami eterici:



In presenza di un eccesso di acido iodidrico, si ottengono soltanto gli ioduri RI e R'I.

Per far avvenire tale reazione, il residuo, asciugato all'aria, è stato sospeso in 20 mL di una soluzione acquosa di acido iodidrico al 47% e lasciato reagire in atmosfera inerte (N₂) per 48 h a 75° C. La miscela di reazione, una volta raffreddata, è stata neutralizzata con l'aggiunta di una soluzione satura di carbonato acido di sodio (NaHCO₃). Lo iodio in eccesso formatosi durante la reazione è stato eliminato per riduzione con tiosolfato di sodio (Na₂S₂O₃), poi la miscela di reazione è stata centrifugata in tubi di teflon per 15 minuti a 7000 rpm e filtrata su filtro Whatman GF/C

a microfibra di vetro. Il surnatante è stato estratto mediante dibattimento liquido-liquido con etere etilico (per tre volte con 50 mL di solvente), separando in tal modo la fase acquosa da quella organica. La fase acquosa ed il residuo solido recuperato dopo la centrifugazione sono stati dializzati in tubi da dialisi Spectrapore con cut-off molecolare di 3500 D, fino alla scomparsa di NaCl, e poi liofilizzati. L'estratto organico invece, seccato con Na₂SO₄ anidro, è stato portato a secco per evaporazione del solvente mediante rotavapor, risospeso in una quantità minima di etere di petrolio e caricato su colonna di gel di silice, eluendolo poi con etere di petrolio. In alternativa al classico trattamento con LiAlD₄ che porta alla formazione di deuteroalcani, gli ioduri alchilici possono essere trasformati nei propionati degli alcool corrispondenti tramite reazione con pochi milligrammi di propionato di cesio in 2 mL di dimetilformammide per 24 h a 40° C (Amblès *et al.*, 1996), secondo la seguente reazione:



I prodotti di reazione così ottenuti mostrano il vantaggio di essere facilmente riconoscibili tramite GC/MS, presentando una frammentazione caratteristica con un picco a $m/z = 75$ (Grasset & Amblès, 1998).

3.4.5 Trattamento del residuo finale

Il residuo solido dell'acido umico estratto dal suolo di Vico, ottenuto dopo il trattamento con acido iodidrico, è risultato insolubile in tutti i solventi organici sperimentati (compreso il dimetilsolfossido) ed in soluzione acquosa, anche a pH alcalino, mentre si è sciolto in una soluzione di urea, ma solo dopo aver portato il pH

della soluzione a 9.4 con NaOH 0.01 M. L'urea in ambiente alcalino viene idrolizzata ad ammoniaca, per cui si è verificata la solubilità del campione direttamente in NH_3 1 M, a conferma della formazione di umati di ammonio in soluzione. Al contrario, il residuo solido dell'acido umico estratto dal suolo di Portici, ottenuto allo stesso modo dopo il trattamento con acido iodidrico, è risultato solo parzialmente solubile in NH_3 . Di conseguenza, i diversi tentativi di analisi, illustrati di seguito, hanno riguardato esclusivamente la soluzione in NH_3 1 M del residuo finale dell'acido umico estratto dal suolo di Vico.

3.4.5.1 Estrazione liquido-liquido

Si è provato, innanzitutto, ad estrarre tale soluzione mediante dibattimento liquido-liquido con toluene ed acetato di etile (per tre volte con 25 mL di ciascun solvente). I due estratti organici sono stati seccati con Na_2SO_4 anidro per eliminare l'acqua residua e filtrati su filtri Whatman GF/C a microfibra di vetro per la rimozione dei sali.

3.4.5.2 Estrazione su fase solida (SPE)

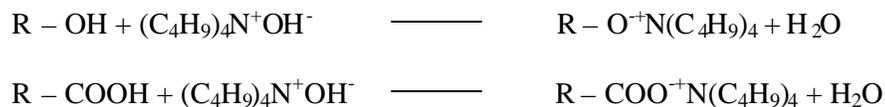
Si è provato anche ad effettuare un'estrazione su fase solida di pochi milligrammi di campione, sciolti in NH_3 1 M, utilizzando cartucce C_{18} per l'estrazione in fase inversa (Bond Elut C_{18} , Varian). Innanzitutto, la colonna SPE è stata condizionata con 8 mL di isopropanolo e 8 mL di NH_3 1 M, poi 1 mL di campione è stato caricato sulla colonna e si è effettuato un lavaggio con 5 mL di una miscela 9:1 (v/v) di acqua/metanolo. Infine, il campione è stato eluito con i seguenti solventi a polarità decrescente:

- a. 8 mL di una miscela 99:1 (v/v) di acetonitrile/acido acetico;
- b. 8 mL di acetonitrile;
- c. 8 mL di acetato di etile;
- d. 8 mL di toluene;
- e. 8 mL di n-esano.

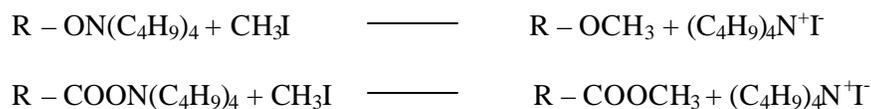
In questo caso, il condizionamento, il lavaggio e le eluizioni sono stati effettuati sotto vuoto.

3.4.5.3 Metilazione del residuo

Un altro tentativo è consistito nel derivatizzare direttamente il residuo solido mediante il metodo di alchilazione proposto da Liotta (Liotta, 1979; Liotta *et al.*, 1981): 10 mg di campione sono stati sciolti in 20 mL di NH₃ 1 M. Alla soluzione, agitata magneticamente, si sono addizionati 0.5 g di bromuro di tetrabuttilammonio e 20 mL di tetraidrofurano. La quantità di base aggiunta è stata calcolata in maniera da essere sufficiente a rimuovere tutti i protoni acidi; infatti, tale reazione comporta la conversione dei gruppi idrossilici, fenolici e carbossilici, nei corrispondenti eteri ed esteri, rispettivamente, secondo il seguente schema:



Dopo un'ora dall'inizio della reazione, sono stati aggiunti 0.5 mL di CH₃I come agente metilante in eccesso e si è fatta procedere la reazione per 48 h, in modo da assicurare la metilazione dei gruppi in esame:



Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 20 mL di acqua ed il pH della soluzione, inizialmente basico, è stato portato a 7 con HCl 2 M. I materiali volatili, come il tetraidrofurano, lo iodometano in eccesso e parte dell'acqua, sono stati fatti evaporare al rotavapor, usando un vuoto molto spinto, e gli ioduri di tetrabuttilammonio sono stati rimossi attraverso ripetuti lavaggi del campione, ciascuno con 30 mL di acqua, centrifugando dopo ogni lavaggio per 10 minuti a 3000 rpm, in maniera tale da separare il residuo pieno di sali dal surnatante. Un'altra serie di lavaggi è stata effettuata con acqua calda (30 mL per ciascun lavaggio), sonicando per 20 minuti e centrifugando come sopra. Altre due sonicazioni con 20 mL di acqua ciascuna sono state effettuate fino ad ottenere la completa rimozione dei sali. I residui separati dopo ogni centrifugazione sono stati riuniti, congelati ed infine liofilizzati.

Il residuo liofilizzato così ottenuto, insolubile in solventi quali l'acetone o l'acetato di etile, è risultato parzialmente solubile solo in dimetilsolfossido, in seguito a sonicazione.

Il residuo ottenuto dopo trattamento con acido iodidrico tal quale, il residuo metilato secondo la procedura sopra descritta ed il residuo silitato con 100 µL di BSTFA con l'1% di TMCS, per 1 h a 70°C (vedi paragrafo 3.5.2), sono stati sospesi in dimetilsolfossido, sonicati, filtrati su filtri Whatman GF/C a microfibra di vetro ed analizzati alla GC/MS.

3.4.5.4 Metodo DFRC

Un ultimo tentativo si è fatto col metodo DFRC (Derivatization Followed by Reductive Cleavage), comunemente applicato a studi strutturali sulla lignina (Lu & Ralph, 1997; Ikeda *et al.*, 2002), i cui passaggi principali sono mostrati in *Figura 3.3*, in Appendice 1.

Nel primo passaggio del metodo che prevede la reazione della lignina con bromuro di acetile, gli α -aril eteri vengono selettivamente rotti, tutti i gruppi ossidrilici liberi, sia fenolici sia alifatici, vengono acetilati e le posizioni β , sia idrossiliche sia eteree, vengono bromurate. Nel secondo passaggio, la riduzione con lo zinco determina la rottura dei β -bromo eteri formati nel passaggio precedente, lasciando inalterati i gruppi metossilici. Nel terzo passaggio, infine, i gruppi OH fenolici formati nel secondo passaggio vengono acetilati.

Tale metodo si è realizzato facendo reagire 10 mg del residuo in 2.5 mL di una miscela 8:92 (v/v) di bromuro di acetile ed acido acetico, per 12 h a temperatura ambiente. Rimosso il solvente col rotavapor a 50°C, il residuo è stato sciolto in 2.5 mL di una miscela 5:4:1 (v/v/v) di diossano/acido acetico/acqua a cui sono stati addizionati 50 mg di zinco in polvere, lasciando reagire per 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione. Una volta aggiunti 3 mg di esadecano come standard interno, alla miscela di reazione si sono addizionati 10 mL di diclorometano e 10 mL di cloruro di ammonio saturo in un imbuto separatore, si è abbassato a 3 il pH della fase acquosa con HCl al 3%, la fase organica è stata separata e quella acquosa estratta mediante dibattimento liquido-liquido con diclorometano (per tre volte con 5 mL di solvente). Le fasi organiche riunite sono state seccate con Na₂SO₄ anidro per eliminare l'acqua residua e filtrate su filtro Whatman GF/C a microfibrina di vetro per la rimozione dei sali.

Evaporato il solvente al rotavapor, il residuo è stato sospeso in 1.5 mL di diclorometano a cui si sono aggiunti 0.2 mL di anidride acetica e 0.2 mL di piridina, facendo procedere la reazione di acetilazione per 40 minuti a temperatura ambiente. Dopo la rimozione dei componenti volatili per coevaporazione con etanolo, si è ripreso il residuo in diclorometano e si è analizzato alla GC/MS.

3.5 Tecniche di spettrometria di massa

3.5.1 Analisi GC/MS

Le analisi GC/MS sono state effettuate utilizzando un gas cromatografo PerkinElmer Autosystem XL, equipaggiato con uno spettrometro di massa PerkinElmer Turbomass Gold. In tutte le misure, l'iniettore è stato mantenuto alla temperatura costante di 250°C e si è utilizzata una colonna capillare di silice fusa (Restek Rtx[®]-5MS), lunga 30 m, con diametro interno di 0.25 mm e film interno di spessore pari a 0.25 µm, con fase stazionaria costituita per il 5% da difenile e per il 95% da dimetilpolisilossano. L'elio è stato usato come gas di trasporto ad un flusso di 1.6 ml/min. Il programma di temperatura del forno ha previsto una temperatura iniziale di 100°C, con un tasso di aumento di 4°C/min fino alla temperatura finale di 300°C, mantenuta costante per 20 minuti. Lo spettrometro di massa ha operato in modalità di scansione completa, nell'intervallo di valori m/z compresi tra 50 e 600 amu, utilizzando un'energia di ionizzazione per l'impatto elettronico di 70 eV ed un tempo di ciclo di 1.0 s. I composti sono stati poi identificati per comparazione dello spettro di massa di ciascun picco cromatografico con quelli riportati nella libreria NIST MS.

3.5.1.1 Derivatizzazione dei campioni

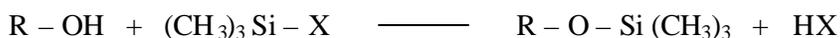
Prima di analizzarli alla GC/MS, gli estratti organici ottenuti dopo ogni passo della procedura di frazionamento sono stati sottoposti a derivatizzazione con reazioni di metilazione e sililazione (esclusi il caso del trattamento con acido iodidrico in cui l'estratto organico è stato derivatizzato con il propionato di cesio, come descritto nel paragrafo 3.4.4, il caso del residuo finale metilato secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.5.3 e quello del metodo DFRC, descritto nel paragrafo 3.4.5.4), allo scopo di rendere più volatili i gruppi polari e migliorare la rilevabilità dei composti rispetto a quelli di partenza non derivatizzati.

Dopo l'aggiunta di una quantità nota di acido tridecanoico come standard interno, la metilazione dei gruppi funzionali acidi si è effettuata facendo reagire a ricadere l'estratto organico, portato a secco mediante rotavapor, in un eccesso di CH₃OH con qualche goccia di cloruro di acetile (CH₃COCl), per 30 minuti a 60° C. Il CH₃COCl, grazie alla presenza del cloruro che è un buon gruppo uscente, catalizza la reazione di sostituzione nucleofila del tipo:



La miscela di reazione è stata poi concentrata per evaporazione del solvente mediante rotavapor, trasferita in una vial di vetro da 2 mL, portata a secco sotto un leggero flusso di azoto in modo tale da poter proseguire con la sililazione degli altri gruppi funzionali polari (soprattutto i gruppi ossidrilici degli alcool a catena lineare, degli steroli, degli idrossiacidi e dei fenoli).

La reazione di sililazione, condotta utilizzando come agente sililante 100 μL di N,O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamide (BSTFA) con l'1% di trimetilclorosilano (TMCS) come catalizzatore, per 1 h a 70°C , è proceduta secondo il seguente schema:



in cui $\text{X} = \text{CF}_3\text{CONSi(CH}_3)_3$.

L'eccesso di reagente sililante è stato poi rimosso sotto flusso di azoto e sono stati aggiunti 500 μL di diclorometano per l'iniezione alla GC/MS.

3.5.1.2 Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa di ciascun campione iniettato alla GC/MS (esclusi il caso del trattamento con acido iodidrico e quello del metodo DFRC, in cui si aggiunge l'esadecano come standard interno) è stata effettuata tramite l'utilizzo sia di uno standard interno sia di diversi standard esterni. L'aggiunta in ogni campione di una quantità nota di standard interno ha consentito di controllare la riproducibilità delle condizioni di misura: come standard interno è stato scelto l'acido tridecanoico, perché presente nei campioni di partenza in quantità trascurabili. L'utilizzo di standard esterni, invece, permette di quantificare le varie classi di composti in maniera più accurata, associando ogni singolo composto identificato alla retta di taratura dello standard più simile dal punto di vista chimico e strutturale. Come riassunto nella *Tabella 3.4*, in Appendice 1, sono stati scelti come standard esterni dei composti rappresentativi delle diverse classi di composti presenti nei campioni: l'acido tridecanoico, per gli acidi grassi saturi ed insaturi, per gli alcool, per gli alcani e gli alcheni; l'acido 16-

idrossiesadecanoico, per gli acidi grassi mono, di e tri-idrossilati; l'acido docosandioico, per gli acidi dicarbossilici; ed il sitosterolo, per gli steroli, i terpeni ed i composti aromatici. Per ciascuno standard esterno si è costruita una retta di taratura, riportando l'area dei picchi cromatografici in funzione delle concentrazioni note. Sono state analizzate alla GC/MS almeno cinque differenti concentrazioni di composto, partendo dalla minima quantità rilevabile fino a coprire l'intervallo, previsto in maniera orientativa con lo standard interno, in cui i composti corrispondenti sono presenti nei campioni. Infine, la quantità di ogni singolo analita è stata ricavata per interpolazione dell'area del picco cromatografico sulla retta di taratura dello standard corrispondente. Le rette di taratura considerate hanno mostrato sempre valori di $R^2 = 9.4$.

3.5.2 Pirolisi-GC/MS

Le pirolisi dei campioni sono state condotte *on-line*, utilizzando un pirolizzatore Pyrojector II SGE, direttamente connesso all'iniettore del gas cromatografo descritto nel paragrafo 3.5.1. Ciascun campione è stato inserito in un capillare di quarzo (50 mm di lunghezza x 530 μ m di diametro interno), metilato mediante l'aggiunta di alcune gocce di una soluzione al 25% di idrossido di tetrametilammonio (TMAH) in metanolo, asciugato sotto flusso di azoto per alcuni minuti ed introdotto nella fornace del pirolizzatore, mantenuta alla temperatura costante di 600°C. Le condizioni analitiche adottate sono state le stesse usate per le analisi GC/MS, descritte nel paragrafo 3.5.1, con la sola variazione del programma di temperatura del forno: in questo caso, infatti, la temperatura iniziale di 60°C è stata mantenuta per 1 minuto, poi aumentata alla velocità di 7°C/min fino a 100°C e alla velocità di 4°C/min fino a 320°C e mantenuta costante a questo valore per 5 minuti.

3.5.3 Analisi ESI/MS

Le analisi ESI/MS sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa Micromass ZMD, equipaggiato con una sorgente ESI operante in modalità sia positiva sia negativa. Per ottimizzare le condizioni di lavoro, il voltaggio di ionizzazione si è fissato a 4 kV, quello del rivelatore a 1.3 kV e la corrente di ionizzazione a 5 mA, la temperatura del capillare di trasferimento è stata mantenuta costante a 220°C e si è usato l'azoto come gas sia per la nebulizzazione sia per la desolvatazione, ad un flusso di 250 L/h. I valori del voltaggio di sono utilizzati sono stati variati tra -60 e -150 V, a seconda del campione analizzato. Lo spettrometro di massa ha operato in modalità di scansione singola, nell'intervallo di valori m/z compresi tra 150 e 2000 amu, ad una velocità di scansione di 2 s in modalità centroide.

Le misure sono state fatte in triplicato per ciascun campione, assicurando la pulizia della sorgente ogni 10-15 iniezioni. I pesi molecolari medi numerici (M_n) e quelli ponderali (M_w) sono stati poi calcolati dalla somma pesata degli spettri MS, dopo averne considerato i valori medi ed aver sottratto il rumore di fondo (Piccolo & Spiteller, 2003).

3.5.3.1 Infusione diretta

I campioni, con una concentrazione di 1 mg/mL, analizzati per infusione diretta, sono stati iniettati mediante l'autocampionatore Gilson 215, in quantità variabili (20 μ L, 40 μ L oppure 60 μ L), e la pompa Gilson 306 ha mantenuto il flusso di solvente ad un valore costante di 0.08 mL/min, con una variazione di pressione compresa tra 190 e 360 psi. L'aumento di pressione è stato presumibilmente causato dal graduale accumulo del

campione nel capillare. I due solventi utilizzati sono stati una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di acetato di ammonio 0.1 M/acetonitrile ed una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di ammoniaca 0.05%/acetonitrile.

3.5.3.2 Cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione (HPSEC) analitica on-line con ESI/MS

Le soluzioni di acidi umici e fulvici e le soluzioni delle loro frazioni acquose e dei loro residui solidi (60 μL) sono state analizzate all'ESI/MS anche dopo un'ulteriore separazione *on-line* mediante cromatografia ad esclusione molecolare. La separazione HPSEC è stata effettuata su colonna per HPSEC analitico Phenomenex Polysep-GFC-P 3000 (300 mm di lunghezza x 7.8 mm di diametro interno), preceduta da pre-colonna Phenomenex Polysep-GFC-P (35 mm di lunghezza x 7.8 mm di diametro interno). Come eluente si è utilizzata una soluzione 9:1 (v/v) di ammoniaca 0.05%/acetonitrile, ad un flusso di 1 mL/min.

3.6 Tecniche spettroscopiche

3.6.1 Analisi DRIFT

Gli spettri infrarossi in riflettanza diffusa a trasformata di Fourier (DRIFT) dei campioni si sono acquisiti utilizzando lo spettrometro FT-IR PerkinElmer Spectrum One, equipaggiato con un accessorio PerkinElmer per la riflettanza diffusa. Sono state accumulate fino a 100 scansioni di valori di $1/\nu$ compresi tra 4000 e 400 cm^{-1} , con una risoluzione di 4 cm^{-1} . Prima delle analisi, i campioni sono stati accuratamente

omogeneizzati e poi finemente macinati e mescolati con KBr in polvere in un mortaio d'agata, in proporzione di 1:40 in peso.

3.6.2 *Analisi CPMAS-¹³C-NMR*

L'acquisizione degli spettri di risonanza magnetica nucleare dei campioni presi in esame si è effettuata con la tecnica CPMAS-¹³C-NMR (Cross Polarization Magic Angle Spinning-¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy), utilizzando un magnete Bruker AV 300. Per rendere ottimali gli spettri, sono state utilizzate una velocità di rotazione di 13000 Hz, un tempo di riciclo di 1.5 s, un tempo di acquisizione di 20 ms, un tempo di contatto di 1 ms ed un numero di scansioni pari a 3000.

3.7 Modellistica molecolare.

Per quanto riguarda gli acidi umici estratti dal suolo di Vico, i risultati delle analisi GC/MS degli estratti organici ottenuti dopo ogni passo della procedura di frazionamento, precedentemente descritta, sono convertiti in una serie di modelli molecolari in tre dimensioni, di cui vengono effettuate anche delle simulazioni dinamiche. Per la costruzione di tali modelli, per i calcoli di dinamica molecolare e gli studi delle interazioni chimiche, si utilizza il software Materials Studio (Accelrys, Inc., San Diego, CA). In particolare, vengono usati il programma di simulazione dinamica DISCOVER ed il campo di forza COMPASS (Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies). Un'accurata descrizione dei modelli costruiti è riportata nel Capitolo 6.

APPENDICE 1

Tabella 3.1: Principali caratteristiche de i suoli campionati nella caldera di Vico e nel Parco Gussone di Portici.

	VICO	PORTICI
ALTITUDINE (m)	900	100
VEGETAZIONE	<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Quercus ilex</i>
pH	5.2	7.1
SABBIA GROSSOLANA (%)	33.1	10.7
SABBIA FINE (%)	12.2	45.9
LIMO (%)	39.3	21.6
ARGILLA (%)	15.4	6.8
MATERIALE ORGANICO (%)	14.5	15.0

Tabella 3.2 : Contenuto in C, H e N del suolo di Vico e delle relative frazioni umiche estratte.

CAMPIONE	C (%)	N (%)	H (%)	C/H
SUOLO	11.53	0.92	2.19	5.28
HA	50.96	4.06	4.32	11.81
FA	18.29	1.17	2.55	7.17
HUM 1	4.20	0.30	1.15	3.67
HUM 2	13.76	0.73	/	/

Tabella 3.3 : Contenuto in C, H e N del suolo di Portici e delle relative frazioni umiche estratte.

CAMPIONE	C (%)	N (%)	H (%)	C/H
SUOLO	2.95	0.28	/	/
HA	49.86	4.08	5.49	9.09
FA	28.88	1.86	3.54	8.17
HUM 1	0.10	0.98	/	/
HUM 2	0.10	1.61	/	/

Figura 3.1: Diagramma di flusso schematico dei trattamenti effettuati sui campioni di sostanze umiche.

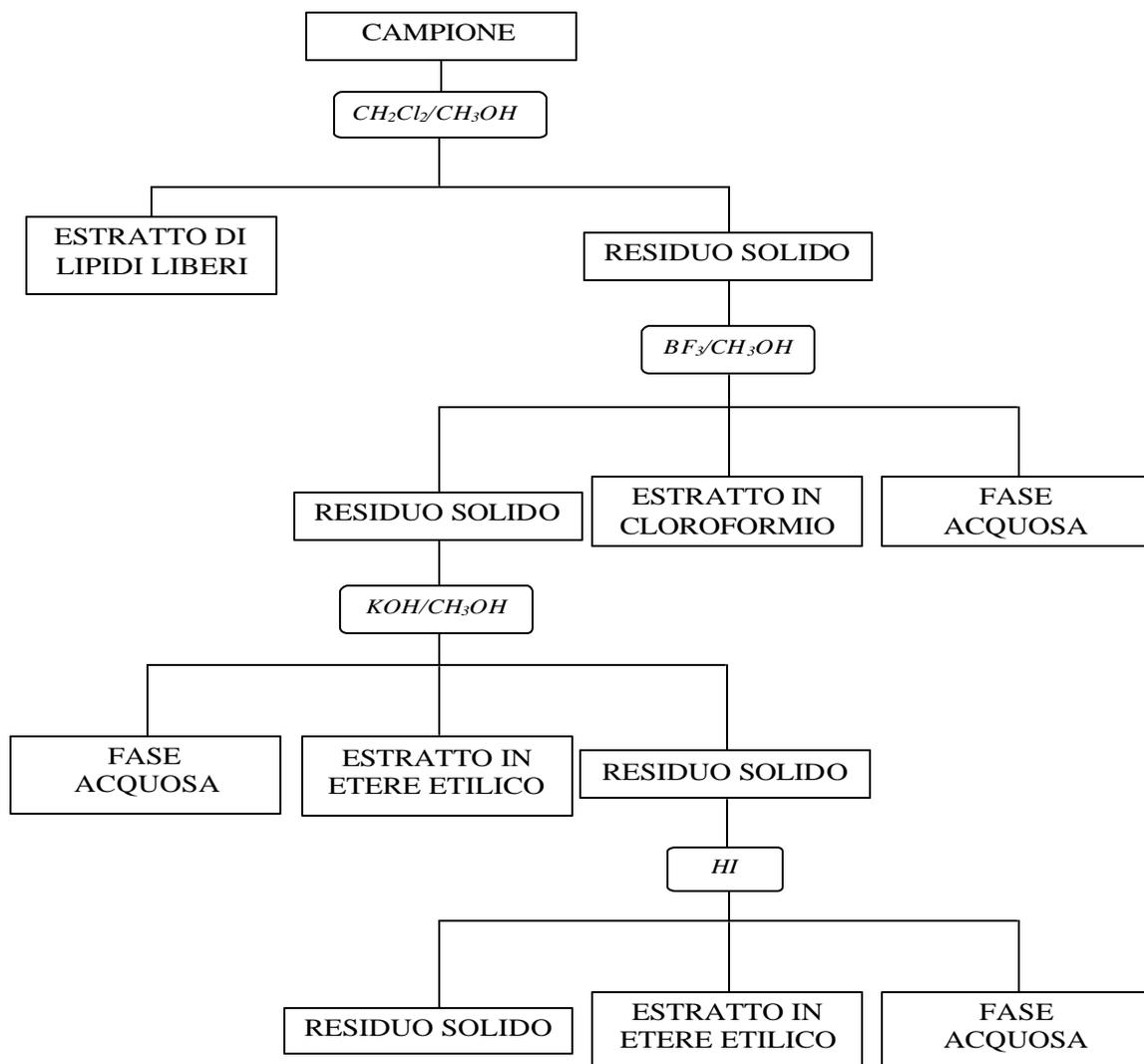


Figura 3.2: Diagramma di flusso schematico dei trattamenti effettuati sull'estratto in cloroformio, ottenuto dopo la reazione di transesterificazione con trifluoruro di boro-metano.

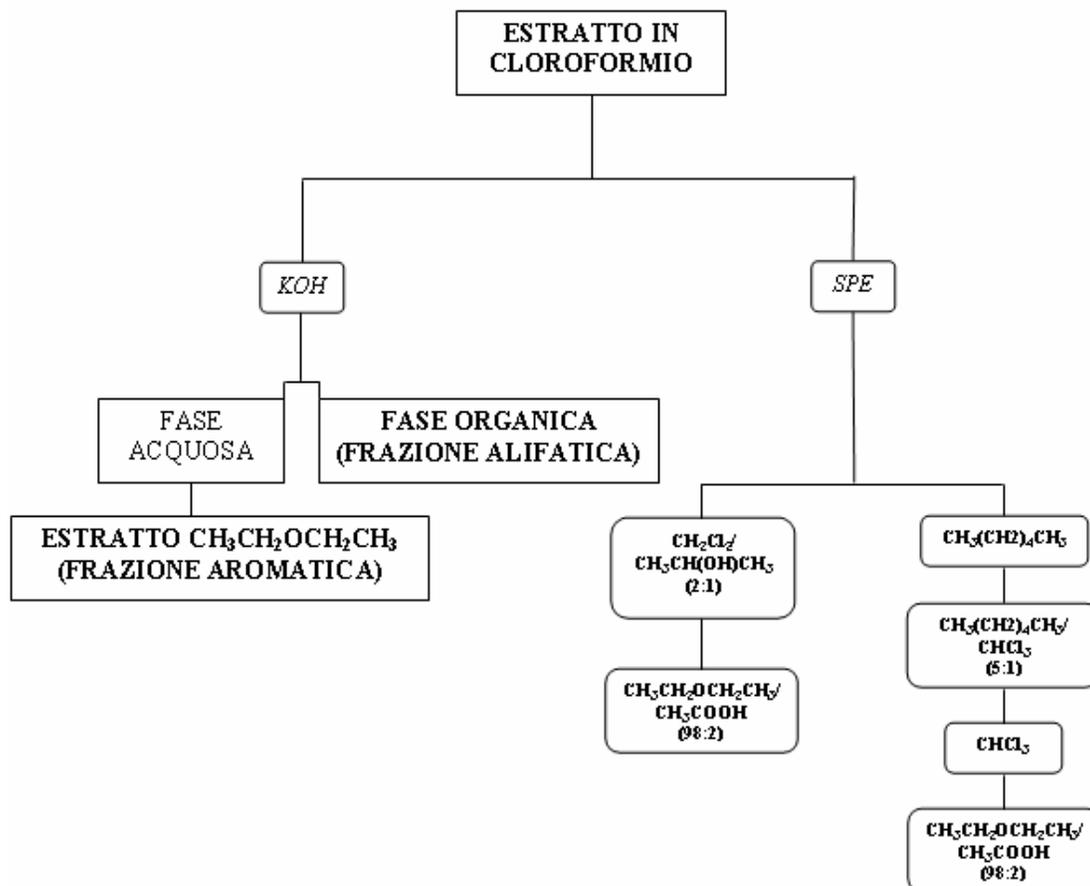


Figura 3.3: Rappresentazione schematica delle reazioni nel metodo DFRC.

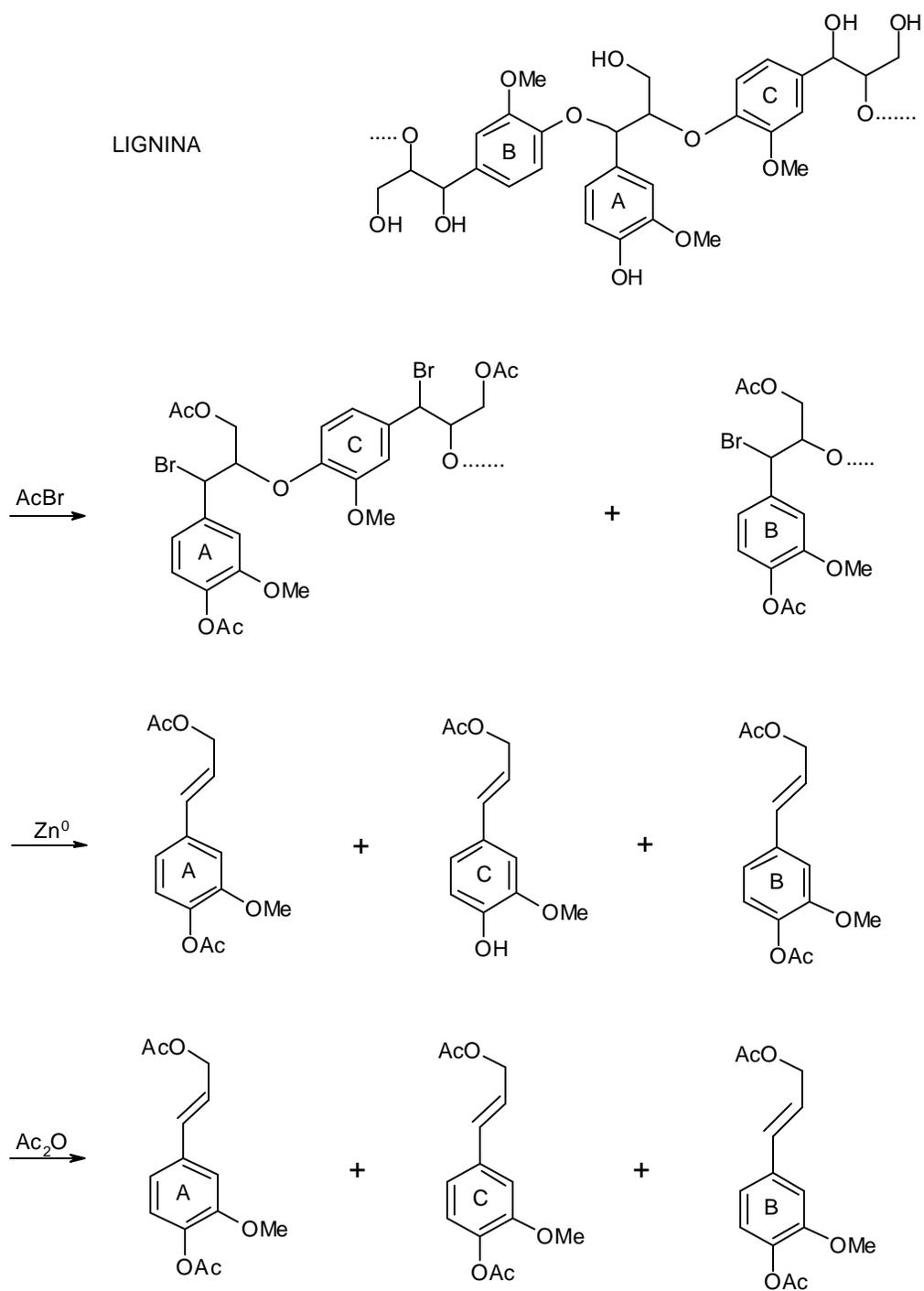


Tabella 3.4: Standard esterni utilizzati per l'analisi quantitativa delle diverse classi di composti identificati mediante GC/MS.

STANDARD	CLASSI DI COMPOSTI
acido grasso C ₁₃ , metil estere	acidi grassi saturi acidi grassi insaturi alcool alcani/alcheni
acido grasso C ₁₆ , metil estere, 16-O-TMS	acidi grassi di + tri - OH acidi grassi ? - OH acidi grassi α + β - OH
acido dicarbossilico C ₂₂ , dimetil estere	acidi α , ? - dicarbossilici
sitosterolo, TMS etere	composti aromatici steroli terpeni

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 Analisi GC/MS

Per le frazioni estratte secondo la procedura descritta nel Capitolo 3, nelle fasi di estrazione dei lipidi liberi, di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e di idrolisi alcalina, si è riscontrata, mediante analisi GC/MS, la separazione di una grande varietà di composti organici. I principali composti identificati nelle frazioni analizzate comprendono acidi mono e di-carbossilici, lineari e ramificati, sia saturi che insaturi, mono, di e tri-idrossiacidi, alcani, alcheni, alcoli, steroli e composti aromatici. La distribuzione delle classi di composti e l'intervallo del numero di atomi di carbonio per ciascuna classe varia a seconda della frazione estratta considerata, come dettagliatamente descritto nei sottoparagrafi seguenti. In generale, comunque, i risultati ottenuti sono comparabili con quelli precedentemente riportati in letteratura per i costituenti monomerici dei biopolimeri, esaminati con metodi diversi quali l'idrolisi alcalina (Bull *et al.*, 2000), la cromatografia liquida ad alta prestazione (Ray *et al.*, 1995) o la termochemolisi con idrossido di tetrametilammonio (del Rio & Hatcher, 1998; Santos Bento *et al.*, 2001).

La procedura analitica di frazionamento, nelle fasi di estrazione dei lipidi liberi, di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e di idrolisi alcalina, è stata replicata per una seconda volta su tutti i campioni presi in esame, al fine di verificarne la riproducibilità,

escluso il caso dell'acido fulvico, su cui la procedura di frazionamento è stata applicata una sola volta. La necessità, dunque, di accertare la riproducibilità e la validità di tale procedura su quest'ultimo campione non consente una trattazione dei risultati estesa come quella riportata per gli altri campioni né la formulazione di alcuna ipotesi. In ogni caso, nel paragrafo 4.1.4 viene riportato il quadro generale dei risultati ottenuti per l'unica replica di acido fulvico esaminata.

4.1.1 Frazione dei lipidi liberi

4.1.1.1 Lipidi liberi nel campione HA Vico

Nel caso della frazione dei lipidi liberi estratti dagli acidi umici del suolo di Vico, secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.1, le classi di composti identificati e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.1* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (484 mg e 493 mg, rispettivamente per la replica 1 e per la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di acido umico da Vico è del 50.96%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, la resa della procedura estrattiva dei lipidi liberi è di 41.11 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 1 e di 79.17 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 2.

La differenza di peso dell'estratto organico totale tra le due repliche è ascrivibile al caricamento su colonna SPE di una quantità eccessiva di estratto organico nel caso della replica 1, con conseguente diminuzione della resa estrattiva. Anche le percentuali relative delle varie classi di composti presentano alcune differenze tra le due repliche: nella replica 1, la classe di composti più abbondante è quella degli acidi

monocarbossilici, di cui l'8% è rappresentato da acidi insaturi, mentre nella replica 2 la classe predominante è quella degli acidi dicarbossilici. Nella replica 2, gli acidi monocarbossilici, di cui solo il 3% è costituito da acidi insaturi, sono presenti in quantità inferiore, mentre si rilevano maggiori quantità di idrossiacidi. In entrambe le repliche di questa frazione non sono stati identificati né steroli né composti aromatici.

Come mostrato in *Figura 4.1* in Appendice 2, gli acidi monocarbossilici identificati vanno da 12 fino a 32 atomi di carbonio, con netta prevalenza degli acidi saturi a 16 e 18 atomi di carbonio. In entrambe le repliche, si nota, per gli acidi con più di 20 atomi di carbonio, la predominanza di quelli con catena a numero pari e, per quelli con meno di 20 atomi di carbonio, la presenza degli acidi ramificati in posizione *iso* ed *anteiso* (Amblès *et al.*, 1994; Grasset & Amblès, 1998).

In *Figura 4.2* in Appendice 2 viene mostrata la distribuzione qualitativa e quantitativa degli acidi dicarbossilici identificati, da 9 a 30 atomi di carbonio, con prevalenza in entrambe le repliche dell'acido a 16 atomi di carbonio, mentre in *Figura 4.3* si riporta la distribuzione degli idrossiacidi, che comprendono i monoidrossiacidi, con il gruppo ossidrilico in posizione α , β oppure ω , da 14 a 26 atomi di carbonio, esclusivamente con catene a numero pari, e gli acidi a 16 e 18 atomi di carbonio, con 2 o 3 gruppi ossidrilici posizionati verso il centro della catena alifatica, in posizione 9 o 10, ed alla fine della catena, in posizione ω . In entrambe le repliche, il composto più abbondante è l'acido 9,10-diidrossiottadecanoico.

Sono state rilevate anche piccole quantità di alcoli, come mostrato in *Figura 4.4* in Appendice 2, con catene da 14 a 28 atomi di carbonio, tutte a numero pari, fatta eccezione per il C₁₅.

4.1.1.2 Lipidi liberi nel campione HUM 1 Vico

Nel caso della frazione dei lipidi liberi estratti, secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.1, dal residuo di suolo di Vico, rimanente dopo l'estrazione degli acidi umici e fulvici (vedi paragrafo 3.2), che a seguire sarà chiamato, per semplicità, *umina*, le classi di composti identificati e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.2* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (1.971 g e 1.970 g rispettivamente per la replica 1 e la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di umina da Vico è del 4.20%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, la resa della procedura estrattiva dei lipidi liberi è molto simile per le due repliche, essendo di 34.90 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 1 e di 35.91 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 2.

La distribuzione delle classi di composti è leggermente differente nelle due repliche: la classe più abbondante è quella degli acidi dicarbossilici nella prima replica e quella dei monocarbossilici nella seconda. Nella seconda replica, inoltre, ci sono quantità maggiori di monoidrossiacidi ed alcoli rispetto alla prima replica. Facendo un confronto con le percentuali relative delle varie classi di composti identificati nella frazione dei lipidi liberi del campione HA Vico, in questo caso si nota la presenza di steroli e composti aromatici, sebbene in quantità limitate.

Dalla *Figura 4.5* in Appendice 2 si può evincere che una grande varietà di acidi monocarbossilici è stata identificata nell'intervallo tra 9 e 30 atomi di carbonio. I composti più abbondanti, in entrambe le repliche, sono gli acidi esadecanoico, ottadecanoico, ottadecanoico, docosanoico e tetracosanoico. Rispetto agli acidi monocarbossilici identificati nei lipidi liberi estratti dall'acido umico, si nota una

presenza più abbondante di acidi insaturi, che rappresentano il 22.7% degli acidi monocarbossilici nella prima replica ed il 20.8% nella seconda.

Gli acidi dicarbossilici presentano, invece, una distribuzione completamente diversa da quella riscontrata per il campione di acido umico: come si può vedere in *Figura 4.6* in Appendice 2, infatti, nel campione di umina c'è una netta predominanza dei composti a catena corta, da 4 a 9 atomi di carbonio, assenti nell'estratto dei lipidi liberi da HA, eccezion fatta per il C₉. Questo determina una sovrastima della quantità totale di acidi dicarbossilici nei lipidi liberi estratti dal campione HUM 1 Vico, dal momento che, in base a delle prove effettuate con concentrazioni note di due acidi dicarbossilici, a 5 e a 22 atomi di carbonio, si è riscontrata una sensibilità strumentale nettamente maggiore per l'acido pentandioico. In tal modo si spiega anche la percentuale relativa di acidi dicarbossilici così alta nella replica 1, dove sono stati identificati composti a catena corta, con valore massimo per il C₉, mentre nella replica 2 l'acido dicarbossilico presente in maggiori quantità è quello a 16 atomi di carbonio e non sono stati identificati acidi con catene alifatiche tra 5 e 8 atomi di carbonio.

In *Figura 4.7* in Appendice 2 è mostrata la distribuzione dei mono, di e tri-idrossiacidi: l'andamento è simile in entrambe le repliche, sebbene nella replica 2 si riscontri una minore quantità di acido 9,10-diidrossiottadecandioico e quantità maggiori degli altri composti, con il massimo per l'acido ?-idrossidocosanoico. Rispetto agli idrossiacidi identificati nella frazione dei lipidi liberi estratta dall'acido umico, oltre alla predominanza dell'acido 9,10-diidrossiottadecandioico, si nota la presenza degli epossiacidi (acido 16-idrossi-9,10-epossiesadecanoico ed acido 18-idrossi-9,10-epossiottadecanoico) e dei monoidrossiacidi con catene a numero dispari ed anche a catena corta (C₇ – C₁₄), sebbene in quantità minime. Infine, è di rilievo anche la

presenza dell'acido ω -idrossiottadecenoico in quantità maggiori rispetto al corrispondente acido saturo.

Per quanto riguarda, poi, gli alcoli, dalla *Figura 4.8* in Appendice 2 si vede che la distribuzione è la stessa nelle due repliche, nell'intervallo tra 10 e 28 atomi di carbonio, con netta prevalenza degli alcoli a catena pari. In entrambe le repliche non è stato possibile determinare con esattezza il numero di atomi di carbonio di un numero limitato di composti (indicato nel grafico come *nd*). Il docosanololo risulta essere il composto più abbondante, diversamente dal caso dei lipidi liberi estratti dall'acido umico, dove l'alcool predominante è l'ottadecanololo. È stato possibile, inoltre, identificare la piccola percentuale di alcani presenti in questa frazione, contrariamente alla frazione dei lipidi liberi del campione HA Vico: in entrambe le repliche del campione HUM 1 Vico sono stati identificati alcani a 16 e da 23 fino a 31 atomi di carbonio. Infine, sono stati rilevati, in quantità equivalenti nelle due repliche, alcuni acidi aromatici, come quello benzoico e quello cinnamico, con 1 o 2 gruppi ossidrilici, in posizione *meta* e *para*, ed alcuni steroli, quali il β -sitosterolo e lo stigmasterolo, del tutto assenti nei lipidi liberi estratti dall'acido umico.

4.1.1.3 Lipidi liberi nel campione HUM 2 Vico

Nel caso della frazione dei lipidi liberi estratti, secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.1, dal residuo di suolo di Vico, rimanente dopo l'estrazione degli acidi umici e fulvici e trattato con HCl/HF (vedi paragrafo 3.2), che a seguire sarà chiamato, per semplicità, *umina trattata*, le classi di composti identificati e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.3* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (1.990 g e 2.000 g, rispettivamente per la replica 1 e la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di umina trattata da Vico è del 13.76%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, la resa della procedura estrattiva dei lipidi liberi è di 51.86 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 1 e di 67.99 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 2.

Sebbene nella replica 2 sia stata estratta ed identificata una maggiore quantità di composti organici rispetto alla replica 1, la distribuzione delle classi nelle due repliche è del tutto analoga, con gli acidi dicarbossilici che rappresentano la stragrande maggioranza dell'estratto, quantità ragguardevoli di acidi monocarbossilici e quantità minori degli altri composti. Se nei lipidi liberi, estratti dall'acido unico, gli acidi mono e di-carbossilici rappresentano all'incirca la metà dell'estratto totale con quantità altrettanto abbondanti di idrossiacidi, nell'umina e soprattutto nell'umina trattata la presenza imponente di acidi mono e di-carbossilici lascia poco spazio agli idrossiacidi e agli altri composti.

Come mostrato in *Figura 4.9* in Appendice 2, sia la replica 1 che la replica 2 presentano una distribuzione di acidi monocarbossilici molto simile a quella riscontrata per la corrispondente classe nei lipidi liberi estratti dal campione HUM 1 Vico. Nell'intervallo tra 9 e 29 atomi di carbonio, i composti più abbondanti, anche in questo caso, sono gli acidi esadecanoico, ottadecenoico, ottadecanoico e, nella replica 1, quelli docosanoico e tetracosanoico. In entrambe le repliche, la percentuale di acidi insaturi è ancora più alta rispetto al campione HUM 1 Vico, con valori del 26.2% nella prima replica e del 27.7% nella seconda.

La distribuzione qualitativa e quantitativa degli acidi dicarbossilici è presentata in *Figura 4.10* in Appendice 2: l'intervallo di composti identificati va da 4 fino a 26

atomi di carbonio, con un piccolo ammontare di composti di cui non è stato possibile determinare con esattezza il numero di atomi di carbonio (indicato nel grafico come *nd*). In entrambe le repliche l'acido più abbondante è quello esadecandioico, ma mentre nella replica 2 ci sono più acidi a catena corta, nella replica 1 predominano quelli a catena più lunga. Di conseguenza, per quanto detto nel sottoparagrafo precedente, si può supporre che la stima quantitativa fatta per la replica 1 sia più realistica di quella fatta per la replica 2.

Per quanto riguarda gli idrossiacidi, come si vede dalla *Figura 4.11* in Appendice 2, l'andamento è lo stesso nelle due repliche, ma con quantità più elevate nella replica 1: in entrambe le repliche, il composto più abbondante è l'acido ?-idrossiottadecenoico, ma sono presenti quantità considerevoli anche degli acidi ?-idrossiesadecanoico, 9,10-diidrossiesadecanoico, 9,10,18-triidrossiottadecanoico ed ?-idrossidocosanoico. Come nel campione HUM 1 Vico, si sono rilevate piccole quantità di epossiacidi e di monoidrossiacidi con catene a numero dispari, mentre è praticamente irrilevante il contributo proveniente dagli idrossiacidi a catena corta.

In *Figura 4.12* in Appendice 2, inoltre, è mostrata la distribuzione degli alcoli, del tutto simile, per entrambe le repliche, a quella del campione HUM 1 Vico, sebbene con un intervallo più ristretto tra 13 e 28 atomi di carbonio. Anche in questo caso, il composto predominante è il docosano e si riscontra una netta prevalenza degli alcoli a catena pari. Diversamente, invece, che per i lipidi liberi estratti dall'umina, nel caso dell'umina trattata non sono stati identificati alcani, ma è stata rilevata solo una traccia di squalene nella prima replica. Infine, gli acidi aromatici e gli steroli rintracciati in quantità minime in questo campione sono gli stessi identificati nel campione HUM 1 Vico.

4.1.2 Frazione dopo transesterificazione

Nel caso del campione HA Vico, la frazione estratta dopo la reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (vedi paragrafo 3.4.2) è stata sottoposta a due differenti procedure di frazionamento: la tradizionale estrazione liquido-liquido e l'estrazione su fase solida (SPE), descritte rispettivamente nei sottoparagrafi 3.4.2.1 e 3.4.2.3. Dati i buoni risultati conseguiti con la procedura SPE, descritti qui di seguito, e dati i vantaggi propri della tecnica stessa, esposti nel sottoparagrafo 3.4.2.2, le frazioni estratte dopo transesterificazione nei campioni HUM 1 Vico e HUM 2 Vico sono state trattate solamente su fase solida.

4.1.2.1 Transesterificato nel campione HA Vico

I risultati ottenuti dal trattamento dell'estratto organico dopo la reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ del campione HA Vico sono mostrati in *Tabella 4.4* in Appendice 2 (Fiorentino *et al.*, 2005). Sia per l'estrazione liquido-liquido sia per l'estrazione su fase solida, si riportano le proporzioni di tutte le classi dei composti identificati relativamente al peso dell'estratto organico totale ed anche la loro distribuzione nelle frazioni alifatica ed aromatica, nel caso dell'estrazione liquido-liquido, e nelle frazioni neutra ed acida, nel caso dell'estrazione SPE. I valori riportati in *Tabella 4.4* rappresentano le medie di tre repliche, con valori di deviazione standard inferiori al 20%.

Dato il peso medio dei campioni di partenza (488.5 mg) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di acido umico da Vico è del 50.96%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, la resa della tradizionale

procedura estrattiva liquido-liquido è di 24.54 mg g⁻¹TOC, mentre quella dell'estrazione su fase solida è di 36.43 mg g⁻¹TOC.

L'applicazione della tecnica SPE porta all'estrazione di una quantità di composti maggiore rispetto all'estrazione liquido-liquido, ma la tipologia dei composti estratti è esattamente la stessa: per entrambe le procedure, all'incirca la metà dei composti identificati in totale sono monoidrossiacidi, più di un quarto sono di e tri-idrossiacidi a 16 e 18 atomi di carbonio e la restante parte è rappresentata da acidi mono e dicarbossilici, alcoli, composti aromatici e quantità limitate di steroli. Non sono stati identificati alcani in alcuna delle due procedure. Nell'ambito dell'estrazione liquido-liquido, l'88% dei composti viene estratto nella frazione alifatica, ma, da un punto di vista qualitativo, la frazione aromatica equivale a quella alifatica, presentando una distribuzione delle classi di composti del tutto analoga. Nel caso dell'estrazione su fase solida, invece, la frazione acida, oltre ad estrarre solo il 5% dei composti estratti in totale, non contiene né α -idrossiacidi né steroli e quasi la metà dei composti è rappresentata da acidi monocarbossilici.

In *Figura 4.13* in Appendice 2 viene riportata la distribuzione degli acidi monocarbossilici. Dal punto di vista quantitativo, il frazionamento SPE è più efficace della procedura tradizionale nell'estrazione di questa classe di composti; a livello qualitativo, invece, non si riscontra alcuna differenza significativa tra i due metodi, con acidi che vanno da 9 a 32 atomi di carbonio, nel caso dell'estrazione liquido-liquido, e da 9 a 29 atomi di carbonio, nel caso dell'estrazione SPE. In entrambi i casi, i composti che prevalgono nettamente sugli altri sono gli acidi esadecanoico ed ottadecanoico, come già verificatosi nella frazione dei lipidi liberi dello stesso campione. Un piccolo

contributo (10.6% nell'estrazione liquido-liquido e 7.2% nell'estrazione su fase solida) è fornito dagli acidi insaturi a 18 e 22 atomi di carbonio.

Anche nel caso degli acidi dicarbossilici (*Figura 4.14* in Appendice 2) il frazionamento SPE è quantitativamente più efficace dell'estrazione liquido-liquido e ci sono poche differenze qualitative: entrambi i metodi di frazionamento sono caratterizzati dalla presenza di acidi dioici a catena corta ($C_8 - C_{10}$) e a catena lunga ($C_{16} - C_{24}$), con la massima quantità rilevata per l'acido esadecandioico. Inoltre, è da notare la presenza degli acidi endecandioico e, nelle frazioni estratte su fase solida, dodecandioico con gruppi ossidrilici in posizione α e β , rispettivamente.

Come mostrato in *Figura 4.15* in Appendice 2, la varietà di idrossiacidi estratti in entrambe le procedure di frazionamento, i cui risultati sono del tutto comparabili per questo gruppo di molecole, è enorme. I composti più abbondanti sono gli acidi 9,10 e 10,18-diidrossiottadecanoico e 9,10,18-triidrossiottadecanoico. Sono state rilevate anche quantità significative di epossiacidi a 16 e 18 atomi di carbonio e di diversi isomeri dell'acido diidrossiesadecanoico e di quello diidrossiottadecandioico. Per quanto riguarda i monoidrossiacidi, si nota la varietà degli acidi ossidrilati in posizione α e β , molto più scarsi nella frazione di lipidi liberi dello stesso campione. La loro distribuzione è caratterizzata da α e β -idrossiacidi tra 12 e 20 atomi di carbonio, con predominanza dei β -idrossiacidi (il composto C_{14} è il più abbondante), e da soli α -idrossiacidi tra 22 e 26 atomi di carbonio. Gli ω -idrossiacidi variano da 8 fino a 26 atomi di carbonio, con catene solo a numero pari, fatta eccezione per il C_9 , e quantità molto elevate di acidi ω -idrossiottadecanoico ed ω -idrossiesadecanoico.

Infine, in *Figura 4.16* in Appendice 2, è riportata la distribuzione degli alcoli, che rappresentano circa il 5% dell'estratto organico totale in entrambe le procedure

analitiche messe a confronto: anche per questa classe di composti la tecnica SPE ha rese estrattive migliori, senza presentare però alcuna differenza qualitativa rispetto all'estrazione liquido-liquido. In entrambi i casi, infatti, gli alcoli identificati hanno un numero di atomi di carbonio compreso tra 12 e 30, con netta prevalenza delle catene pari ed il massimo a 24 e 18. Un gruppo di composti per il quale l'estrazione su fase solida si rivela molto più efficace rispetto all'estrazione liquido-liquido è quello degli acidi aromatici: con la procedura SPE ne vengono estratti $1.75 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$, contro soli $0.47 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ con la procedura tradizionale. Si identificano, in base ai loro spettri di massa, acidi di e tri-idrossibenzenzencarbossilici, *para*, *meta* ed *orto*-idrossicinnamici, mandelici, mono e di-idrossibenzoici. Inoltre, in quantità equivalenti in ambedue gli estratti, si riscontra la presenza di steroli tetraciclici e terpeni pentaciclici, ma non risulta possibile la loro esatta identificazione.

4.1.2.2 *Transesterificato nel campione HUM 1 Vico*

Nel caso dell'umina del suolo di Vico, le classi di composti identificati nell'estratto organico ottenuto dopo la reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.5* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (1.971 g e 1.970 g rispettivamente per la replica 1 e la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di umina da Vico è del 4.20%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, questo passo della procedura di frazionamento permette di estrarre una quantità di composti pari a $54.36 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ nella replica 1 e $87.26 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ nella replica 2.

Dai dati riportati in *Tabella 4.5* si notano alcune differenze tra le due repliche: oltre al peso dell'estratto totale, maggiore nella replica 2, la distribuzione delle classi di composti risulta piuttosto variabile. In entrambe le repliche gli acidi dicarbossilici costituiscono più della metà dei composti identificati, ma nella replica 1 si registrano meno della metà degli acidi di e tri-idrossicarbossilici e più del doppio degli alcani rilevati nella replica 2. Le caratteristiche di questa frazione, con una distribuzione dominata per la maggior parte dagli acidi dicarbossilici e piuttosto mutevole per le altre classi di composti, rimandano ai lipidi liberi estratti dallo stesso campione, più che all'estratto corrispondente del campione di acido umico.

In *Figura 4.17* in Appendice 2 si riporta la distribuzione qualitativa e quantitativa degli acidi monocarbossilici, che in entrambe le repliche vanno da 13 a 30 atomi di carbonio, con il massimo a 16 e 18, similmente a quanto riscontrato già per altri campioni. Rispetto agli acidi monocarbossilici identificati nei lipidi liberi estratti dallo stesso campione, si nota un contributo minore sia da parte degli acidi ramificati in posizione *iso* ed *anteiso*, sia da parte degli acidi insaturi (14.6% degli acidi monocarbossilici totali nella replica 1, 6.8% nella replica 2), in particolare da parte dell'acido ottadecenoico.

Per quanto riguarda gli acidi dicarbossilici (*Figura 4.18* in Appendice 2), le due repliche mostrano andamenti molto simili, anche a livello quantitativo. I composti più abbondanti sono quelli a 9 e a 16 atomi di carbonio, in un ampio intervallo che parte dall'acido 2,3-diidrossibutandioico fino ad arrivare, sebbene in maniera discontinua, all'acido esacosandioico, comprendendo anche acidi insaturi ed ossidrilati, questi ultimi già incontrati nel transesterificato dell'acido umico.

La distribuzione degli idrossiacidi, mostrata in *Figura 4.19* in Appendice 2, è molto simile, per la varietà dei composti identificati, a quella descritta nel sottoparagrafo precedente per l'acido umico. In questo caso, però, in entrambe le repliche, le quantità dei di e tri-idrossiacidi, in particolare degli acidi 10,16-diidrossiesadecanoico e 9,10-diidrossiottadecandioico, sono ancora maggiori rispetto ai monoidrossiacidi, di cui i composti più abbondanti sono l'acido α -idrossiesadecanoico, α -idrossiottadecenoico e β -idrossiottadecanoico.

Inoltre, le quantità di alcoli in questa frazione sono più basse rispetto a quelle trovate nei lipidi liberi del campione HUM 1 Vico, ma anche in questo caso, come mostrato nella *Figura 4.20* in Appendice 2, l'intervallo di distribuzione è ampio, tra 7 e 28 atomi di carbonio con prevalenza degli alcoli a catena pari. Il docosanol e l'ottadecanol sono gli alcoli più abbondanti in entrambe le repliche. Si nota che, anche per questa classe di composti, nella replica 2 ne vengono estratti di più, a livello sia qualitativo che quantitativo.

Da non trascurare sono anche gli alcani e gli alcheni identificati in entrambe le repliche (*Figura 4.21* in Appendice 2): gli alcani sono uguali a quelli identificati nella frazione di lipidi liberi dello stesso campione, da 23 fino a 31 atomi di carbonio, e sono più abbondanti nella replica 2, mentre molto più abbondanti nella replica 1 sono gli alcheni, da 14 a 20 atomi di carbonio, non trovati finora in alcun altro campione. Infine, gli steroli sono presenti in quantità minime in entrambe le repliche, mentre i composti aromatici rappresentano percentuali consistenti dell'estratto totale: vengono identificati, in base ai loro spettri di massa, acidi *para*, *meta* ed *orto*-idrossicinnamici, di e tri-idrossimandelici, mono e di-idrossibenzoici e benzenacetici.

4.1.2.3 Transesterificato nel campione HUM 2 Vico

Nel caso dell'umina trattata del suolo di Vico, le classi di composti identificati nell'estratto organico ottenuto dopo la reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.6* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (1.990 g e 2.000 g, rispettivamente per la replica 1 e la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di umina trattata da Vico è del 13.76%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, questo passo della procedura di frazionamento permette di estrarre una quantità di composti pari a $53.46 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ nella replica 1 e $50.94 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ nella replica 2.

Le due repliche stavolta presentano valori abbastanza congruenti tra loro, con differenze solo nelle quantità rintracciate di α -idrossiacidi, alcani e composti aromatici, leggermente più abbondanti nella replica 2, a discapito degli acidi dicarbossilici. In ogni caso, comunque, in entrambe le repliche gli acidi dicarbossilici rappresentano la maggioranza dei composti identificati, così come per il transesterificato dell'umina non trattata e per i lipidi liberi dell'umina trattata. In questo campione, però, i di e tri-idrossiacidi a 16 e 18 atomi di carbonio sono molto più abbondanti, rappresentando il 16% circa dell'estratto totale.

La distribuzione degli acidi monocarbossilici, mostrata in *Figura 4.22* in Appendice 2, copre l'intervallo tra 13 e 29 atomi di carbonio, con valori massimi a 16 e 18, per entrambe le repliche, e a 13 per la replica 2. Come già notato per il campione HUM 1 Vico, anche in questo caso il contributo degli acidi insaturi nell'ambito di questa classe di composti è minore rispetto a quello riscontrato nella frazione dei lipidi

liberi estratti dallo stesso campione (7.7% e 4.8% nel transesterificato contro 26.2% e 27.7% nei lipidi liberi, rispettivamente nella replica 1 e nella replica 2).

Anche per gli acidi dicarbossilici, come si vede in *Figura 4.23* in Appendice 2, la distribuzione è simile a quella del transesterificato del campione HUM 1 Vico, per la presenza di acidi dioici a catena corta, insaturi e con gruppi ossidrili in posizione α o β . Tuttavia, contrariamente a quanto visto per quel campione e per i lipidi liberi del campione HUM 2 Vico, il composto più abbondante, almeno nella replica 1, non è l'acido esadecandioico, bensì l'acido β -idrossidodecandioico.

Per quanto riguarda gli idrossiacidi (*Figura 4.24* in Appendice 2), la molteplicità di composti identificati è quella caratteristica degli idrossiacidi presenti nei transesterificati degli altri due campioni analizzati. Come per l'umina non trattata, i composti più abbondanti sono gli acidi 9,10-diidrossiottadecandioico e 10,16-diidrossiesadecanoico, tanto che le loro quantità sono riportate nel grafico divise rispettivamente per 10 e per 4, per renderle comparabili a quelle degli altri composti di questa classe. I monoidrossiacidi, sebbene presenti in quantità minori, mostrano una grande varietà: gli α e β -idrossiacidi vanno da 6 fino a 28 atomi di carbonio, con il massimo registrato per l'acido β -idrossiottadecanoico nella replica 1 e quantità leggermente superiori di acido α -idrossitetracosanoico nella replica 2; gli ω -idrossiacidi, invece, vanno da 9 a 26 atomi di carbonio, con quantità molto elevate in entrambe le repliche di acido ω -idrossiottadecanoico, conformemente a quanto visto per i lipidi liberi dello stesso campione e per le frazioni transesterificate degli altri campioni.

Analogie con tali campioni si riscontrano anche per gli alcoli (*Figura 4.25* in Appendice 2), da 7 a 30 atomi di carbonio, con prevalenza delle catene pari e con quantità massime di ottodecanolo nella replica 1 e di docosanolo nella replica 2. Gli

alcani (C₂₃ – C₃₁), invece, sono presenti in quantità minori rispetto a quelli identificati nella frazione transesterificata dell'umina e gli alcheni sono del tutto assenti. Infine, anche stavolta gli steroli sono presenti in quantità minime in entrambe le repliche e la loro identificazione non risulta chiara, mentre i composti aromatici riconosciuti, in quantità considerevoli, sono acidi *para*, *meta* ed *orto*-idrossicinnamici, di e tri-idrossimandelici, mono e di-idrossibenzoici e benzenacetici.

4.1.3 Frazione dopo idrolisi alcalina

4.1.3.1 Idrolizzato nel campione HA Vico

Nel caso della frazione estratta dopo l'idrolisi alcalina dall'acido umico del suolo di Vico, secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.3, le classi di composti identificati e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.7* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (484 mg e 493 mg, rispettivamente per la replica 1 e per la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di acido umico da Vico è del 50.96%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, l'idrolisi alcalina a questo punto della procedura di frazionamento consente di estrarre ed identificare 5.47 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 1 e 2.55 mg g⁻¹_{TOC} nella replica 2.

Le differenze riscontrate nelle due repliche sono notevoli: oltre al fatto che l'estratto nella prima replica è circa il doppio di quello nella seconda, anche la distribuzione delle varie classi di composti risulta variabile. Nella replica 1 i composti più abbondanti sono gli acidi monocarbossilici, mentre nella replica 2 sono gli ? -

idrossiacidi. Inoltre, nella replica 2 non si sono trovati *a*-idrossiacidi, i quali nella replica 1 corrispondono, invece, al 15% circa. In effetti, se nella replica 1 un 40% dell'estratto totale è rappresentato da acidi mono e di-carbossilici e un altro 40% da idrossiacidi, nella replica 2 c'è un 47% circa di idrossiacidi, in cui gli unici monoidrossiacidi sono quelli sostituiti in posizione ?, ed un 26% circa di acidi mono e di-carbossilici. Inoltre, si sono riscontrate quantità maggiori di alcani e di composti aromatici e quantità minori di alcoli rispetto alla replica 1.

Gli acidi monocarbossilici, più abbondanti nella replica 1, come mostrato in *Figura 4.26* in Appendice 2, coprono un ampio intervallo tra 9 e 34 atomi di carbonio ed i rappresentanti più copiosi per questa classe di composti sono, come al solito, gli acidi a 16 e 18 atomi di carbonio. Il contributo degli acidi insaturi resta piuttosto basso come nelle altre frazioni estratte da questo campione (5.9% e 7.2%, rispettivamente nella replica 1 e nella replica 2).

La distribuzione degli acidi dicarbossilici, riportata in *Figura 4.27* in Appendice 2, è caratterizzata dalla presenza di acidi a catena corta ($C_5 - C_{16}$ nella replica 1 e solo $C_5 - C_7$ nella replica 2), con il massimo a 9 e a 6 atomi di carbonio, rispettivamente nella prima e nella seconda replica. Sebbene ricoprono un intervallo così limitato, specialmente nella replica 2, gli acidi dicarbossilici non rappresentano una percentuale bassa rispetto al peso dell'estratto totale, a causa della possibile sovrastima che si fa dei membri a catena corta di questa classe, per quanto spiegato in precedenza nel sottoparagrafo 4.1.1.2.

La *Figura 4.28* in Appendice 2 mostra, invece, la distribuzione degli idrossiacidi, meno variegata rispetto alle altre frazioni estratte dall'acido umico: l'andamento è uniforme nelle due repliche per quanto concerne i di e tri-idrossiacidi a

18 atomi di carbonio, eccezion fatta per l'acido 9,18-diidrossiottadecanoico, presente in abbondanza solo nelle replica 1. La situazione è molto differente, invece, per quanto riguarda i monoidrossiacidi: nella replica 1, vengono identificati sia *a*-idrossiacidi, con il massimo a 24 atomi di carbonio, sia ω -idrossiacidi, con il massimo a 16 atomi di carbonio, mentre nella replica 2 si registrano solo ω -idrossiacidi.

Inoltre, si è riscontrata la presenza di alcoli in entrambe le repliche, ma in quantità maggiori nella replica 1 (*Figura 4.29* in Appendice 2). La loro distribuzione è limitata da 12 a 28 atomi di carbonio, con prevalenza delle catene pari e con quantità massime di docosanolo nella replica 1 e di ottadecanolo nella replica 2. Per quanto riguarda gli alcani, poi, nella replica 2 se ne trovano quantità notevoli, ma non risulta possibile il loro riconoscimento esatto. Infine, i composti aromatici identificati sono gli stessi già incontrati nelle frazioni analizzate in precedenza e tra gli steroli si distingue la presenza del β -sitosterolo e del colesterolo.

4.1.3.2 Idrolizzato nel campione HUM 1 Vico

Nel caso della frazione estratta dopo l'idrolisi alcalina dall'umina del suolo di Vico, secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.3, le classi di composti identificati e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.8* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (1.971 g e 1.970 g rispettivamente per la replica 1 e la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di umina da Vico è del 4.20%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, l'idrolisi alcalina a questo punto della procedura di frazionamento

consente di estrarre ed identificare 6.64 mg g⁻¹TOC nella replica 1 e 7.61 mg g⁻¹TOC nella replica 2.

Le due repliche risultano concordanti per quanto riguarda il peso dell'estratto organico totale. Inoltre, in entrambe le repliche, la classe prevalente è quella degli acidi dicarbossilici, come del resto visto anche per le altre frazioni di questo campione; acidi monocarbossilici ed alcoli sono le classi più abbondanti successive, mentre una differenza si riscontra per i di e tri-idrossiacidi, molto più numerosi nella replica 1 che non nella 2. Rispetto alla frazione estratta dopo idrolisi dall'acido umico, si nota una diminuzione delle quantità di monoidrossiacidi ricavabili dal campione HUM 1 Vico.

In *Figura 4.30* in Appendice 2, è mostrata la distribuzione qualitativa e quantitativa degli acidi monocarbossilici. Sebbene le rese estrattive della replica 2 siano leggermente più alte, le due repliche hanno andamenti simili, comparabili con quelli della stessa classe di composti nelle altre frazioni: nell'intervallo tra 13 e 30 atomi di carbonio, il composto più abbondante è l'acido esadecanoico, ma si nota un contributo particolarmente alto da parte degli acidi insaturi (21.9% nella prima replica e 32.5% nella seconda).

Gli acidi dicarbossilici (*Figura 4.31* in Appendice 2) ricoprono un intervallo ancora più limitato di quello registrato per l'estratto dopo idrolisi del campione di acido umico (C₄ – C₉), con valori massimi per l'acido β-idrossiesandioico nella replica 1 e butandioico nella replica 2. Nonostante la scarsa varietà di tali composti, le loro quantità risultano superiori rispetto a quelle delle altre classi, a causa della sovrastima degli acidi dicarbossilici a catena corta di cui già discusso precedentemente.

Per quanto riguarda gli idrossiacidi, la cui distribuzione è mostrata in *Figura 4.32* in Appendice 2, si nota innanzitutto la presenza in entrambe le repliche di

diidrossiacidi a 4 e a 6 atomi di carbonio e poi la presenza di grandi quantità di diidrossiacidi a 18 atomi di carbonio solamente nella replica 1, tanto che nella replica 1 il composto più abbondante è l'acido 9,10-diidrossiottadecandioico, del tutto assente nella replica 2. Tra i monoidrossiacidi, prevalgono quelli con il gruppo ossidrilico in posizione 9, a 16 atomi di carbonio nella replica 1 e a 9 nella replica 2. Come per gli idrossiacidi identificati nella frazione estratta dopo idrolisi del campione HA Vico, la diversità di questa classe di composti è bassa se paragonata a quella degli idrossiacidi identificati nelle frazioni estratte dopo transesterificazione degli stessi campioni, specialmente in riferimento ai monoidrossiacidi.

La *Figura 4.33* in Appendice 2 mostra, inoltre, la distribuzione degli alcoli nelle due repliche, che si differenzia da quella degli alcoli identificati nelle altre frazioni analizzate finora solo per la presenza del pentandiolo e del pentantriolo, il primo dei quali è il composto più abbondante. Infine, anche in questa frazione estratta dall'umina si è registrata la presenza di piccole quantità di alcani ed alcheni, dei quali soltanto ottadecene, eicosene e squalene sono stati identificati in maniera univoca, di steroli e di composti aromatici, uguali a quelli riconosciuti nelle altre frazioni.

4.1.3.3 Idrolizzato nel campione HUM 2 Vico

Nel caso della frazione estratta dopo l'idrolisi alcalina dall'umina trattata del suolo di Vico, secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.3, le classi di composti identificati e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, sono riportate nella *Tabella 4.9* in Appendice 2.

Dato il peso dei campioni di partenza (1.990 g e 2.000 g, rispettivamente per la replica 1 e la replica 2) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%)

del campione di umina trattata da Vico è del 13.76%, come riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, l'idrolisi alcalina a questo punto della procedura di frazionamento consente di estrarre ed identificare $3.10 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ nella replica 1 e $3.71 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ nella replica 2.

Le due repliche, pur presentando una leggera variabilità, possono considerarsi congruenti tra loro: come nella frazione estratta dopo idrolisi alcalina dal campione HUM 1 Vico, anche in quella estratta dal campione HUM 2 Vico gli acidi monocarbossilici, più abbondanti nella replica 1, e quelli dicarbossilici, più abbondanti nella replica 2, rappresentano la maggior parte dei composti identificati, con quantità rilevanti di alcoli ed in questo caso ancora più basse di idrossiacidi.

Nella *Figura 4.34* in Appendice 2 è mostrata la distribuzione degli acidi monocarbossilici nelle due repliche: l'andamento è lo stesso, anche se nella replica 1 si estraggono quantità di composti generalmente maggiori. L'intervallo va da 10 fino a 32 atomi di carbonio e l'acido esadecanoico è ancora una volta il più abbondante. Anche in questo caso, l'apporto di acidi insaturi è notevole (36.3% nella prima replica e 41.3% nella seconda), con una varietà di acidi mai registrata prima. Infatti, oltre agli acidi insaturi a 16 e 18 atomi di carbonio, sempre presenti, sebbene non in quantità così elevate, in questo campione si identificano acidi insaturi in tutto l'intervallo tra 14 e 22 atomi di carbonio, in discrete quantità.

Anche gli acidi dicarbossilici, come si vede in *Figura 4.35* in Appendice 2, hanno una distribuzione molto simile a quelli identificati nella frazione estratta dopo idrolisi del campione HUM 1 Vico, con un intervallo molto ristretto, tra C_4 e C_9 ed il C_{16} presente solo nella replica 2. Anche in questo caso, il composto più abbondante è un acido dioico ossidrillato a catena corta.

Per quanto riguarda gli idrossiacidi (*Figura 4.36* in Appendice 2), in questo campione, come nel precedente, si nota la presenza di diidrossiacidi a catena corta. L'acido più abbondante in assoluto è il 9,10-diidrossiottadecanoico, mentre, limitatamente ai monoidrossiacidi, è l' ω -idrossiottadecenoico, in entrambe le repliche, in un ampio intervallo tra 4 e 26 atomi di carbonio, con netta prevalenza dei composti a catena pari.

Tra gli alcoli identificati nelle due repliche e mostrati in *Figura 4.37* in Appendice 2, si ripete la presenza del pentandiolo e del pentantriolo, in quantità però minori rispetto al campione precedente, per cui il rappresentante più copioso di questa classe di composti è, in entrambe le repliche, il docosano, come evidenziato per le altre frazioni di questo campione. Infine, nelle due repliche sono presenti, in proporzioni simili a quelle del campione HUM 1 Vico, i composti aromatici solitamente identificati, particolarmente abbondanti nella replica 2, alcuni steroli e parecchi alcani, di cui però non si distingue il numero di atomi di carbonio, mentre l'unico alchene trovato è lo squalene.

4.1.4 Frazionamento del campione FA Vico

In *Tabella 4.10* in Appendice 2 sono riportate le classi di composti identificati e le proporzioni di ciascuna classe, relativamente al peso dell'estratto organico totale, per le tre frazioni organiche dell'acido fulvico estratto dal suolo di Vico, separate nelle fasi di estrazione dei lipidi liberi, di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e di idrolisi alcalina.

Dato il peso del campione di partenza (1.958 g) e considerato che la percentuale di C organico totale (TOC%) del campione di acido fulvico da Vico è del 18.29%, come

riportato nella *Tabella 3.2* in Appendice 1, la resa della procedura estrattiva dei lipidi liberi risulta essere di $1.70 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$, quella del processo di transesterificazione è di $15.30 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$ e quella della reazione di idrolisi alcalina è di $0.78 \text{ mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$.

Tutte e tre le frazioni dell'acido fulvico sono dominate in maniera molto netta dalle classi di acidi mono e di-carbossilicic e la scarsità degli idrossiacidi è evidente se si fa un confronto con i dati ottenuti per le frazioni degli altri campioni. L'unica altra classe di composti più abbondante è quella degli alcoli nella frazione organica separata dopo l'idrolisi alcalina.

Tuttavia, la mancanza di una seconda replica impedisce di avvalorare i risultati ottenuti e rende inconsistente anche la valutazione della variabilità dei prodotti identificati nell'ambito delle singole classi di composti. Di conseguenza, qualsiasi considerazione sull'applicabilità agli acidi fulvici della procedura di frazionamento sviluppata deve essere posticipata al momento in cui verranno fatte altre repliche.

4.1.5 Frazione dopo acido iodidrico

Il trattamento con acido iodidrico, descritto nel paragrafo 3.4.4, è stato applicato, oltre che ad almeno un residuo solido rimanente dopo idrolisi alcalina di ciascun campione considerato finora (HA Vico, HUM 1 Vico, HUM 2 Vico), anche al residuo solido ottenuto dopo l'intera procedura di frazionamento di un campione di acido umico estratto dal suolo di Portici. In tutti i casi, l'analisi GC/MS dell'estratto organico non ha dato i risultati sperati ed i propionati degli alcool corrispondenti agli ioduri formati dagli eteri di partenza non sono stati affatto rilevati. Tuttavia, la conferma dell'avvenuta rottura dei legami eteri nei residui si trova negli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR, mostrati in seguito nel paragrafo 4.5.

4.1.6 Frazioni derivanti daltrattamento del residuo finale

Il residuo finale dell'acido umico estratto dal suolo di Vico è stato sottoposto ad una serie di trattamenti, accuratamente descritti nel paragrafo 3.4.5, da cui derivano diverse frazioni organiche che sono state analizzate mediante GC/MS. Innanzitutto, negli estratti in toluene ed acetato di etile (sottoparagrafo 3.4.5.1) sono presenti quantità molto basse di alcoli ed acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, esclusivamente a 16 e 18 atomi di carbonio. Anche le analisi GC/MS di alcune delle cinque frazioni estratte su fase solida (sottoparagrafo 3.4.5.2) danno risultati simili, ma le quantità di composti identificati sono ancora più basse. La presenza di tali composti in queste frazioni può considerarsi irrilevante, data la loro natura ubiquitaria e l'impossibilità di ricavarne informazioni utili. Le analisi dei residui derivatizzati secondo quanto descritto nel sottoparagrafo 3.4.5.3 non danno alcun risultato, così come del tutto fallimentare si è rivelata l'analisi GC/MS della frazione organica ottenuta secondo il metodo DFRC (sottoparagrafo 3.4.5.4).

4.1.7 Efficienza complessiva della procedura di frazionamento

La *Tabella 4.11* in Appendice 2 fornisce un riepilogo dei dati forniti nei paragrafi precedenti, mostrando, per ciascun campione, escluso quello dell'acido fulvico, i valori mediati su due repliche dei pesi, espressi sia in μg sia in $\mu\text{g g}^{-1}_{\text{TOC}}$, degli estratti totali e delle singole classi di composti identificati nelle frazioni ottenute dopo ciascun passo della procedura analitica di frazionamento. Per quanto riguarda i pesi degli estratti totali, le deviazioni standard sono inferiori al 20%, esclusi i casi dei lipidi liberi e della frazione dopo idrolisi alcalina dell'acido umico ed il caso della frazione

dopo transesterificazione dell'umina. Nel caso delle singole classi di composti, le deviazioni standard sono in alcuni casi più alte, data la variabilità descritta nei paragrafi precedenti.

In *Figura 4.38* in Appendice 2 si riportano i cromatogrammi corrispondenti ai tre passi della procedura di frazionamento del campione di acido umico estratto dal suolo di Vico, al fine di evidenziare la grande varietà di composti estratti in tutte le frazioni e di sottolineare le differenze tra loro. Nel caso della reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, vengono mostrati sia i cromatogrammi delle frazioni alifatica ed aromatica, derivanti dall'estrazione liquido-liquido convenzionale, sia quelli delle frazioni neutra ed acida, derivanti dall'estrazione su fase solida, di cui ampiamente discusso nel sottoparagrafo *4.1.2.1*. Per il campione di acido umico, i composti identificati nella frazione dei lipidi liberi costituiscono il 6.0% del carbonio organico totale presente nel campione di partenza, quelli identificati nella frazione organica ottenuta dopo la reazione di transesterificazione e sottoposta ad estrazione su fase solida ne rappresentano il 3.6% e quelli dopo l'idrolisi alcalina solo lo 0.4%.

In *Figura 4.39* in Appendice 2 si riportano i cromatogrammi corrispondenti ai tre passi della procedura di frazionamento del campione di umina estratta dal suolo di Vico. Anche in questo caso è possibile notare la grande varietà di composti estratti in tutte le frazioni. Per questo campione, i composti identificati nella frazione dei lipidi liberi costituiscono il 3.5% del carbonio organico totale presente nel campione di partenza, quelli identificati nella frazione organica ottenuta dopo la reazione di transesterificazione ne rappresentano il 7.1% e quelli dopo l'idrolisi alcalina solo lo 0.7%.

In *Figura 4.40* in *Appendice 2* si riportano, infine, i cromatogrammi corrispondenti ai tre passi della procedura di frazionamento del campione di umina trattata (HUM 2) estratta dal suolo di Vico, con caratteristiche generalmente simili a quelle dei cromatogrammi mostrati per gli altri campioni. In questo caso, i composti identificati nella frazione dei lipidi liberi costituiscono il 6.0% del carbonio organico totale presente nel campione di partenza, quelli identificati nella frazione organica ottenuta dopo la reazione di transesterificazione ne rappresentano il 5.2% e quelli dopo l'idrolisi alcalina solo lo 0.3%. Quindi, solamente nel caso del campione di umina la frazione estratta dopo la reazione di transesterificazione permette di rilevare una quantità di composti maggiore rispetto alla frazione di lipidi liberi, contrariamente a quanto accade per l'acido umico e l'umina trattata. La frazione estratta dopo idrolisi alcalina si presenta invece in tutti i casi molto più povera rispetto alle altre.

4.2 Pirolisi-GC/MS

I dati qualitativi forniti dalla pirolisi, effettuata in presenza di idrossido di tetrametilammonio (TMAH) sulle frazioni acquose e sui residui solidi finali derivanti dai vari passaggi della procedura analitica di frazionamento delle sostanze umiche, forniscono valide informazioni strutturali. I prodotti di pirolisi riconosciuti comprendono diverse tipologie di composti, analogamente a quanto riportato in letteratura (Martín *et al.*, 1994; Martín *et al.*, 1995; del Rio & Hatcher, 1998; Santos Bento *et al.*, 2001; Nierop, 2001; Nierop *et al.*, 2001). Vengono identificati composti alifatici, composti aromatici, composti contenenti azoto e, sebbene in quantità minime, composti di origine polisaccaridica. Alcuni dei prodotti di pirolisi identificati sono elencati in *Tabella 4.12*.

In *Figura 4.41* in Appendice 2 sono mostrati i pirogrammi delle frazioni acquose che derivano dal trattamento successivo alla reazione di transesterificazione dei campioni di acido umico, acido fulvico, umina ed umina trattata, estratti dal suolo di Vico. I quattro campioni considerati sono caratterizzati dalla presenza di una grande abbondanza di composti alifatici: metil esteri di acidi monocarbossilici ($C_7 - C_{18}$, sia saturi che insaturi) e di acidi dicarbossilici ($C_4 - C_9$, di cui una piccola parte insaturi), coppie di alcheni ed alcani ($C_{12} - C_{23}$) ed alcheni a catena corta. Nella frazione acquosa dell'acido umico, però, sono stati riscontrati intervalli più ampi: acidi monocarbossilici saturi fino a 28 atomi di carbonio ed insaturi fino a 25 atomi di carbonio, acidi dicarbossilici tra 4 e 24 atomi di carbonio, coppie di alcheni ed alcani fino a 28 atomi di carbonio ed anche alcani a catena più lunga. L'insieme di questi composti rappresenta in ciascun campione il 60% circa dei composti identificati (valore calcolato sull'area dei picchi cromatografici). Il restante 40% è costituito da composti aromatici, quali alchilbenzeni, fenoli ed alchilfenoli, acidi benzoici, mono e di-metossibenzoici, idrocarburi ad anelli benzenici condensati (naftalene, antracene), composti contenenti azoto, quali amminoacidi (prolina), ammine eterocicliche (imidazoli, pirroli, pirimidine, piridine, pirrolidine) ed altri composti aromatici contenenti azoto (indoli, benzonitrili, benzendiammine, chinoline) e loro derivati. Sono presenti anche alcuni composti che derivano dai furani, a cui viene attribuita un'origine polisaccaridica (Nierop, 2001).

Come mostrato in *Figura 4.42* in Appendice 2, la stessa tipologia di composti si identifica anche nei pirogrammi dei residui solidi derivanti dalla reazione di idrolisi alcalina dei quattro campioni di sostanze umiche estratte dal suolo di Vico sopra considerati. Anche in questo caso, come già visto per la frazione acquosa, il residuo dell'acido umico contiene composti alifatici a catena decisamente più lunga rispetto ai

residui degli altri campioni: acidi monocarbossilici saturi tra 8 e 30 atomi di carbonio ed insaturi fino a 25 atomi di carbonio, acidi dicarbossilici tra 4 e 24 atomi di carbonio, coppie di alcheni ed alcani fino a 28 atomi di carbonio ed alcani a catena più lunga, contro catene alifatiche di massimo 18 atomi di carbonio identificate nei residui degli altri campioni. In ogni modo, per ognuno dei quattro residui derivanti dalla reazione di idrolisi alcalina, la percentuale relativa dei composti aromatici aumenta notevolmente rispetto a quella calcolata per le frazioni acquose e, in questo caso, più della metà dei composti identificati è costituita dall'insieme di composti aromatici ed azotati, dello stesso tipo rilevato per le frazioni acquose.

In *Figura 4.43* in Appendice 2, infine, vengono riportati i pirogrammi dei residui solidi finali, rimanenti dopo la reazione con acido iodidrico, dei campioni di acido umico, umina ed umina trattata estratti dal suolo di Vico. Come nel caso dei residui separati dopo idrolisi alcalina, anche nel caso dei residui dopo trattamento con acido iodidrico dei tre campioni presi in esame, i composti azotati ed aromatici, ampiamente variegati, prevalgono su quelli alifatici, che, stavolta anche nel residuo dell'acido umico, non vanno oltre catene a 16 atomi di carbonio.

4.3 Analisi ESI/MS

4.3.1 Spettri di massa ESI per infusione diretta

La tecnica ESI/MS dà rilevanti informazioni circa la distribuzione dei pesi molecolari medi pesati e numerici dei campioni, contribuendo a caratterizzare la struttura chimica dei blocchi molecolari costituenti il materiale organico di partenza.

Una prima serie di analisi ESI/MS è stata fatta utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di acetato di ammonio 0.1 M/acetone nitrile ed iniettando 20 μL , 40 μL e 60 μL di ciascun campione per infusione diretta nella sorgente ionica, operante in modalità negativa.

In *Figura 4.44* in Appendice 2 sono mostrati a titolo esemplificativo gli spettri di massa del campione HA Vico tal quale, ottenuti per infusione diretta dei tre volumi di campione, con voltaggio di cono impostato a -150 V. Spettri analoghi sono stati ottenuti anche a -90 V. Si osserva una distribuzione continua di picchi per ogni valore di m/z , similmente a quanto già osservato per le sostanze uniche (Piccolo & Spiteller, 2003; Reemtsma & These, 2003; These & Reemtsma, 2003), con la presenza di tre gobbe più o meno distinte, a seconda dell'intensità degli spettri. Inoltre, si può notare che, aumentando la quantità di campione iniettato, aumenta l'intensità relativa dello spettro, passando da 1.22×10^4 per 20 μL , a 2.58×10^4 per 40 μL , fino a 4.60×10^4 per 60 μL . Andamenti del tutto simili a quelli riportati in *Figura 4.44* hanno mostrato anche gli spettri di massa delle varie frazioni del campione HA Vico analizzate nelle stesse condizioni sopra descritte. L'unico campione che ha prodotto uno spettro differente (*Figura 4.45* in Appendice 2) è la frazione acquosa separata dopo il trattamento con acido iodidrico. Lo spettro, in tal caso, presenta picchi distinti separati da intervalli di 142 unità, attribuibili ad artefatti. Per tale campione, dunque, la valutazione dei pesi molecolari medi non è significativa.

I valori dei pesi molecolari medi numerici (M_n) e ponderali (M_w), espressi in Daltons, calcolati per i campioni analizzati nelle condizioni sopra esposte, sono schematizzati in *Tabella 4.13*. I valori di M_n e di M_w calcolati per l'acido unico tal quale sono dello stesso ordine di grandezza di quelli riportati in letteratura per acidi

umici estratti da suolo (Piccolo & Spiteller, 2003) e per sostanze umiche di origine acquatica (Klaus *et al.*, 2000; Brown & Rice, 2000). I valori ottenuti a -150 V sono leggermente più bassi di quelli ottenuti a -90 V, esclusi i casi del residuo finale derivante dal trattamento con HI e della seconda replica a 40 µL della frazione acquosa separata dopo la reazione di transesterificazione. Per tutti i campioni analizzati, sia a -90 V che a -150 V, gli andamenti di M_n e di M_w sono decrescenti all'aumentare del volume di campione iniettato. Si nota, inoltre, che i pesi molecolari medi aumentano passando dal tal quale al residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina e poi al residuo finale, man mano, quindi, che la procedura di frazionamento va avanti. Anche la frazione acquosa separata dopo la reazione di transesterificazione presenta valori di M_n e M_w maggiori rispetto al campione tal quale. Infine, laddove il trattamento della procedura di frazionamento è stato ripetuto su due repliche, le analisi ESI/MS delle frazioni presenti in duplicato mostrano una buona riproducibilità.

Una seconda serie di analisi ESI/MS è stata fatta utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di ammoniaca 0.05%/acetonitrile ed iniettando 40 µL di ciascun campione per infusione diretta nella sorgente ionica, operante in modalità negativa, con voltaggio di cono settato a -90 V e a -150 V. L'intensità degli spettri ottenuti con questo solvente è molto più alta rispetto a quella ottenuta con la soluzione acquosa 9:1 (v/v) di acetato di ammonio 0.1 M/acetonitrile. Come mostrato in *Figura 4.46* in Appendice 2, la differenza d'intensità relativa dei cromatogrammi e dei corrispondenti spettri di massa, ottenuti con i due diversi solventi per lo stesso campione di acido umico tal quale, è di un ordine di grandezza (passando nei cromatogrammi da 5.78×10^7 con il primo solvente a 1.39×10^8 con il secondo e negli spettri da 2.71×10^4 a 1.25×10^5). Un'altra differenza che si osserva tra i

cromatogrammi relativi ai due solventi utilizzati è la presenza di un picco secondario nel caso della soluzione acquosa di ammoniaca. Tuttavia, essendo lo spettro di massa del picco secondario del tutto identico allo spettro del picco principale, si è considerato il secondo picco come una spalla del primo.

Come osservato nel caso della soluzione acquosa di acetato di ammonio ed acetonitrile, anche nel caso della soluzione acquosa di ammoniaca ed acetonitrile gli spettri di massa di tutti i campioni analizzati, sia a -90 V sia a -150 V, sono caratterizzati da una distribuzione continua di picchi, con la formazione di tre gobbe distinte, ad eccezione della frazione acquosa separata dopo il trattamento con acido iodidrico, il cui spettro presenta le stesse caratteristiche descritte per lo spettro mostrato in *Figura 4.45*.

I valori dei pesi molecolari medi numerici (M_n) e ponderali (M_w), espressi in Daltons, calcolati per i campioni analizzati nelle condizioni sopra esposte, sono schematizzati in *Tabella 4.14*. Oltre all'acido umico estratto dal suolo di Vico ed alle sue frazioni, sono stati analizzati anche l'acido umico estratto dal suolo di Portici e le relative frazioni e l'acido fulvico estratto dal suolo di Vico e la sua frazione acquosa separata dopo la reazione di transesterificazione, mentre il residuo solido ottenuto dopo idrolisi alcalina non è risultato solubile in soluzione acquosa.

Per quanto riguarda il campione HA Vico, i valori di M_n e di M_w ricavati da questa seconda serie di analisi sono inferiori rispetto a quelli calcolati nella prima serie. Tuttavia, l'ordine di grandezza è lo stesso e non si evidenziano differenze nell'andamento dei valori. Anche in questo caso, infatti, i valori ottenuti a -150 V sono leggermente più bassi di quelli ottenuti a -90 V (condizione che si verifica per tutti i campioni analizzati), la riproducibilità delle analisi ESI/MS sulle frazioni presenti in

duplicato è buona ed i pesi molecolari medi aumentano passando dal tal quale al residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina e poi al residuo finale. Questo non accade, invece, nel caso dell'acido umico estratto dal suolo di Portici, il cui residuo finale presenta valori di M_n e di M_w inferiori rispetto a quelli del residuo ottenuto dopo l'idrolisi alcalina. Questa differenza è attribuibile al fatto che il residuo finale dell'acido umico estratto dal suolo di Portici, contrariamente a quello dell'acido umico estratto dal suolo di Vico, è risultato solubile in NH_3 solo parzialmente, per cui l'analisi ESI/MS è stata eseguita solo sulla porzione solubile, alterando di conseguenza il calcolo dei pesi molecolari medi.

4.3.2 Spettri di massa ESI con HPSEC analitica on-line

I campioni analizzati per infusione diretta sono stati sottoposti ad una seconda analisi ESI/MS dopo un'ulteriore separazione *on-line* mediante HPSEC.

In un primo momento, è stata utilizzata come eluente la soluzione acquosa 9:1 (v/v) di acetato di ammonio 0.1 M/acetonitrile, ma, pur aumentando la concentrazione dei campioni, l'intensità degli spettri di massa ottenuti era talmente bassa che i picchi si confondevano con il rumore di fondo.

Risultati migliori si sono ottenuti usando come eluente la soluzione acquosa 9:1 (v/v) di ammoniaca 0.05%/acetonitrile. Tuttavia, né per i campioni tal quali né per le loro frazioni si è riusciti ad ottenere l'ulteriore separazione sperata. I profili dei cromatogrammi e degli spettri di massa ottenuti dopo HPSEC, infatti, sono del tutto analoghi a quelli ottenuti per infusione diretta utilizzando lo stesso solvente (*Figura 4.46* in Appendice 2, B e D). Anche in questo caso, l'equivalenza degli spettri di massa relativi ai due picchi cromatografici fa presupporre che il picco minore sia una spalla di

quello maggiore, non verificandosi nemmeno una vera e propria separazione cromatografica.

I valori dei pesi molecolari medi numerici (M_n) e ponderali (M_w), espressi in Daltons, calcolati per i campioni analizzati all'ESI/MS dopo HPSEC analitico *on-line* sono schematizzati in *Tabella 4.15*. Mancano i pesi molecolari medi delle frazioni acquose separate dopo transesterificazione dell'acido umico e di una delle repliche dell'acido fulvico estratti dal suolo di Vico, per esaurimento dei campioni.

I valori di M_n e di M_w ottenuti dopo HPSEC analitico *on-line* non presentano grandi differenze rispetto a quelli ottenuti per infusione diretta degli stessi campioni. Anche dopo HPSEC, i valori calcolati a -150 V sono generalmente più bassi di quelli a -90 V e la riproducibilità delle analisi ESI/MS sulle frazioni presenti in duplicato è buona. I pesi molecolari medi aumentano passando dal tal quale al residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina e poi al residuo finale, nel caso dell'acido umico estratto dal suolo di Vico, e stavolta anche dell'acido umico da Portici, se si considerano le misure fatte a -150 V.

4.4 Analisi DRIFT

La spettroscopia infrarossa, oltre a dare informazioni circa la natura, la reattività e la disposizione strutturale dei gruppi funzionali contenenti ossigeno e a mostrare la presenza di componenti proteiche e carboidratiche, fornisce anche indicazioni circa l'eventuale presenza di impurità inorganiche, quali ioni metallici ed argille. Infatti, gli spettri IR delle sostanze umiche contengono una varietà di bande che possono essere diagnostiche di strutture molecolari specifiche.

In *Figura 4.47* in Appendice 2 sono messi a confronto gli spettri IR del campione, proveniente dal suolo di Vico, di acido umico tal quale, della frazione acquosa separata dopo il trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e dei residui solidi ottenuti dopo la reazione di idrolisi alcalina e dopo il trattamento con acido iodidrico. Lo spettro del campione tal quale è quello tipico degli acidi umici (Stevenson, 1994). Tra le principali bande di assorbimento c'è quella a circa $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, che corrisponde alla transizione vibrazionale causata dallo stiramento del legame tra idrogeno ed ossigeno nei gruppi OH oppure, in misura minore, tra idrogeno ed azoto nei gruppi NH. Centrata attorno a 2920 cm^{-1} c'è la regione corrispondente allo stiramento del legame tra carbonio ed idrogeno nei gruppi CH alifatici, mentre tra $1725\text{ e }1720\text{ cm}^{-1}$ c'è la regione corrispondente allo stiramento del doppio legame tra carbonio ed ossigeno dei gruppi carbossilici e, in traccia, dei chetoni. La regione tra $1600\text{ e }1650\text{ cm}^{-1}$ è attribuibile invece alla vibrazione del doppio legame carbonio-carbonio delle strutture aromatiche, per lo più, ma anche allo stiramento del doppio legame tra carbonio ed ossigeno dei chetoni coniugati e dei gruppi ammidici. Tra $1590\text{ e }1517\text{ cm}^{-1}$ si verifica l'assorbimento dovuto allo stiramento dei carbossilati simmetrici oppure alla deformazione del legame N-H con stiramento del doppio legame tra carbonio ed azoto ammidico. La deformazione del legame tra carbonio ed idrogeno nei gruppi CH alifatici determina l'assorbimento tra $1460\text{ e }1450\text{ cm}^{-1}$, mentre tra $1400\text{ e }1390\text{ cm}^{-1}$ c'è la regione corrispondente alla deformazione del legame tra ossigeno ed idrogeno e tra carbonio ed ossigeno degli ossidrili fenolici ed alcolici ed allo stiramento dei carbossilati asimmetrici. Infine, l'assorbimento attorno a 1240 cm^{-1} dipende dallo stiramento del legame C-O e dalla deformazione del legame O-H dei gruppi alcolici e fenolici e dallo stiramento dei legami C-O degli aril eteri, mentre per frequenze minori

(intorno a $1080\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$) si considera lo stiramento dei legami C-O delle sostanze polisaccaridiche e Si-O dei silicati. Lo spettro IR della frazione acquosa separata dopo la reazione di transesterificazione non mostra variazioni significative rispetto al campione tal quale, esclusa l'assenza della gobba tra 1590 e 1517 cm^{-1} e di quella attorno a 2600 cm^{-1} , attribuita da alcuni autori allo stiramento del legame OH dei gruppi carbossilici (Davis *et al.*, 1999). Inoltre, si nota la presenza di una banda di assorbimento a circa 1080 cm^{-1} , attribuibile ai polisaccaridi. Essa permane anche nello spettro del residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina, che si differenzia dall'acido umico tal quale anche per la maggiore intensità della banda a 1590 cm^{-1} rispetto a quella a 1720 cm^{-1} e per la scomparsa dell'assorbimento a circa 1460 cm^{-1} . Per il residuo finale dopo il trattamento con acido iodidrico, le caratteristiche dello spettro sono del tutto simili a quelle del residuo rimanente dopo idrolisi alcalina, ma l'attenuazione della zona corrispondente agli alifatici è ancora più pronunciata, mentre una larga banda attribuibile a sistemi aromatici polisostituiti e/o policondensati (Bellamy, 1975) appare a 1144 cm^{-1} .

In *Figura 4.48* in Appendice 2 sono riportati gli spettri IR del campione, proveniente dal suolo di Vico, di acido fulvico tal quale e del residuo solido ottenuto dopo la reazione di idrolisi alcalina. Lo spettro acquisito per l'acido fulvico tal quale non mostra difformità significative rispetto agli spettri riportati in letteratura (Stevenson, 1994), con la banda a 1720 cm^{-1} più intensa di quella dell'acido umico per la presenza di maggiori quantità di gruppi carbossilici. Tale banda scompare nello spettro del residuo solido restante dopo idrolisi alcalina, che è caratterizzato dalla presenza di una banda a 1211 cm^{-1} , presumibilmente di fenoli, di un'altra banda molto intensa a 600 cm^{-1} , di difficile attribuzione, riferibile forse allo stiramento dei legami tra

carbonio ed idrogeno negli eterocicli, e di due bande a 3400 e a 1630 cm^{-1} , di intensità paragonabili.

In *Figura 4.49* in Appendice 2 sono messi a confronto gli spettri IR del campione, proveniente dal suolo di Vico, di umina tal quale, della frazione acquosa separata dopo il trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e dei residui solidi ottenuti dopo la reazione di idrolisi alcalina e dopo il trattamento con acido iodidrico. Lo spettro del campione tal quale è caratterizzato essenzialmente da tre bande di assorbimento piuttosto ampie attorno a 3400, 1633 e 1033 cm^{-1} , mentre nello spettro della frazione acquosa predominano altre tre bande a 3200, 1460 e 1195 cm^{-1} , l'ultima delle quali è attribuibile ad alcoli o fenoli. Gli spettri dei due residui solidi dopo idrolisi alcalina e dopo trattamento con acido iodidrico sono molto simili tra loro ed allo spettro del campione tal quale, con la banda di assorbimento centrale (1627 cm^{-1}) più attenuata e la terza banda molto larga e centrata attorno a 1110 cm^{-1} , la quale può rappresentare sia dei sistemi aromatici polisostituiti sia dei residui silicatici.

Una situazione del tutto analoga a quella riscontrata nel campione di umina è stata riscontrata anche nel campione di umina trattata, come mostrato in *Figura 4.50* in Appendice 2. L'unica differenza più evidente è rappresentata dallo spettro della fase acquosa separata dopo la reazione di transesterificazione, che mostra assorbimento a circa 1678 cm^{-1} ed anche nella ristretta zona attorno a 1384 cm^{-1} , corrispondente presumibilmente agli stiramenti dei carbossilati, e due bande da 1200 a 1140 cm^{-1} attribuibili ad alcoli o fenoli, ma non l'ampia banda attorno a 1460 cm^{-1} dovuta a deformazioni scheletrali degli alchili.

Infine, in *Figura 4.51* in Appendice 2 si riporta il confronto tra gli spettri IR del campione, proveniente dal suolo di Portici, di acido umico tal quale, della frazione

acquosa separata dopo il trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e dei residui solidi ottenuti dopo la reazione di idrolisi alcalina e dopo il trattamento con acido iodidrico. Gli spettri del campione tal quale e della frazione acquosa sono del tutto analoghi ai corrispondenti spettri dell'acido umico estratto dal suolo di Vico. Nello spettro del residuo dopo idrolisi alcalina si nota, invece, che l'assorbimento a 1720 cm^{-1} è molto più intenso che in altri spettri, mentre nello spettro del residuo dopo il trattamento con acido iodidrico appare come in altri campioni dopo il medesimo trattamento la banda a 1140 cm^{-1} , attribuibile sistemi aromatici polisostituiti.

4.5 Analisi CPMAS- ^{13}C -NMR

Un contributo aggiuntivo alla caratterizzazione molecolare dei campioni presi in esame in questo studio è fornito dall'analisi degli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR.

In *Figura 452* in Appendice 2 sono messi a confronto gli spettri NMR in fase solida del campione, proveniente dal suolo di Vico, di acido umico tal quale e dei relativi residui solidi ottenuti dopo la reazione di idrolisi alcalina e dopo il trattamento con acido iodidrico, allo scopo di monitorare la variazione di composizione chimica attraverso le varie fasi della procedura di frazionamento. Lo spettro dell'acido umico tal quale ha caratteristiche simili a quelle riportate in letteratura per gli acidi umici estratti da suoli vulcanici (Conte *et al.*, 2003). Il picco predominante è quello relativo ai sistemi alifatici non sostituiti, intorno a 37 ppm. Di rilievo è anche la presenza di picchi concernenti carboni polari, come quelli di natura carboidratica a 75 ppm. I sistemi aromatici sono rappresentati, invece, dal picco attorno a 130 ppm ed infine il picco a 176 ppm può essere attribuito ai gruppi carbossilici. Nello spettro del residuo solido rimanente dopo la reazione di idrolisi alcalina, a predominare sono i sistemi aromatici a

causa del netto abbattimento dei sistemi alifatici, carboidratici e carbossilici. Si evidenzia anche l'aumento del picco relativo ai carboni metossilici, prevedibile in seguito alle reazioni di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ e di idrolisi alcalina con KOH in CH_3OH . Lo spettro del residuo finale dopo trattamento con HI , infine, rivela la rottura dei legami eteri con l'eliminazione dei metossili e, probabilmente, dei legami glicosidici dei polisaccaridi e la permanenza nel campione di carbonio aromatico, nettamente prevalente sugli scarsi sistemi alifatici residui.

In *Figura 4.53* in Appendice 2 si riportano gli spettri NMR in fase solida delle frazioni solubili in acqua separate dopo la reazione di transesterificazione e dopo il trattamento con acido iodidrico. Il primo spettro è caratterizzato dalla presenza di carboni alifatici (32 ppm), appartenenti ad alcani e ad acidi grassi, data anche la presenza di un picco relativo ai carboni carbossilici a 179 ppm, e dalla predominanza di carboni polari di natura idrofilica, sia peptidica che carboidratica, tra 60 e 110 ppm. Come prevedibile, in questa frazione i sistemi aromatici sono di scarso rilievo. La frazione acquosa derivante dal trattamento con acido iodidrico, invece, nelle condizioni in cui è stata analizzata, presenta uno spettro privo di picchi distinguibili.

La *Figura 454* in Appendice 2 presenta gli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR dell'acido fulvico estratto dal suolo di Vico e del corrispondente residuo solido ottenuto dopo la reazione di idrolisi alcalina. La principale caratteristica dello spettro dell'acido fulvico tal quale è, secondo quanto riportato in letteratura (Preston, 1996), il pronunciato picco dei carboidrati a 75 ppm. Tale picco, insieme a quello dei carboni carbossilici, risulta notevolmente abbattuto in seguito alla reazione di idrolisi alcalina. Tuttavia, l'aumento dei carboni metossilici non è accentuato come previsto.

Anche lo spettro CPMAS- ^{13}C -NMR dell'umina estratta dal suolo di Vico, mostrato nella *Figura 4.55* in Appendice 2, è dominato dal picco dei carboidrati intorno a 77 ppm. Il picco dei carboni alifatici a 34 ppm, invece, è della stessa misura di quello degli aromatici a 132 ppm. Lo spettro del residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina è indice di una situazione simile a quella verificatasi nel caso dell'acido umico, con la diminuzione dei sistemi alifatici e carboidratici e l'aumento del picco dei carboni metossilici. Tuttavia, nel caso dell'umina, questi fenomeni si verificano in misura ancora più accentuata. Di conseguenza, una volta eliminati i metossili mediante il trattamento con acido iodidrico, il residuo finale resta del tutto privo di esteri, acidi grassi e carboidrati ed il suo spettro presenta un unico picco predominante a 132 ppm.

Un andamento del tutto analogo si riscontra anche per l'umina trattata estratta dal suolo di Vico (*Figura 4.56* in Appendice 2). Lo spettro del campione tal quale non mostra differenze di rilievo rispetto al campione di umina non trattata, mentre il residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina contiene ancora alcuni sistemi alifatici e soprattutto carboidratici, come evidenziato dal picco a 75 ppm. Tale picco scompare nello spettro del residuo finale dopo HI, dove il picco dei sistemi aromatici ancora una volta sovrasta in maniera preponderante su quello dei carboni alifatici rimanenti.

Infine, un'ulteriore conferma della variazione di composizione chimica dei residui nelle varie fasi della procedura di frazionamento è fornita anche dagli spettri NMR in fase solida del secondo acido umico esaminato in questo studio, estratto dal suolo di Portici (*Figura 4.57* in Appendice 2). L'efficacia dell'estrazione dei lipidi liberi e delle reazioni di transesterificazione e di idrolisi alcalina è più bassa, data la permanenza di quantità relativamente abbondanti di carboni alifatici nei residui dopo idrolisi alcalina e dopo trattamento con acido iodidrico. Tuttavia, l'andamento dei tre

spettri è comparabile a quello registrato nel caso dell'acido umico estratto dal suolo di Vico.

APPENDICE 2

Tabella 4.1: Peso netto (mg) e concentrazione ($\text{mg g}^{-1}_{\text{TOC}}$) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS nelle due repliche dei lipidi liberi estratti dal campione HA Vico.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	<i>10.14</i>	<i>19.89</i>
<i>TOTALE (mg g⁻¹_{TOC})</i>	<i>41.11</i>	<i>79.17</i>
acidi monocarbossilici (%)	35.8	18.4
acidi dicarbossilici (%)	26.1	25.7
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	16.3	22.0
α, β -idrossiacidi (%)	3.2	6.6
? -idrossiacidi (%)	15.4	24.5
alcoli (%)	2.9	2.5
alcani, alcheni (%)	0.3	0.3
composti aromatici (%)	/	/
steroli (%)	/	/

Figura 4.1: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HA Vico.

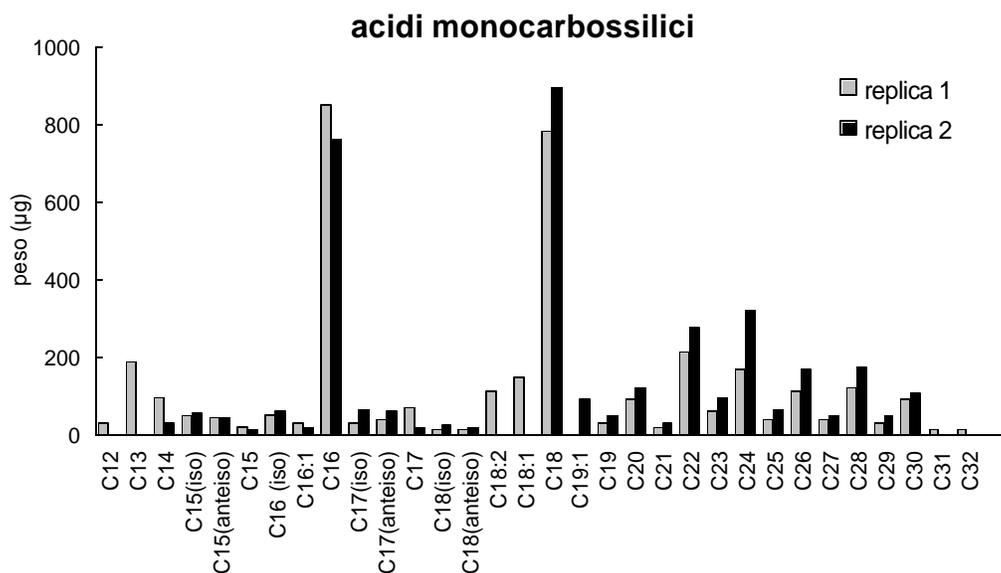


Figura 4.2: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici, identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HA Vico.

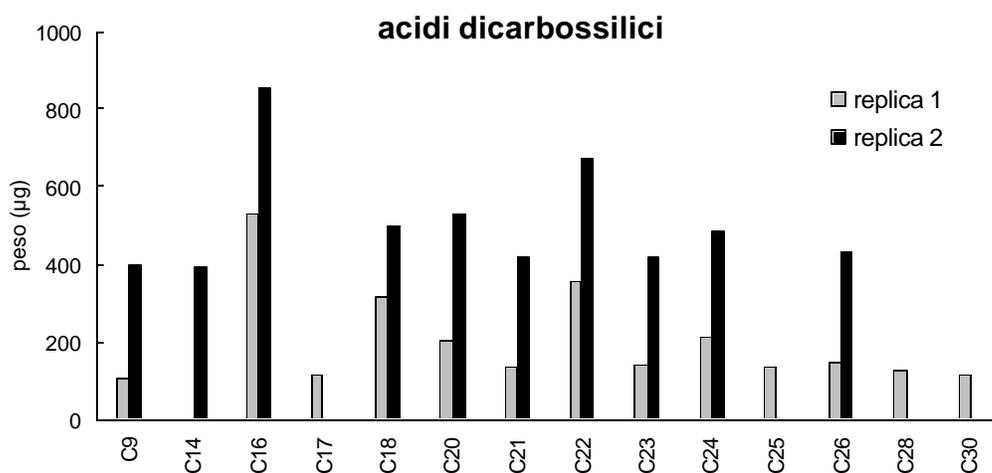


Figura 4.3: Pesetti netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HA Vico. Le lettere (α , β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici lungo la catena di atomi di carbonio.

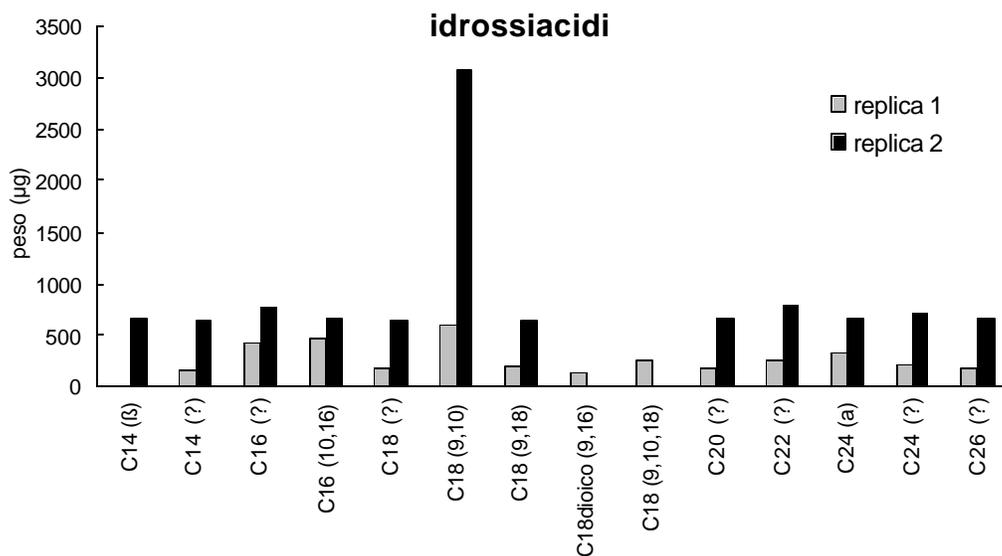


Figura 4.4: Pesetti netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HA Vico.

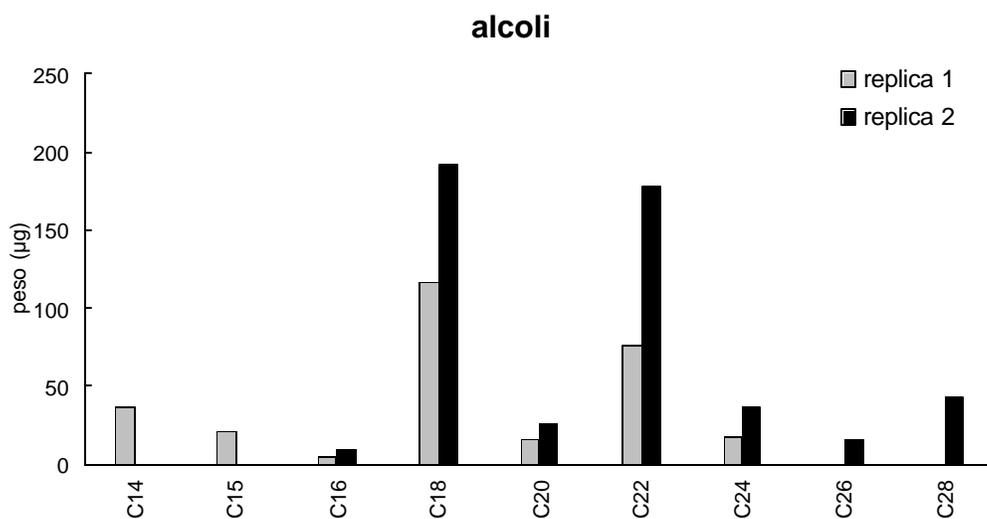


Tabella 4.2: Peso netto (mg) e concentrazione (mg g⁻¹_{TOC}) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS nelle due repliche dei lipidi liberi estratti dal campione dal campione HUM 1 Vico.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	2.89	2.97
<i>TOTALE (mg g⁻¹_{TOC})</i>	34.90	35.91
acidi monocarbossilici (%)	23.0	28.2
acidi dicarbossilici (%)	45.5	26.3
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	9.8	7.2
α , β -idrossiacidi (%)	0.4	1.7
? -idrossiacidi (%)	2.8	10.7
alcoli (%)	9.6	16.9
alcani, alcheni (%)	0.9	0.5
composti aromatici (%)	3.9	4.0
steroli (%)	4.1	4.5

Figura 4.5: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 1 Vico.

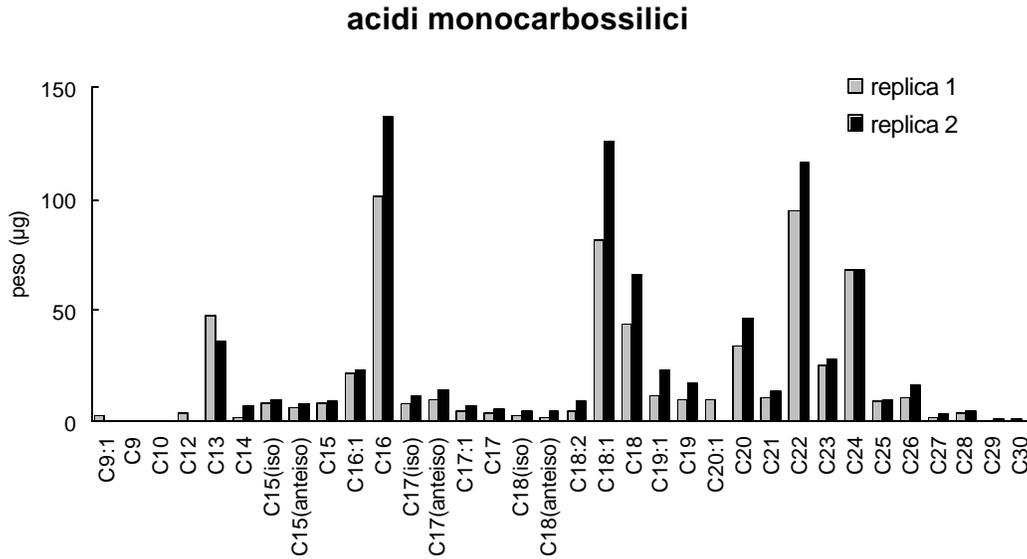


Figura 4.5: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 1 Vico.

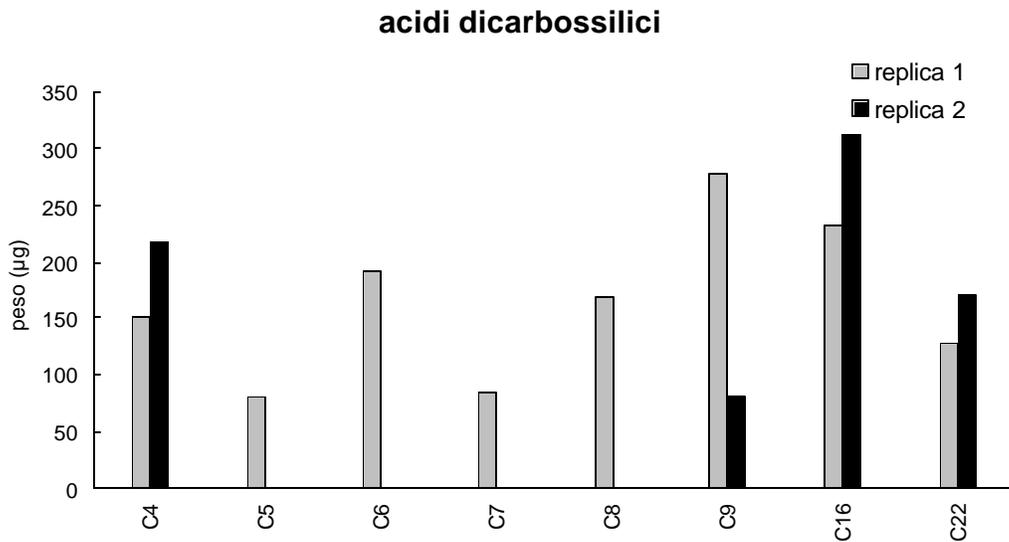
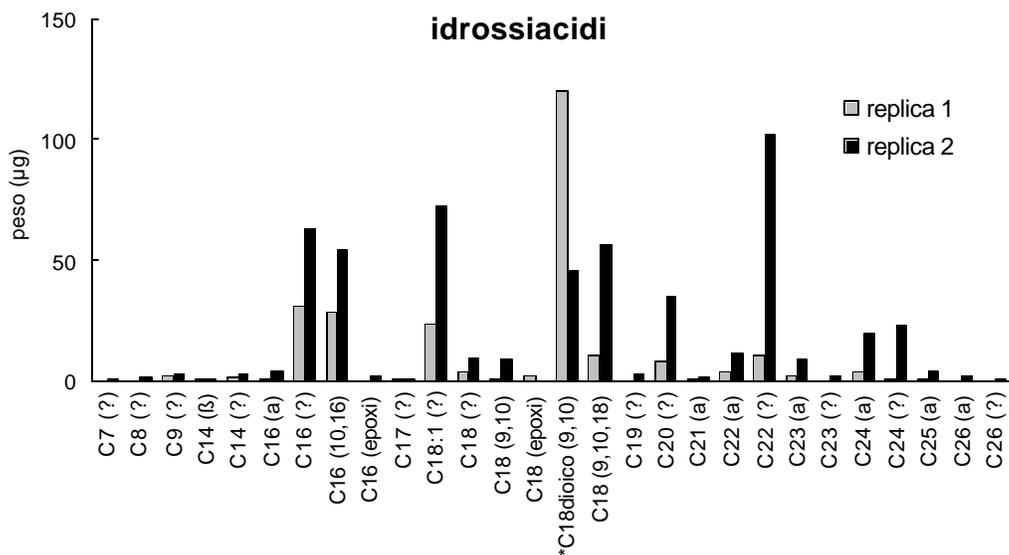


Figura 4.7: Pesetti netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 1 Vico. Le lettere (α , β e γ) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici lungo la catena di atomi di carbonio.



(*: valore diviso per 2).

Figura 4.8: Pesetti netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 1 Vico.

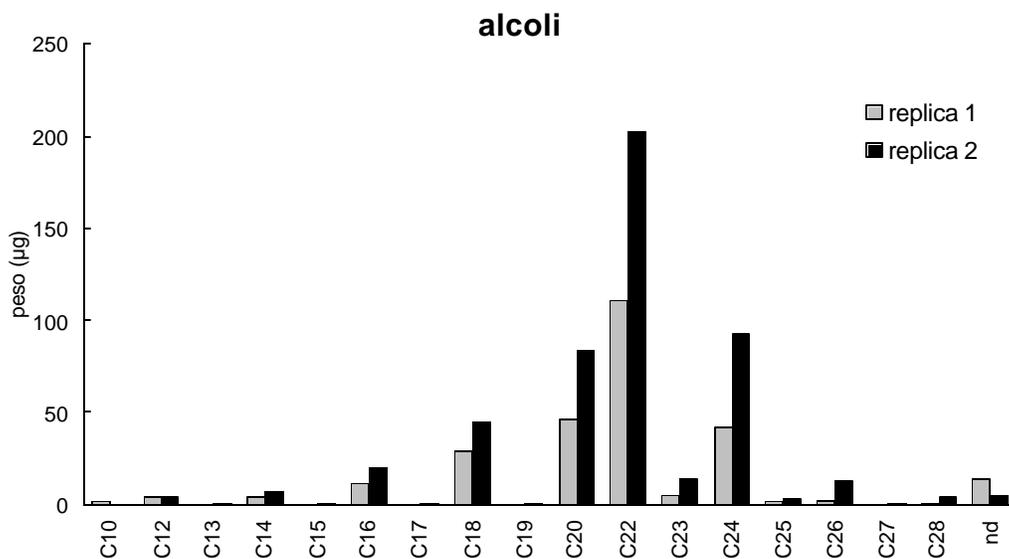


Tabella 4.3: Peso netto (mg) e concentrazione (mg g⁻¹_{TOC}) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS nelle due repliche dei lipidi liberi estratti dal campione HUM 2 Vico.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	<i>14.20</i>	<i>18.71</i>
<i>TOTALE (mg g⁻¹_{TOC})</i>	<i>51.86</i>	<i>67.99</i>
acidi monocarbossilici (%)	12.6	15.1
acidi dicarbossilici (%)	71.1	66.4
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	2.5	3.3
α, β -idrossiacidi (%)	0.7	1.5
? -idrossiacidi (%)	4.7	5.4
alcoli (%)	4.4	5.4
alcani, alcheni (%)	/	0.1
composti aromatici (%)	2.1	1.4
steroli (%)	1.9	1.4

Figura 4.9: Pesetti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 2 Vico.

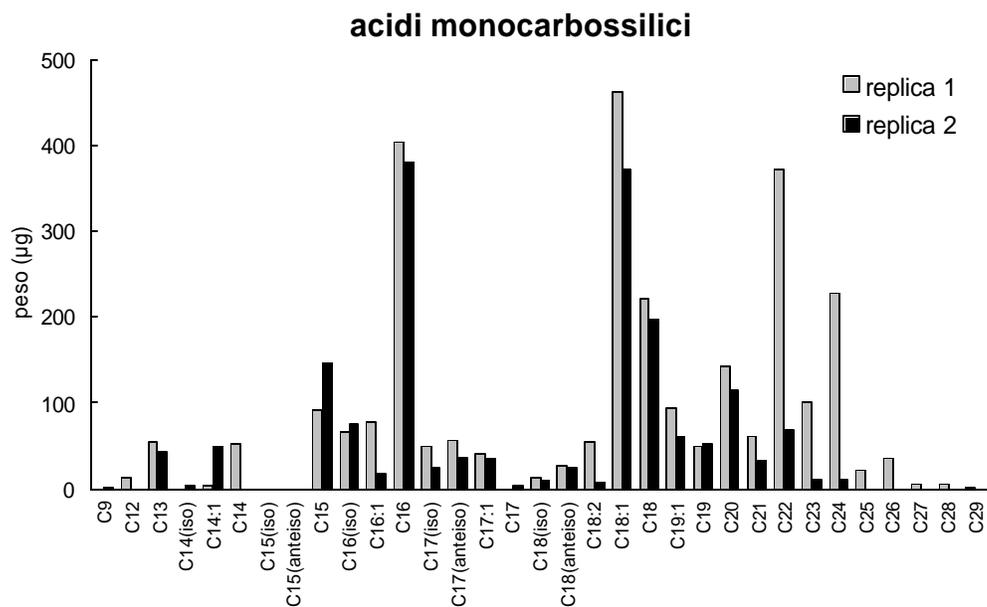


Figura 4.10: Pesetti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 2 Vico.

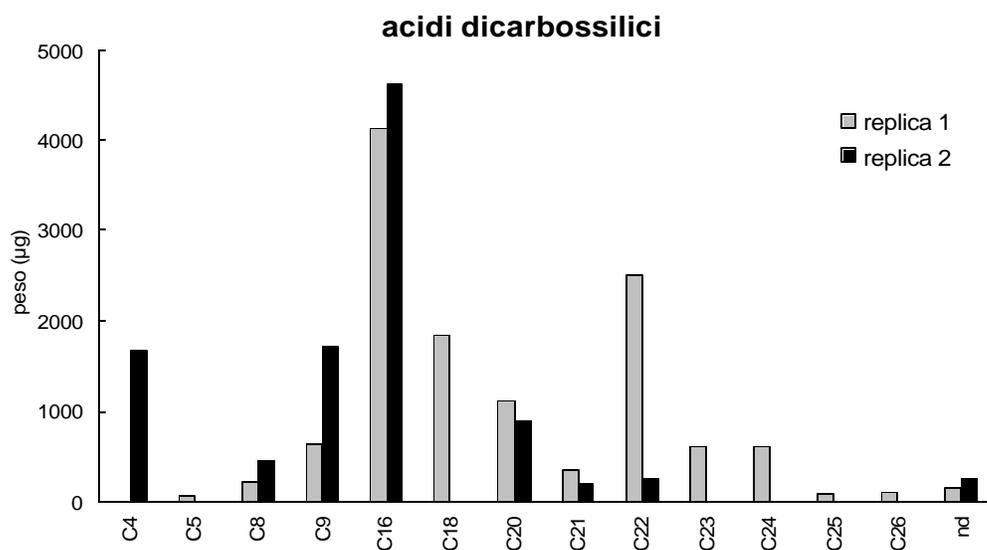


Figura 4.11: Pesi netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 2 Vico. Le lettere (a, β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici lungo la catena di atomi di carbonio.

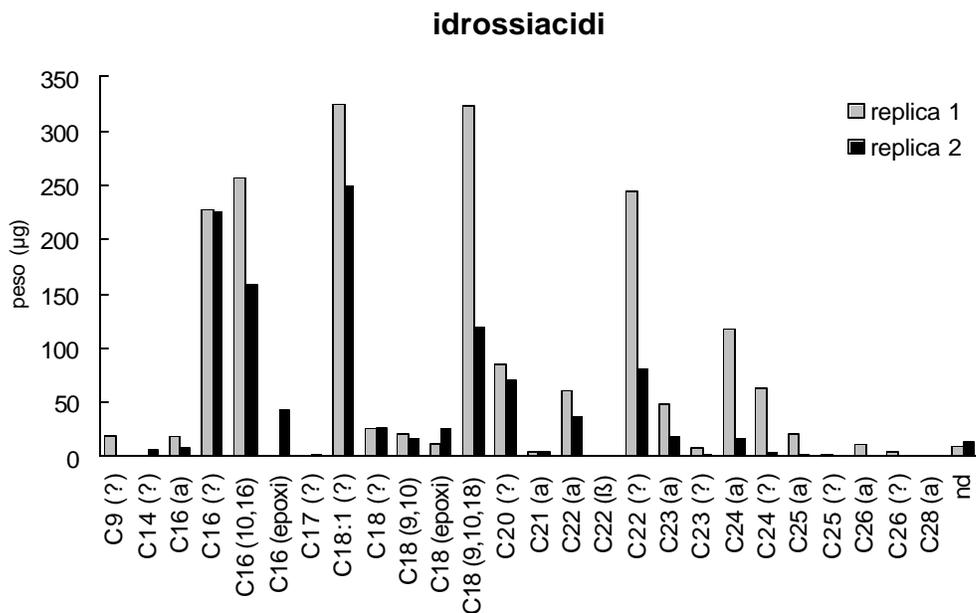


Figura 4.12: Pesi netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto di lipidi liberi del campione HUM 2 Vico.

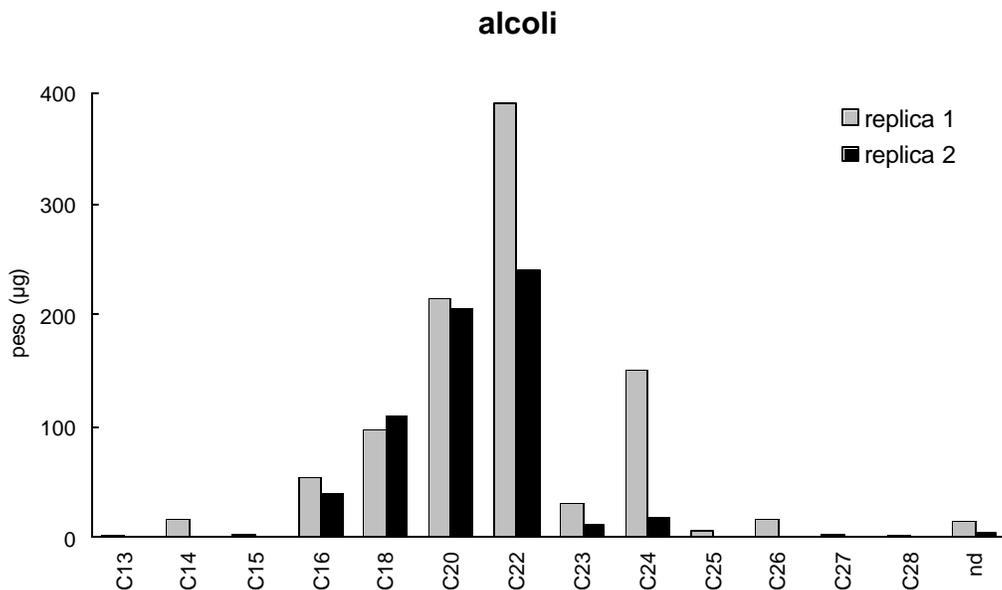


Tabella 4.4: Peso netto (mg) e concentrazione ($\text{mg g}^{-1}\text{TOC}$) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS, sia in totale sia in frazioni separate, nell'estratto dopo transesterificazione, trattato sia mediante estrazione liquido-liquido sia mediante SPE. Ogni valore è la media di due repliche.

PRODOTTI ESTRATTI	LIQUIDO-LIQUIDO			SPE		
	TOT.	FR.ALIF.	FR.AROM.	TOT.	FR.NEUT.	FR.ACIDA
<i>TOTALE (mg)</i>	<i>6.10</i>	<i>4.73</i>	<i>1.37</i>	<i>9.06</i>	<i>8.61</i>	<i>0.45</i>
<i>TOTALE (mg g⁻¹TOC)</i>	<i>24.54</i>	<i>19.03</i>	<i>5.51</i>	<i>36.43</i>	<i>34.62</i>	<i>1.81</i>
acidi monocarbossilici (%)	5.5	4.6	0.9	5.9	3.9	2.0
acidi dicarbossilici (%)	6.6	5.6	1.0	6.2	5.8	0.4
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	33.0	21.6	11.4	29.7	28.6	1.1
α,β -idrossiacidi (%)	25.4	21.7	3.7	27.7	27.0	0.7
? -idrossiacidi (%)	21.4	17.6	3.8	19.9	19.9	/
alcoli (%)	4.9	4.3	0.6	4.9	4.2	0.7
alcani, alcheni (%)	/	/	/	/	/	/
composti aromatici (%)	1.9	1.0	0.9	4.8	4.2	0.6
steroli (%)	1.3	1.2	0.1	0.9	0.9	/

Figura 4.13: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nel transesterificato del campione HA Vico, sottoposto ad estrazione liquido-liquido e ad estrazione su fase solida.

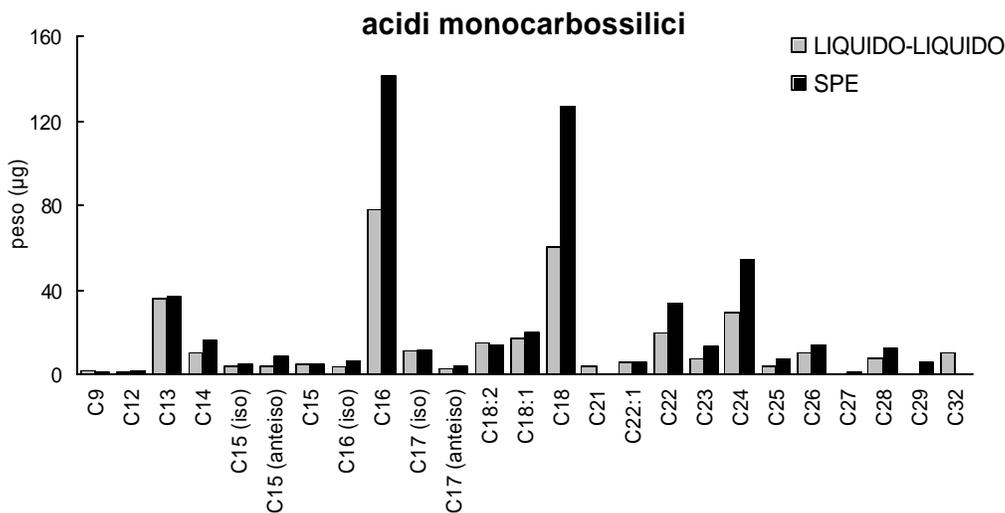


Figura 4.14: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nel transesterificato del campione HA Vico, sottoposto ad estrazione liquido-liquido e ad estrazione su fase solida. Le lettere (a e β) in parentesi si riferiscono alla posizione di gruppi ossidrilici lungo la catena di atomi di carbonio.

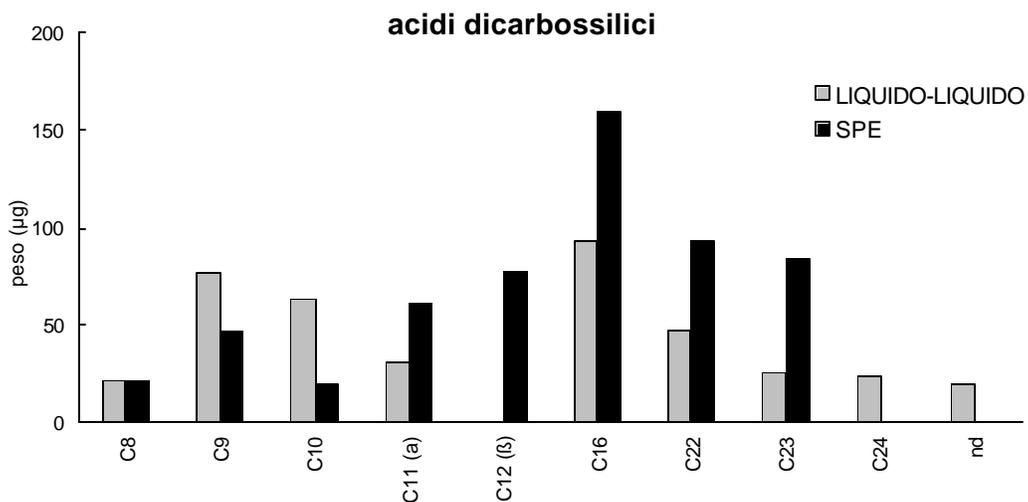


Figura 4.15: Pesi netti (μg) degli idrossiacidi identificati nel transesterificato del campione HA Vico, sottoposto ad estrazione liquido-liquido e ad estrazione su fase solida. Le lettere (a, β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici lungo la catena di atomi di carbonio.

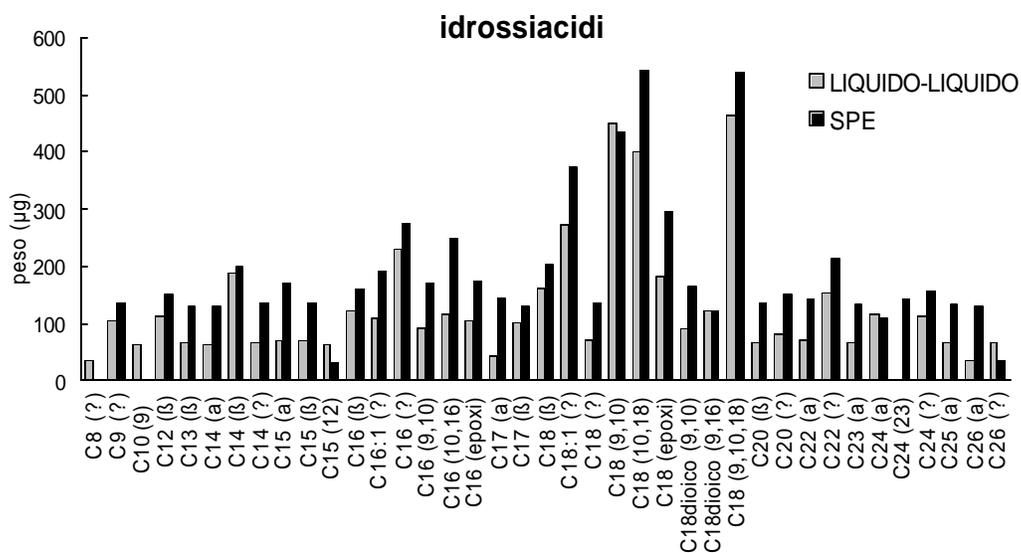


Figura 4.16: Pesi netti (μg) degli alcoli identificati nel transesterificato del campione HA Vico, sottoposto ad estrazione liquido-liquido e ad estrazione su fase solida.

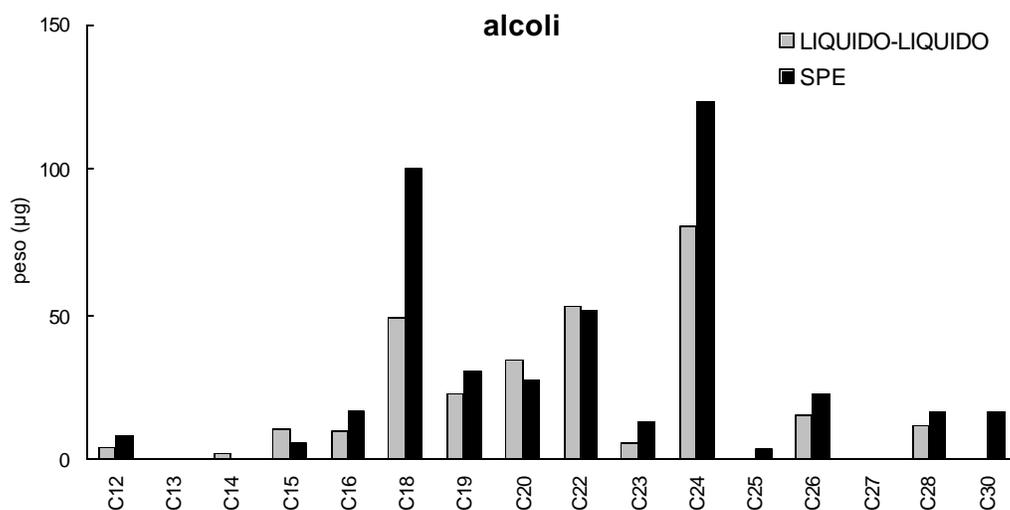


Tabella 4.5: Peso netto (mg) e concentrazione ($\text{mg g}^{-1}\text{TOC}$) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS negli estratti dopo transesterificazione delle due repliche del campione HUM 1 Vico.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	4.50	7.22
<i>TOTALE (mg g⁻¹TOC)</i>	54.36	87.26
acidi monocarbossilici (%)	3.6	5.0
acidi dicarbossilici (%)	64.9	57.4
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	6.7	16.1
α , β -idrossiacidi (%)	1.1	0.7
? -idrossiacidi (%)	3.0	3.0
alcoli (%)	3.1	4.2
alcani, alcheni (%)	5.1	2.1
composti aromatici (%)	12.1	10.9
steroli (%)	0.4	0.6

Figura 4.17: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 1 Vico.

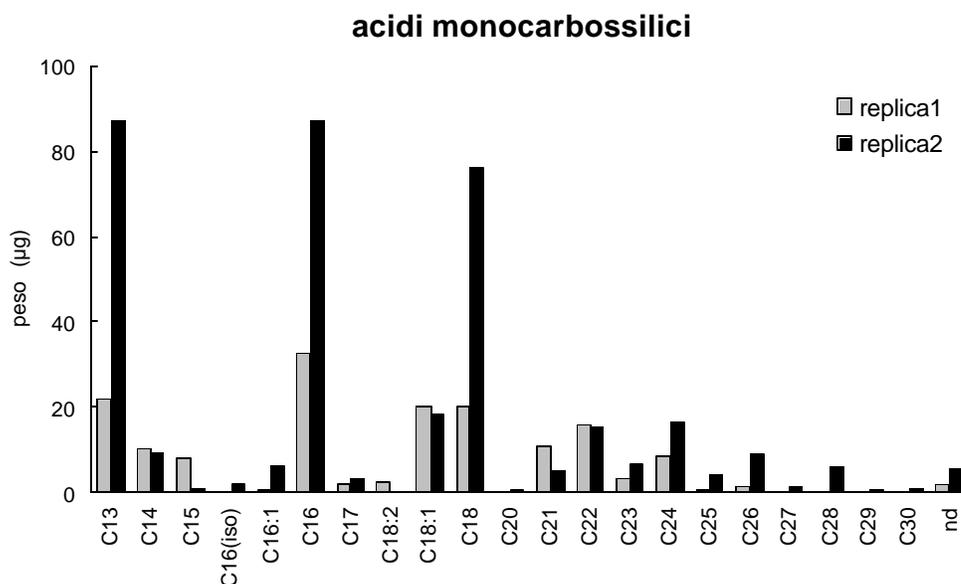


Figura 4.18: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 1 Vico.

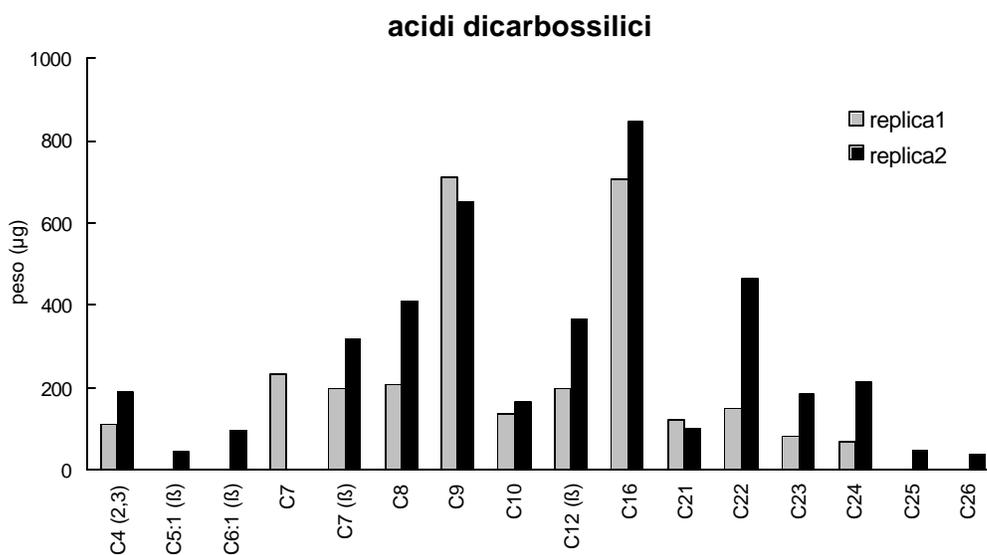
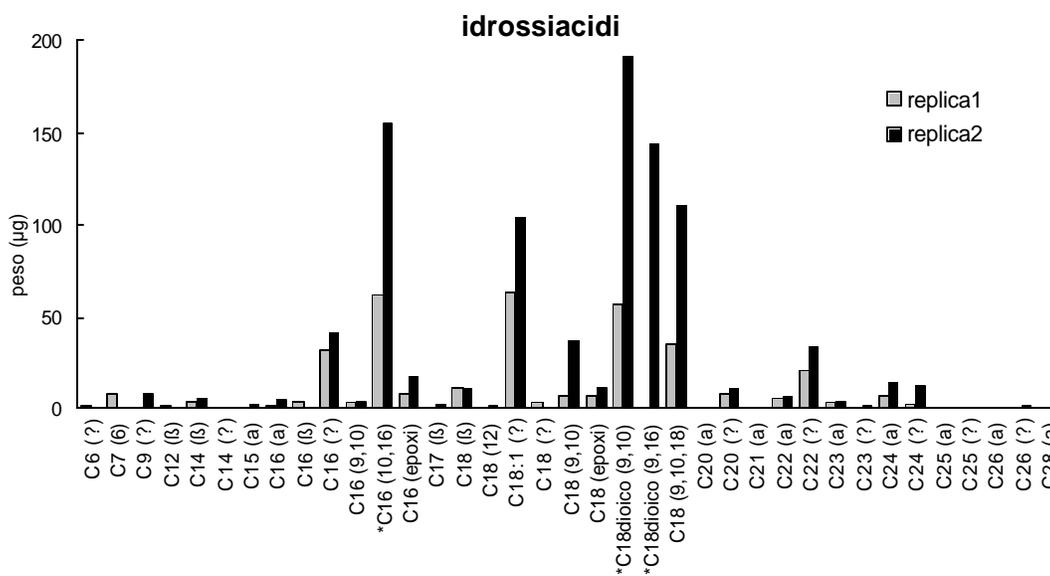


Figura 4.19: Pesi netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 1 Vico. Le lettere (α , β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici lungo la catena di atomi di carbonio.



(*: valore diviso per 2).

Figura 4.20: Pesi netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 1 Vico.

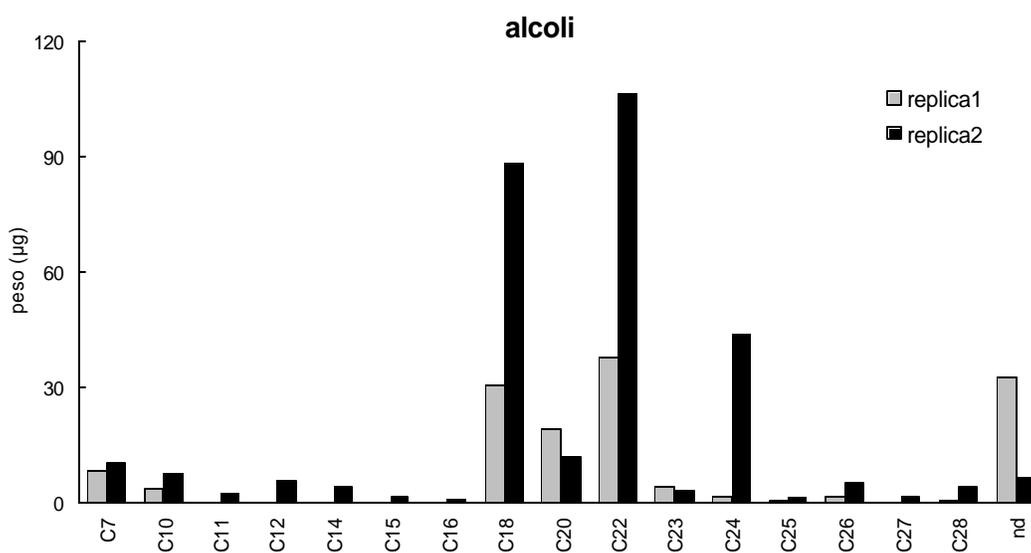


Figura 4.21: Pesi netti (μg) degli alcani ed alcheni identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 1 Vico.

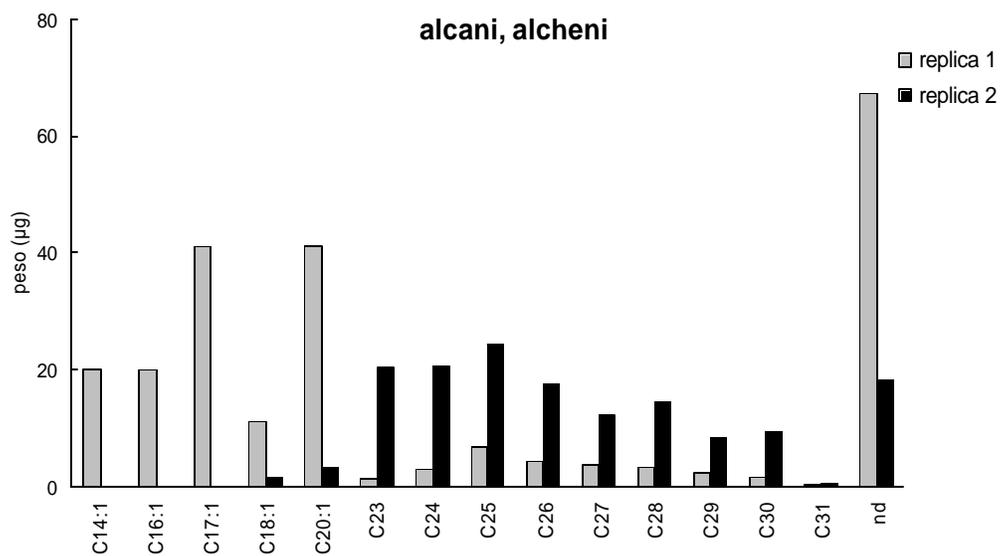


Tabella 4.6: Peso netto (mg) e concentrazione (mg g⁻¹_{TOC}) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS negli estratti dopo transesterificazione delle due repliche del campione HUM 2 Vico.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	<i>14.64</i>	<i>14.02</i>
<i>TOTALE (mg g⁻¹_{TOC})</i>	<i>53.46</i>	<i>50.94</i>
acidi monocarbossilici (%)	3.1	3.8
acidi dicarbossilici (%)	67.4	56.4
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	17.2	14.8
α, β -idrossiacidi (%)	0.8	1.3
? -idrossiacidi (%)	1.6	4.6
alcoli (%)	2.5	4.4
alcani, alcheni (%)	0.1	1.2
composti aromatici (%)	7.2	13.1
steroli (%)	0.1	0.4

Figura 4.22: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 2 Vico.

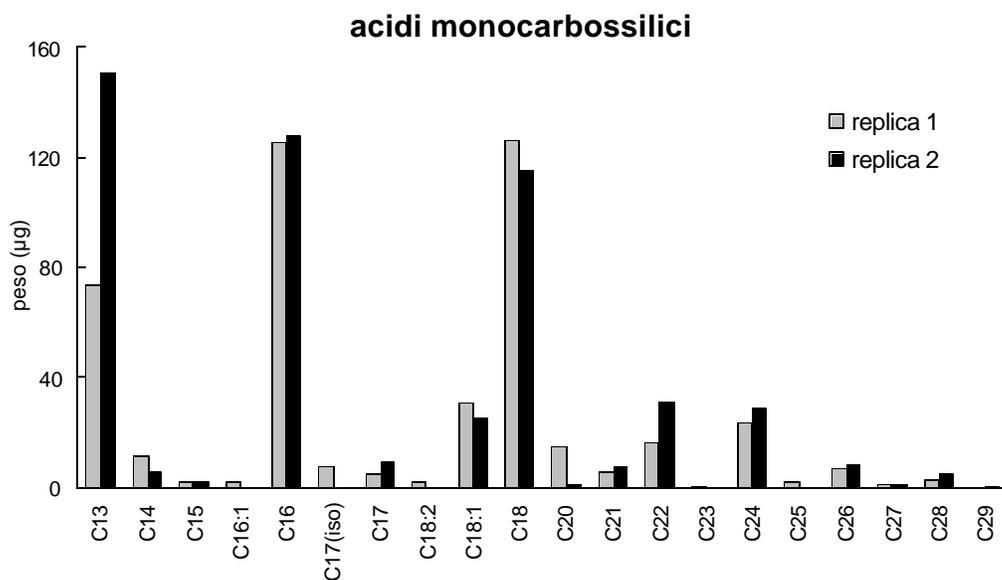


Figura 4.23: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 2 Vico.

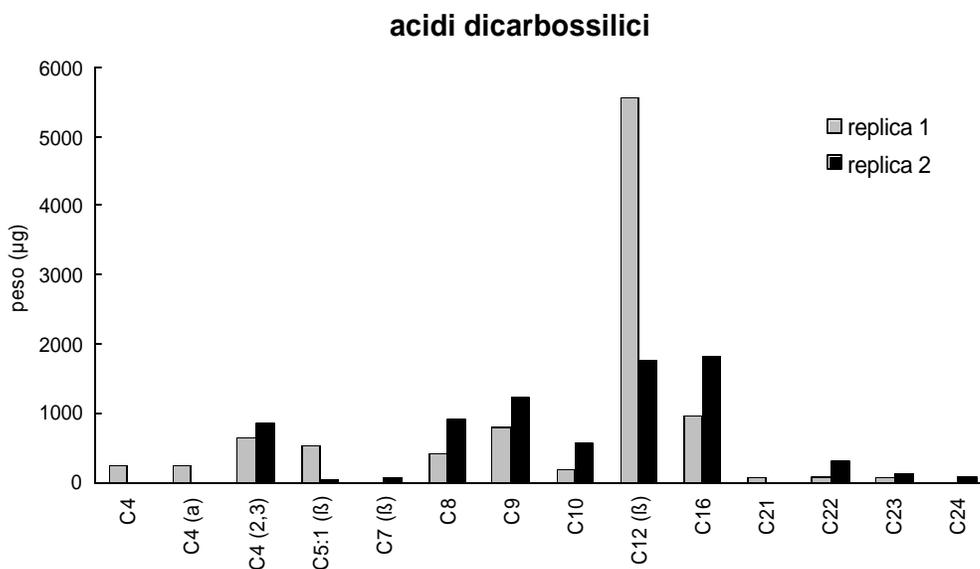
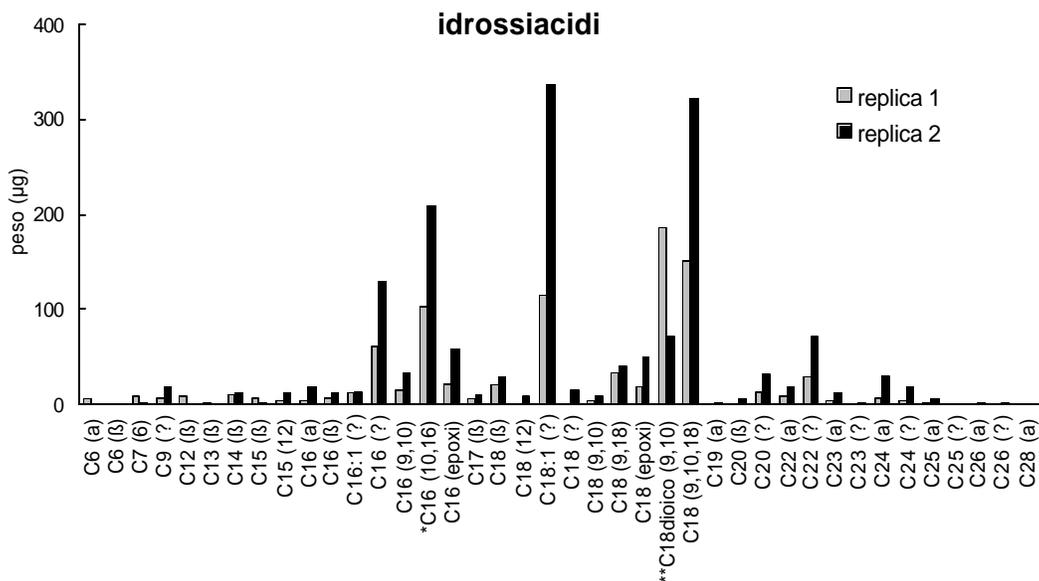


Figura 4.24: Pesi netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 2 Vico. Le lettere (a, β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici.



(*: valore diviso per 4; **: valore diviso per 10).

Figura 4.25: Pesi netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto dopo transesterificazione del campione HUM 2 Vico.

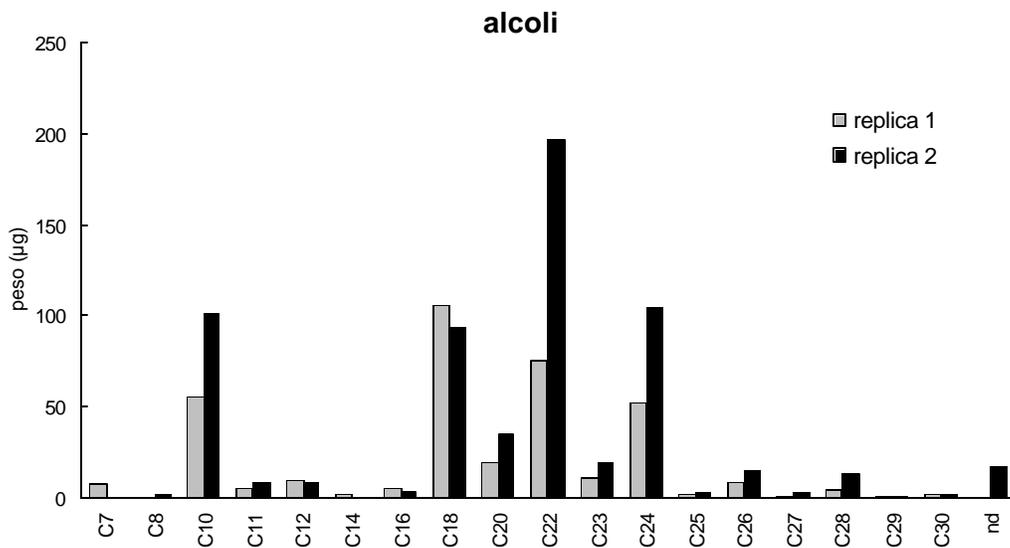


Tabella 4.7: Peso netto (mg) e concentrazione ($\text{mg g}^{-1}\text{TOC}$) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS negli estratti dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) delle due repliche del campione HA Vico.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	1.35	0.64
<i>TOTALE (mg g⁻¹TOC)</i>	5.47	2.55
acidi monocarbossilici (%)	26.4	15.3
acidi dicarbossilici (%)	15.2	11.2
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	12.6	15.5
α,β -idrossiacidi (%)	14.8	/
? -idrossiacidi (%)	13.2	31.4
alcoli (%)	10.6	4.5
alcani, alcheni (%)	0.2	11.0
composti aromatici (%)	4.0	8.3
steroli (%)	3.0	2.8

Figura 4.26: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HA Vico.

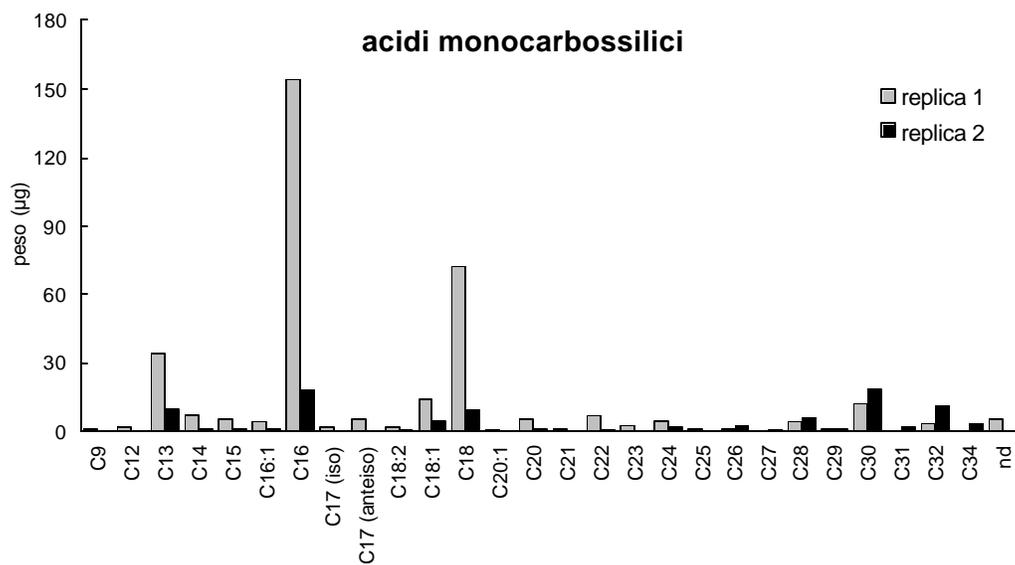


Figura 4.27: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HA Vico.

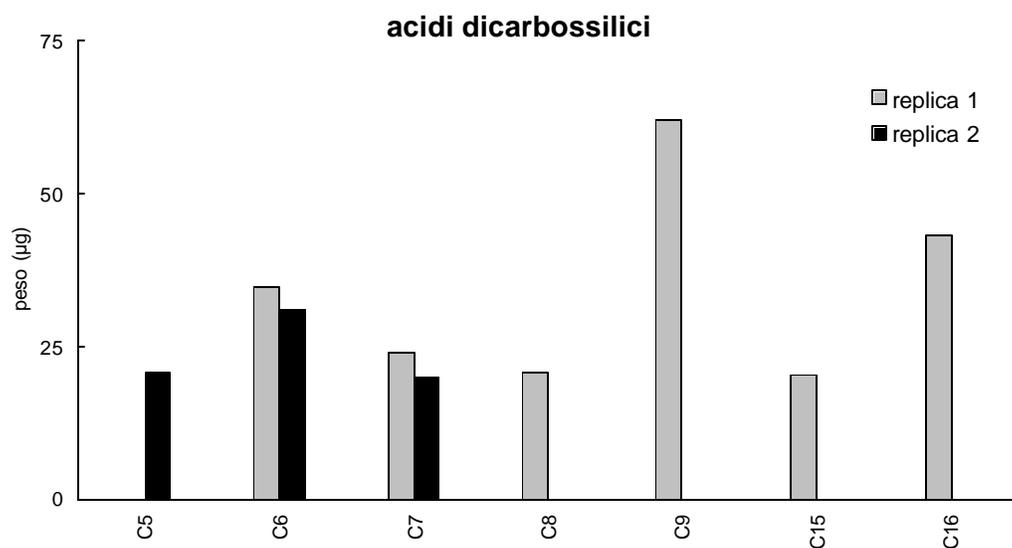


Figura 4.28: Pesi netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HA Vico. Le lettere (α , β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici lungo la catena di atomi di carbonio.

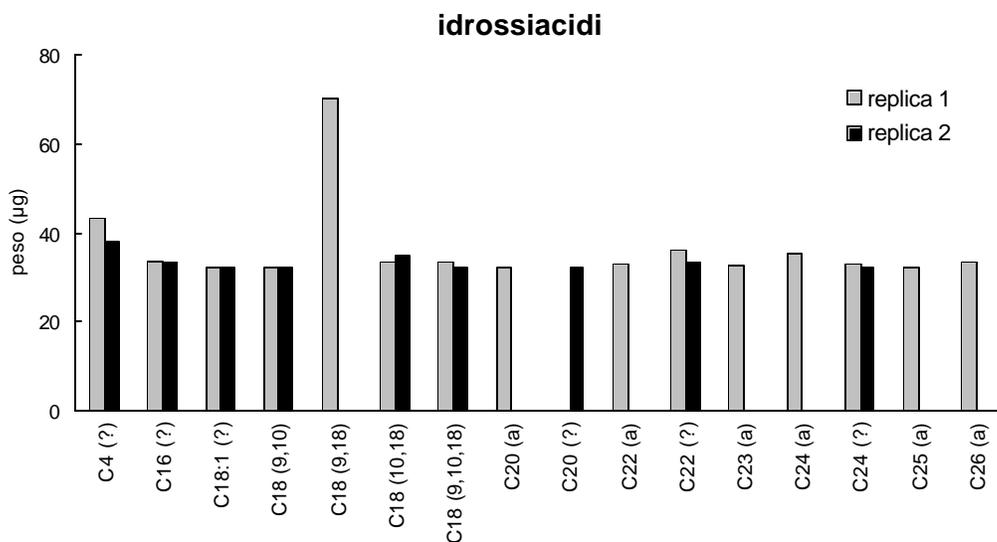


Figura 4.29: Pesi netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HA Vico.

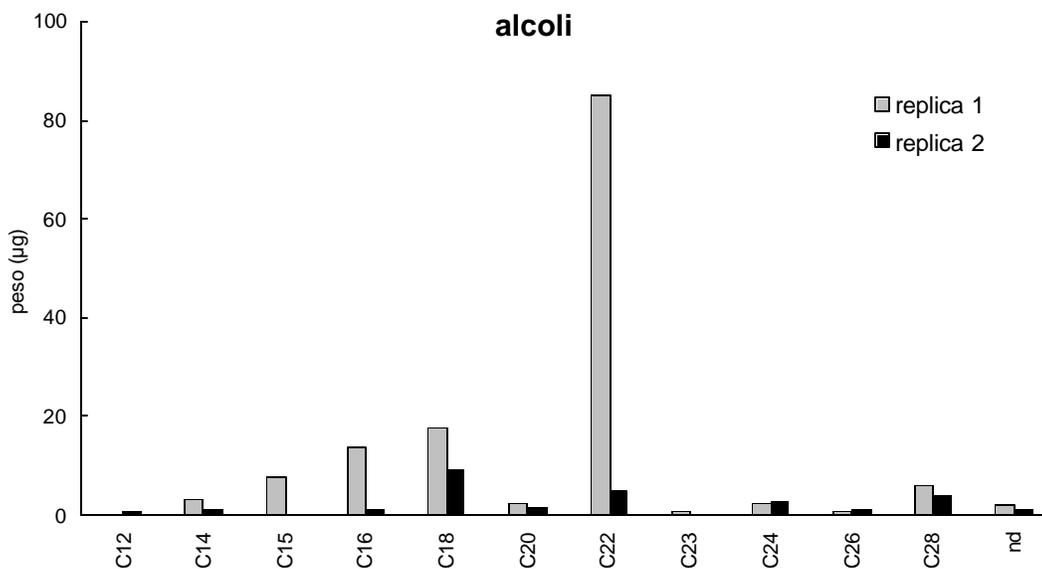


Tabella 4.8: Peso netto (mg) e concentrazione ($\text{mg g}^{-1}\text{TOC}$) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS negli estratti dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) delle due repliche del campione HUM 1 Vico.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	0.55	0.63
<i>TOTALE (mg g⁻¹ TOC)</i>	6.64	7.61
acidi monocarbossilici (%)	18.4	26.0
acidi dicarbossilici (%)	29.6	42.5
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	15.4	1.4
α , β -idrossiacidi (%)	0.1	0.5
? -idrossiacidi (%)	0.8	1.5
alcoli (%)	26.2	17.5
alcani, alcheni (%)	0.8	0.5
composti aromatici (%)	7.3	6.4
steroli (%)	1.4	3.7

Figura 4.30: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM 1 Vico.

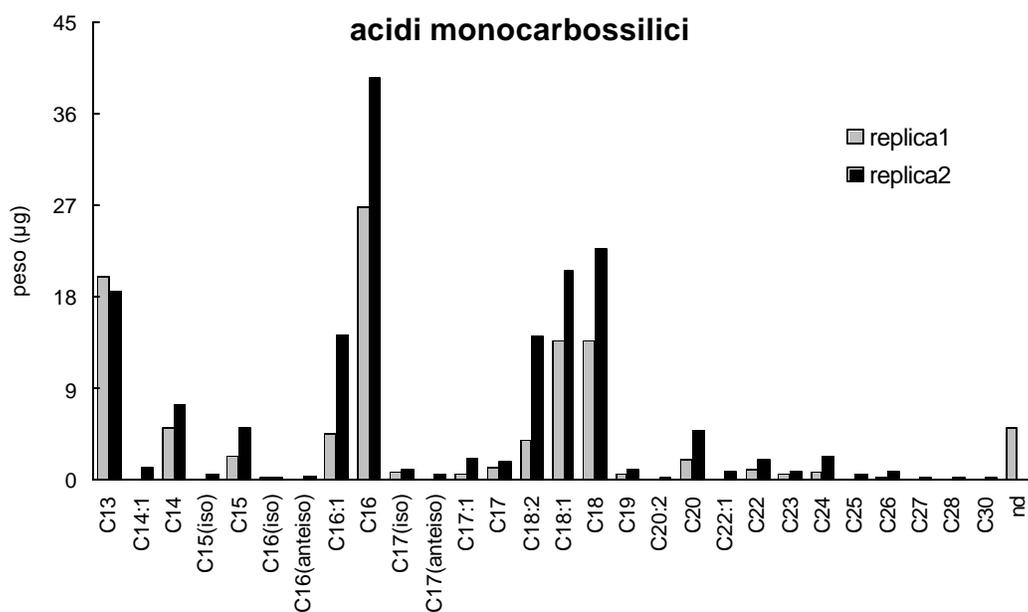


Figura 4.31: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM 1 Vico.

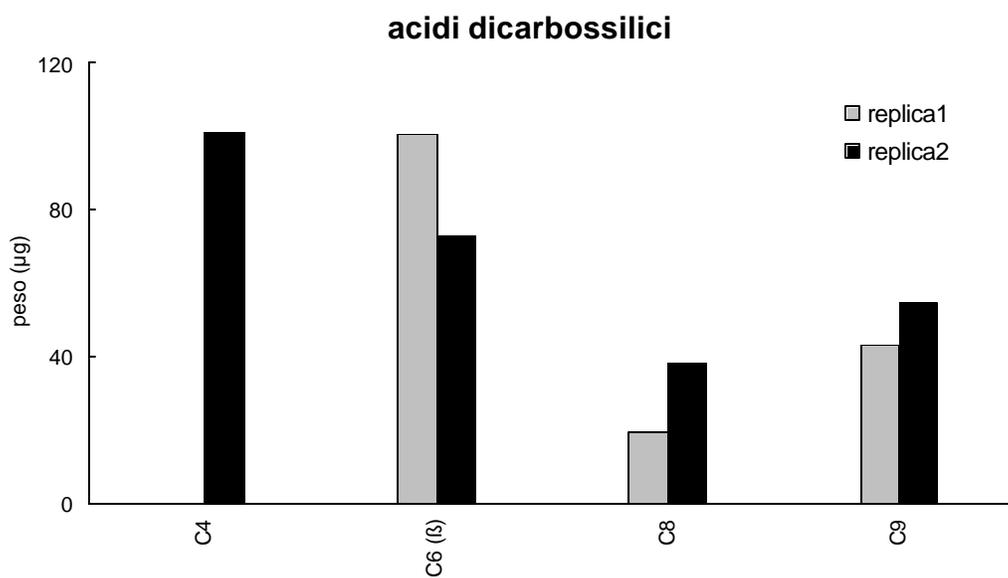
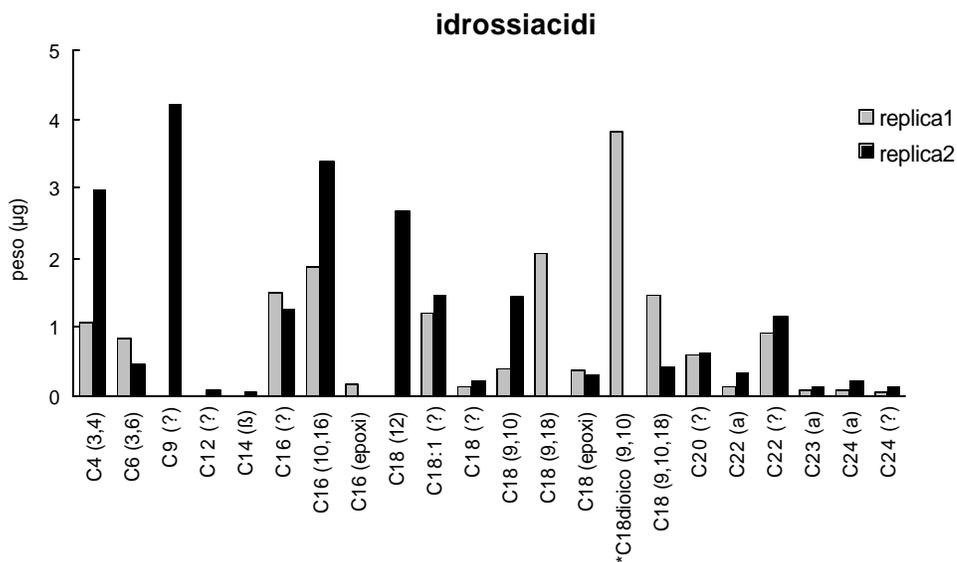
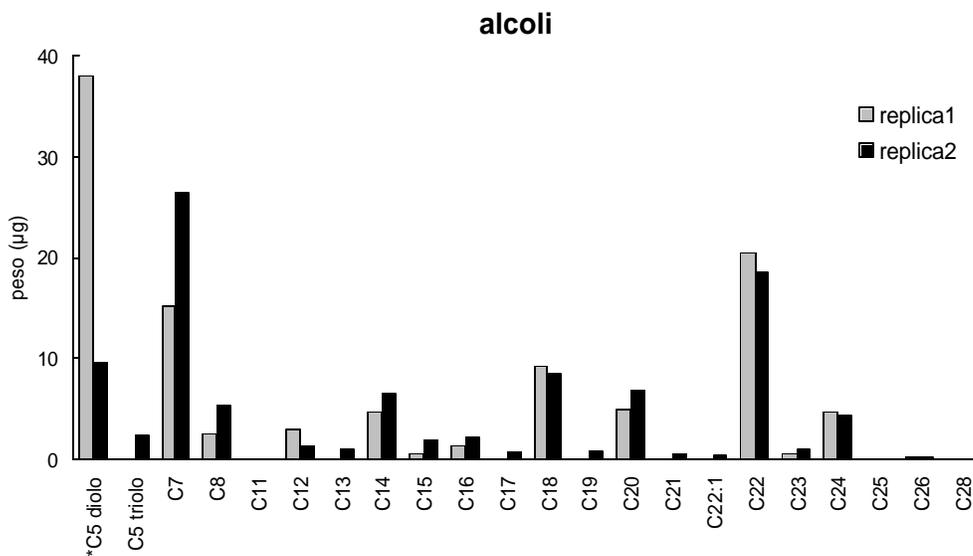


Figura 4.32: Pesi netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM 1 Vico. Le lettere (a, β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici.



(*: valore diviso per 20).

Figura 4.33: Pesi netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM 1 Vico.



(*: valore diviso per 2).

Tabella 4.9: Peso netto (mg) e concentrazione ($\text{mg g}^{-1}\text{TOC}$) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS negli estratti dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) delle due repliche del campione HUM 2 Vio.

PRODOTTI ESTRATTI	REPLICA 1	REPLICA 2
<i>TOTALE (mg)</i>	0.85	1.02
<i>TOTALE (mg g⁻¹TOC)</i>	3.10	3.71
acidi monocarbossilici (%)	34.7	24.7
acidi dicarbossilici (%)	23.3	27.3
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	6.4	11.3
α, β -idrossiacidi (%)	1.0	0.4
? -idrossiacidi (%)	2.8	2.6
alcoli (%)	21.8	13.1
alcani, alcheni (%)	1.2	3.5
composti aromatici (%)	5.5	14.0
steroli (%)	3.3	3.1

Figura 4.34: Pesi netti (μg) degli acidi monocarbossilici, saturi ed insaturi, identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM 2 Vico.

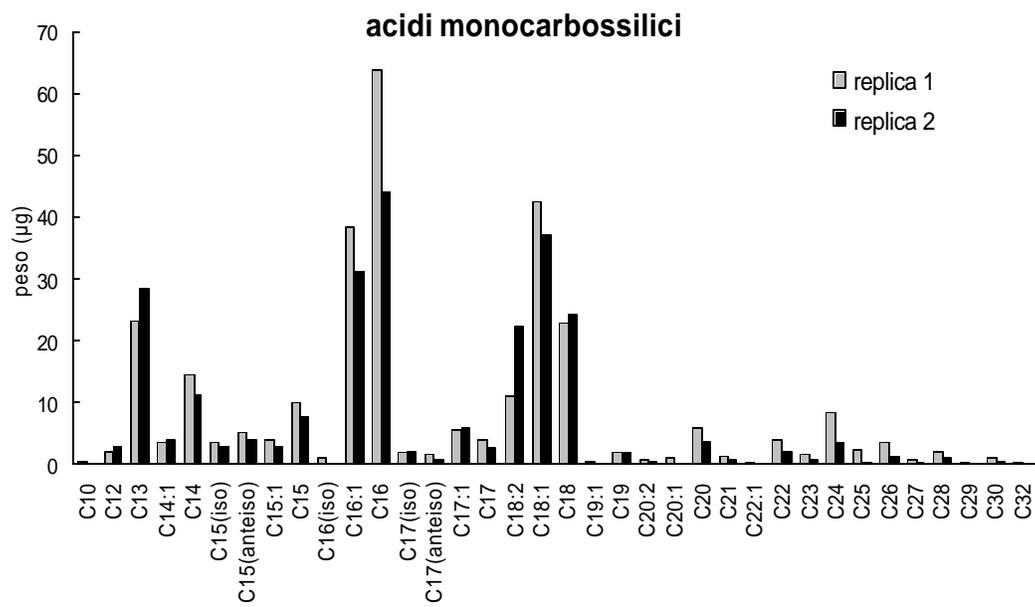


Figura 4.35: Pesi netti (μg) degli acidi dicarbossilici identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM2 Vico.

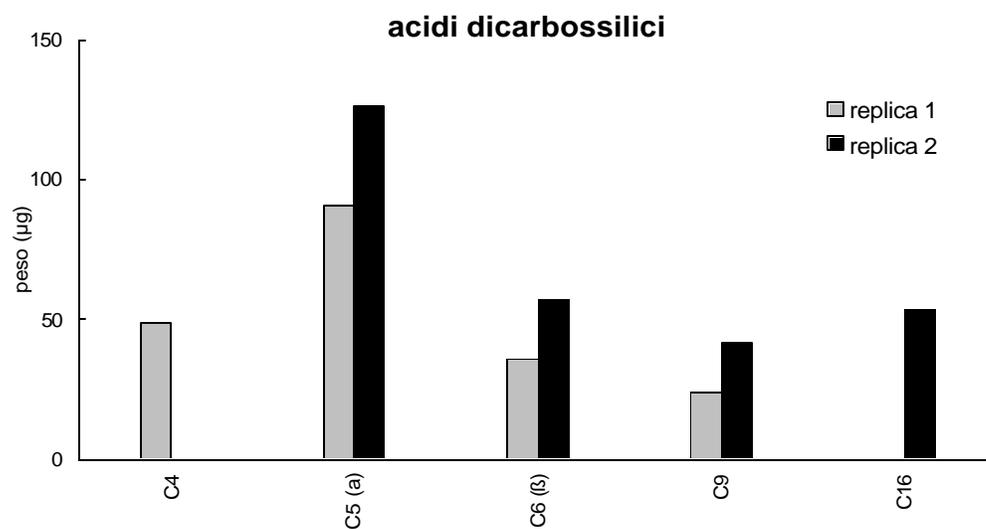
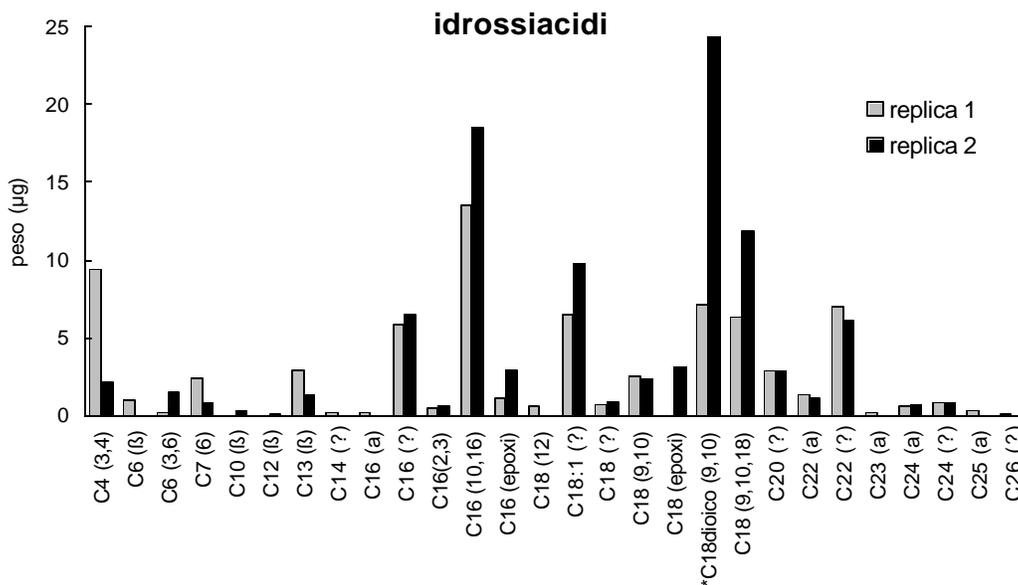


Figura 4.36: Pesi netti (μg) degli idrossiacidi identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM 2 Vico. Le lettere (a, β e ?) ed i numeri in parentesi si riferiscono alla posizione dei gruppi ossidrilici.



(*: valore diviso per 3).

Figura 4.37: Pesi netti (μg) degli alcoli identificati nelle due repliche dell'estratto dopo idrolisi alcalina (KOH in MeOH) del campione HUM 2 Vico.

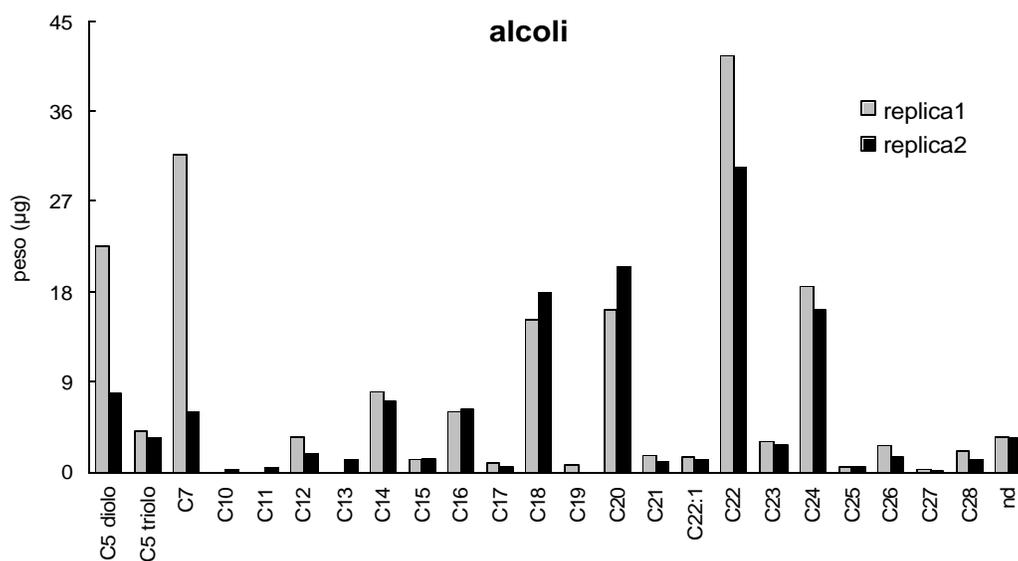


Tabella 4.10: Peso netto (mg) e concentrazione ($\text{mg g}^{-1}\text{TOC}$) dell'estratto organico totale e percentuali (%), relative al peso dell'estratto totale, di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS nelle tre frazioni estratte dal campione FA Vico.

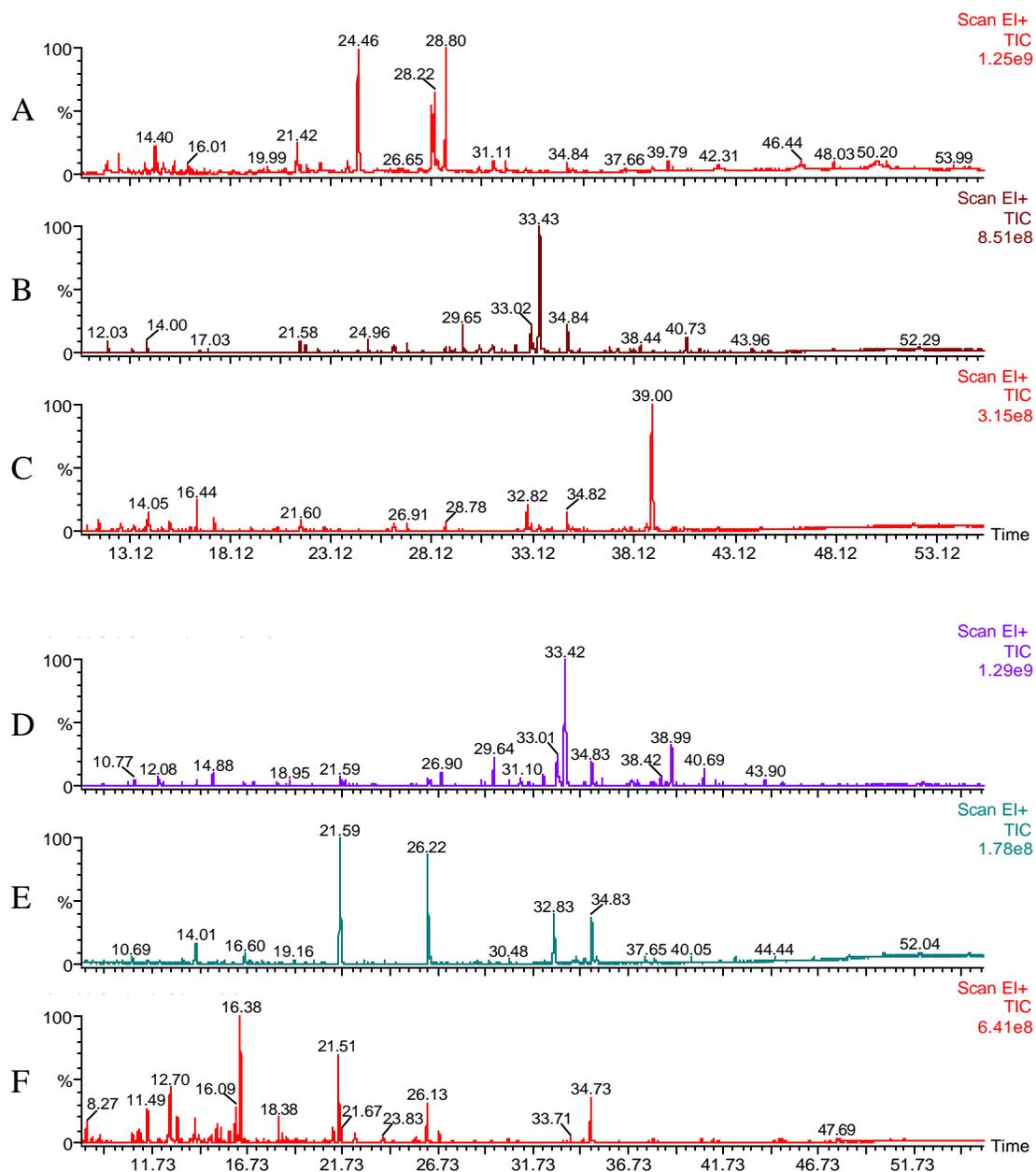
PRODOTTI ESTRATTI	LIPIDI LIBERI	TRANS-ESTERIFICAZ.	IDROLISI
<i>TOTALE (mg)</i>	<i>0.61</i>	<i>5.48</i>	<i>0.28</i>
<i>TOTALE (mg g⁻¹TOC)</i>	<i>1.70</i>	<i>15.30</i>	<i>0.78</i>
acidi monocarbossilici (%)	58.3	13.3	62.2
acidi dicarbossilici (%)	28.4	70.8	0.2
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi (%)	0.1	8.1	0.1
α,β -idrossiacidi (%)	1.1	1.7	5.6
? -idrossiacidi (%)	0.6	0.3	/
alcoli (%)	8.6	2.1	27.4
alcani, alcheni (%)	1.9	0.5	2.4
composti aromatici (%)	0.3	3.0	1.5
steroli (%)	0.7	0.2	0.6

PRODOTTI ESTRATTI ($\mu\text{g}; \mu\text{g g}^{-1}\text{TOC}$)	HA Vico			HUM 1 Vico			HUM 2 Vico		
	LIPIDI LIBERI	TRANS- ESTERIFICAZ	IDROLISI ALCALINA	LIPIDI LIBERI	TRANS- ESTERIFICAZ	IDROLISI ALCALINA	LIPIDI LIBERI	TRANS- ESTERIFICAZ	IDROLISI ALCALINA
<i>TOTALE</i>	15012.73; 60309.04	9067.82; 36427.19	994.51; 3995.14	2930.23; 35406.35	5858.57; 70789.87	589.61; 7124.33	16453.18; 59936.54	14329.79; 52201.34	938.31; 3418.13
acidi monocarbossilici	3643.48; 14636.56	539.15; 2165.87	226.51; 909.93	750.91; 9073.34	264.85; 3200.22	132.31; 1598.72	2304.75; 8395.87	493.78; 1798.77	274.15; 998.69
acidi dicarbossilici	3877.07; 15574.94	563.70; 2264.49	138.34; 555.74	1049.96; 12686.81	3531.41; 42670.49	215.02; 2598.12	11272.76; 41065.02	8885.41; 32368.26	238.90; 870.28
C ₁₆ , C ₁₈ di, tri-idrossiacidi	3014.18; 12108.54	2690.69; 10809.02	134.32; 539.59	247.20; 2986.95	731.87; 8843.28	46.96; 567.42	487.21; 1774.83	2291.73; 8348.44	85.31; 310.77
α, β -idrossiacidi	820.01; 3294.14	2516.43; 10108.99	99.54; 399.87	31.28; 377.96	52.20; 630.74	1.88; 22.72	190.71; 694.73	138.54; 504.68	7.01; 25.54
? -idrossiacidi	3218.69; 12930.10	1804.70; 7249.83	189.92; 762.94	199.75; 2413.61	174.87; 2112.98	6.78; 81.92	832.45; 3032.49	439.28; 1600.23	25.50; 92.89
alcoli	395.66; 1589.44	438.32; 1760.82	85.98; 345.40	389.48; 4706.14	222.07; 2683.30	127.42; 1539.63	814.82; 2968.27	493.08; 1796.22	159.85; 582.31
alcani, alcheni	43.64; 175.31	/	36.52; 146.71	20.13; 243.23	190.79; 2305.34	3.78; 45.67	7.01; 25.54	97.73; 356.02	22.72; 82.76
composti aromatici	/	436.91; 1755.15	53.63; 215.44	115.47; 1395.24	659.57; 7969.67	40.07; 484.17	276.80; 1008.34	1444.94; 5263.71	95.16; 346.65
steroli	/	77.93; 313.06	29.74; 119.47	126.04; 1522.96	30.93; 373.73	15.38; 185.84	266.67; 971.44	45.30; 165.02	29.71; 108.23

Tabella 4.11: Peso netto (μg) e concentrazione ($\mu\text{g g}^{-1}\text{TOC}$) dell'estratto organico totale e di ogni classe di composti identificati tramite GC/MS

nelle frazioni ottenute dopo ciascun passo della procedura di frazionamento dei campioni HA, HUM 1 e HUM 2 Vico. Ogni valore è la media di due repliche.

Figura 4.38: Cromatogrammi (TIC) GC/MS delle frazioni estratte dopo ogni passo della procedura di frazionamento del campione HA Vico. A: frazione dei lipidi liberi. B: frazione alifatica estratta dopo transesterificazione. C: frazione aromatica estratta dopo transesterificazione. D: frazione neutra estratta su fase solida dopo transesterificazione. E: frazione acida estratta su fase solida dopo transesterificazione. F: frazione estratta dopo idrolisi alcalina.



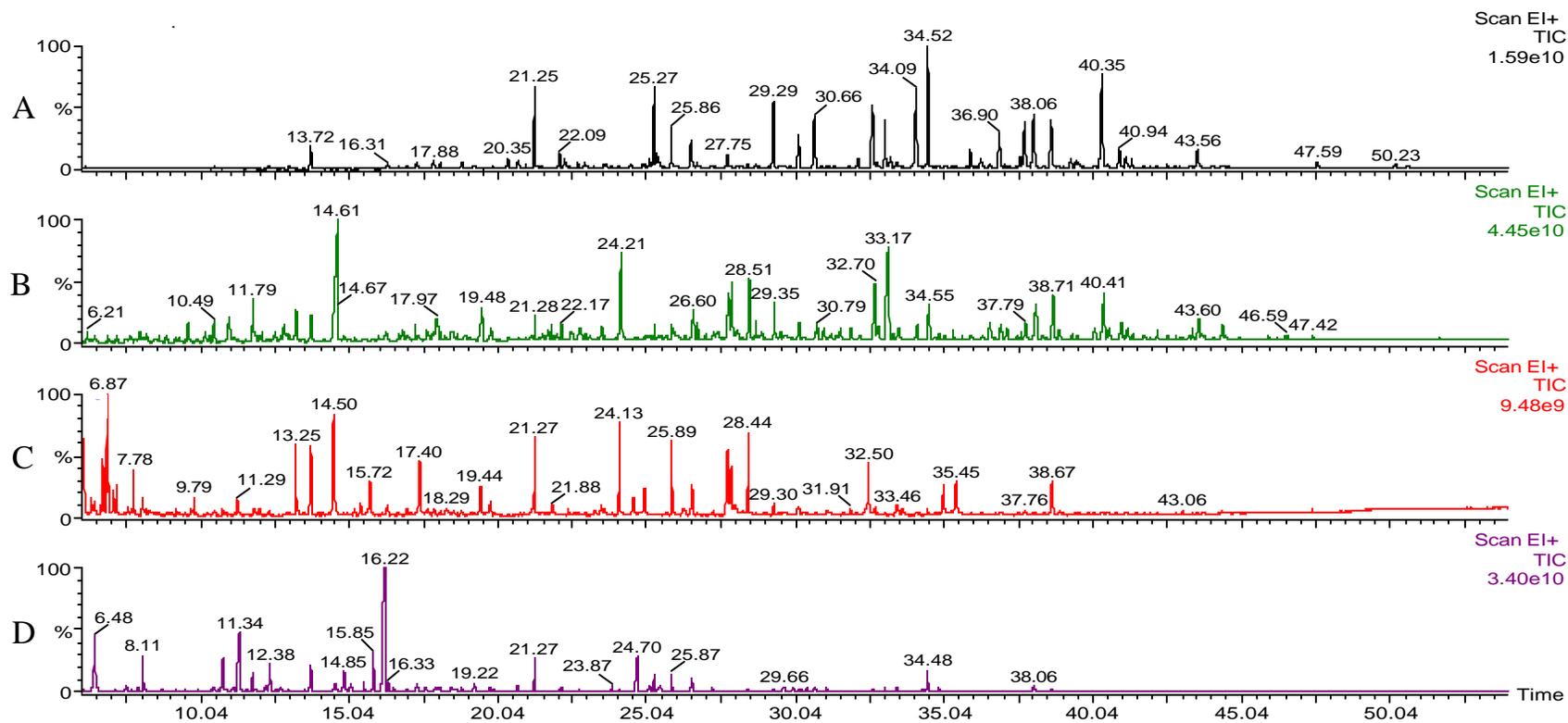


Figura 4.39: Cromatogrammi (TIC) GC/MS delle frazioni estratte dopo ogni passo della procedura di frazionamento del campione HUM 1 Vico. A: frazione dei lipidi liberi. B: frazione neutra estratta su fase solida dopo transesterificazione. C: frazione acida estratta su fase solida dopo transesterificazione. D: frazione estratta dopo idrolisi alcalina.

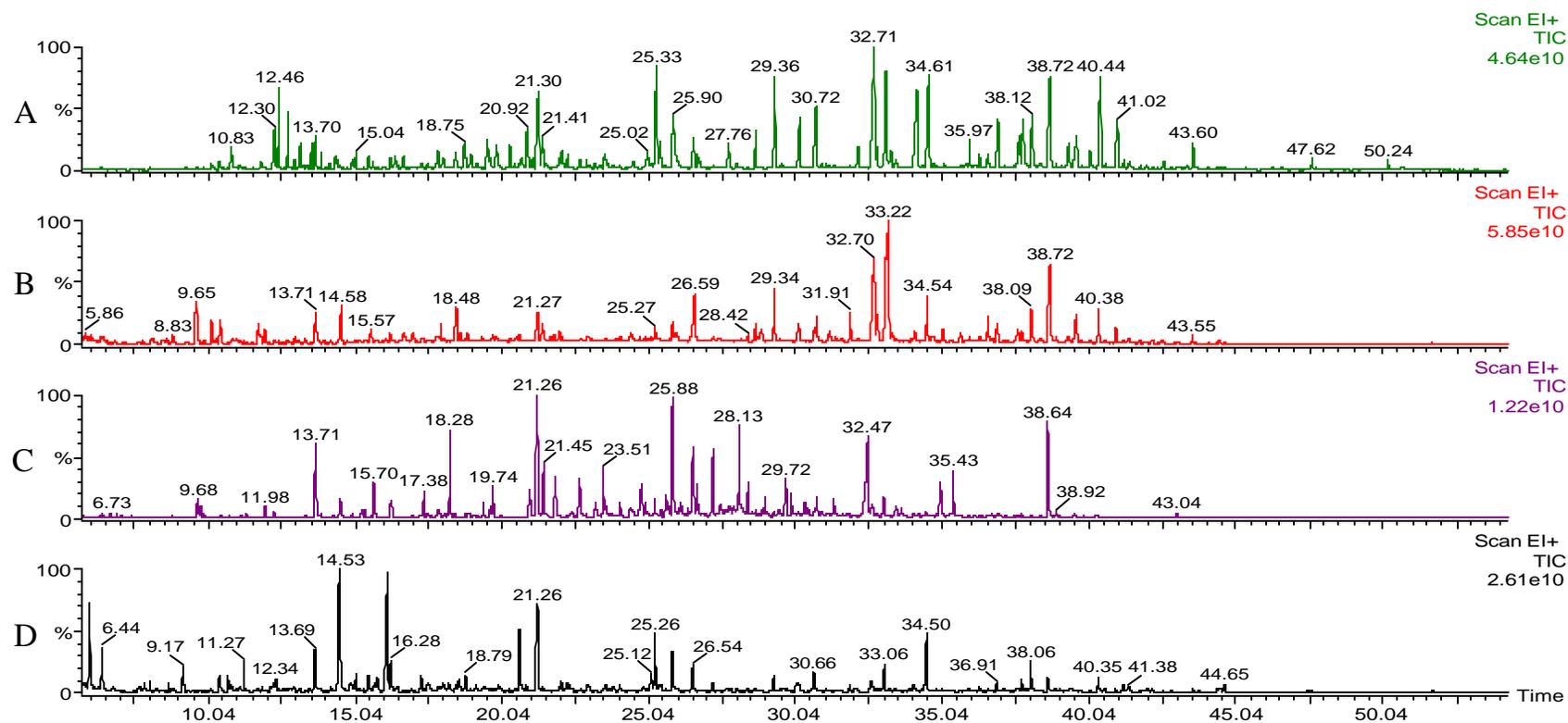


Figura 4.40: Cromatogrammi (TIC) GC/MS delle frazioni estratte dopo ogni passo della procedura di frazionamento del campione HUM 2 Vico. A: frazione dei lipidi liberi. B: frazione neutra estratta su fase solida dopo transesterificazione. C: frazione acida estratta su fase solida dopo transesterificazione. D: frazione estratta dopo idrolisi alcalina.

Tabella 4.12: Principali prodotti di pirolisi identificati nelle frazioni acquose e nei residui solidi dei campioni HA, FA, HUM 1 e HUM 2 da Vico.

No.	COMPOSTI	No.	COMPOSTI
1	fenolo	33	3-etil-2,4,5-trimetil-1H-pirrolo
2	metil fenolo	34	1H-pirrolo-2-carbossaldeide
3	dimetil fenolo	35	metil pirrolidindione
4	trimetil fenolo	36	1-(1-oxo-2-propenil)-2-pirrolidinone
5	metossi fenolo	37	ac.1-etil pirrolidin -2-carbossilico,etil est
6	benzonitrile	38	piperazina
7	benzaldeide	39	pirazolo
8	alchil benzene	40	4,5-diidro-3,4,5-trimetil-1H-pirazolo
9	metossi benzene	41	2,6-dietil pirazina
10	dimetossi benzene	42	metil piridina
11	trimetossi benzene	43	dimetil pirimidindione
12	ac.benzoico,metil est	44	metil indolo
13	ac.metilbenzoico,metil est	45	dimetil indolo
14	ac.metossibenzoico,metil est	46	metossi indolo
15	ac.dimetossibenzoico,metil est	47	2-metil-1H-isoindole-1,3-dione
16	ac.benzendicarbossilico,dimetil est	48	metil indene
17	ac.isochinolinacetico	49	dimetil indene
18	antracene	50	5-oxo prolina,metil est
19	naftalene	51	N-(N-acetil-L-leucil) leucina,butil est
20	metil naftalene	52	urea
21	dimetil naftalene	53	tetraetil urea
22	metossi acetofenone	54	tetrametil 1,2-etandiammina
23	dimetossi acetofenone	55	metil carbamato
24	dimetossi toluene	56	ac.dietil carbamico,metil est
25	ac.furancarbossilico,propil est	57	2,5-dimetil benzotiofene
26	5-etil-2-furaldeide	58	squalene
27	2,4-dimetil furano	59	sitosterolo
28	metil benzofurano	60	non determinato
29	metil dibenzofurano	†	acidi monocarbossilici saturi
30	metossi benzofurano	?	acidi monocarbossilici insaturi
31	4-metossi-3-metil isobenzofuranone	?	acidi dicarbossilici
32	1,5,5-trimetil imidazolidindione	?	coppie alcheni-alcani

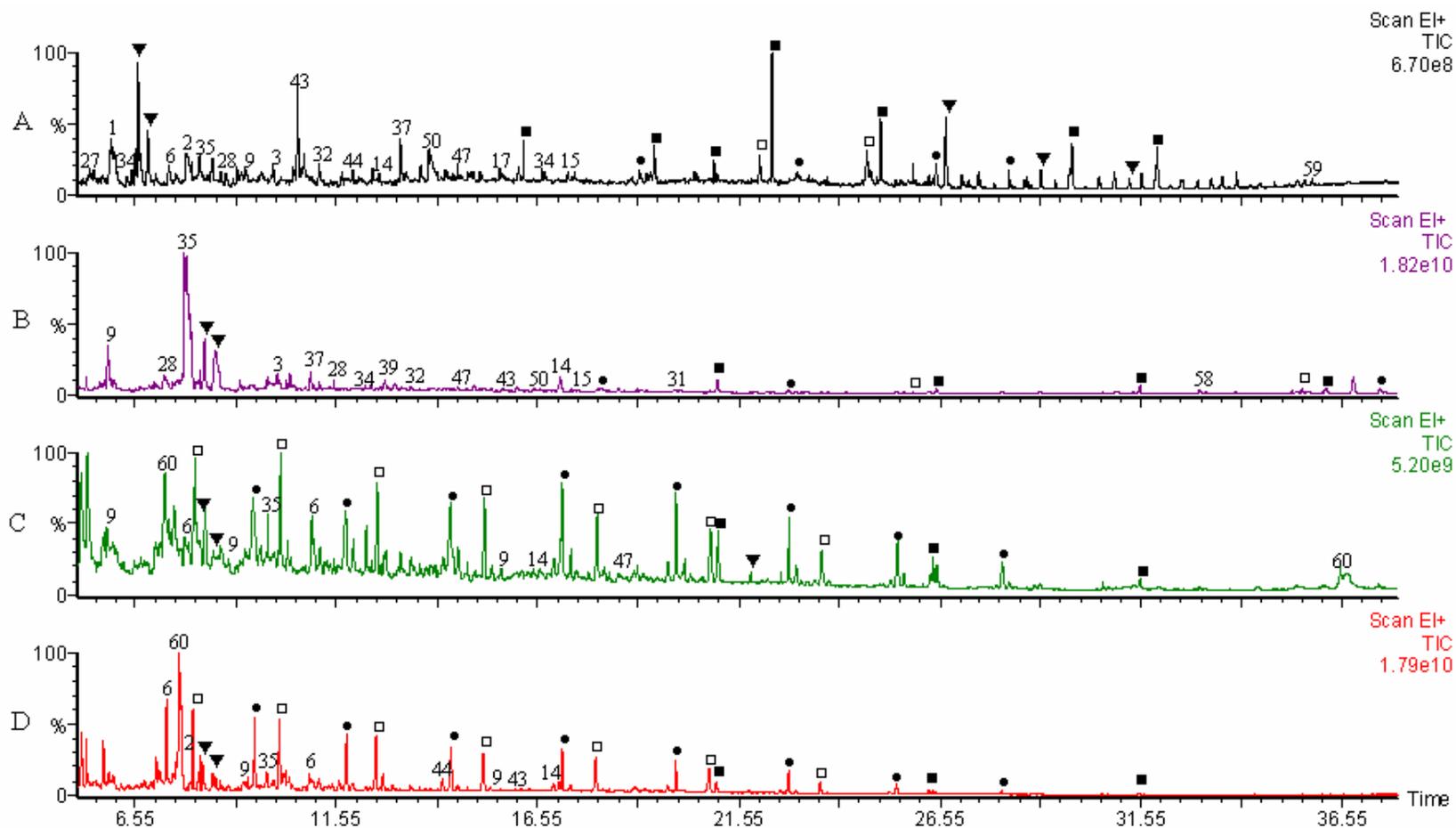


Figura 4.41: Pirogrammi-GC/MS (TIC) delle frazioni acquose derivanti dalla reazione di transesterificazione dei seguenti campioni: A) HA Vico; B) FA Vico; C) HUM 1 Vico; D) HUM 2 Vico. I numeri dei picchi corrispondono ai composti elencati in *Tabella 4.12*.

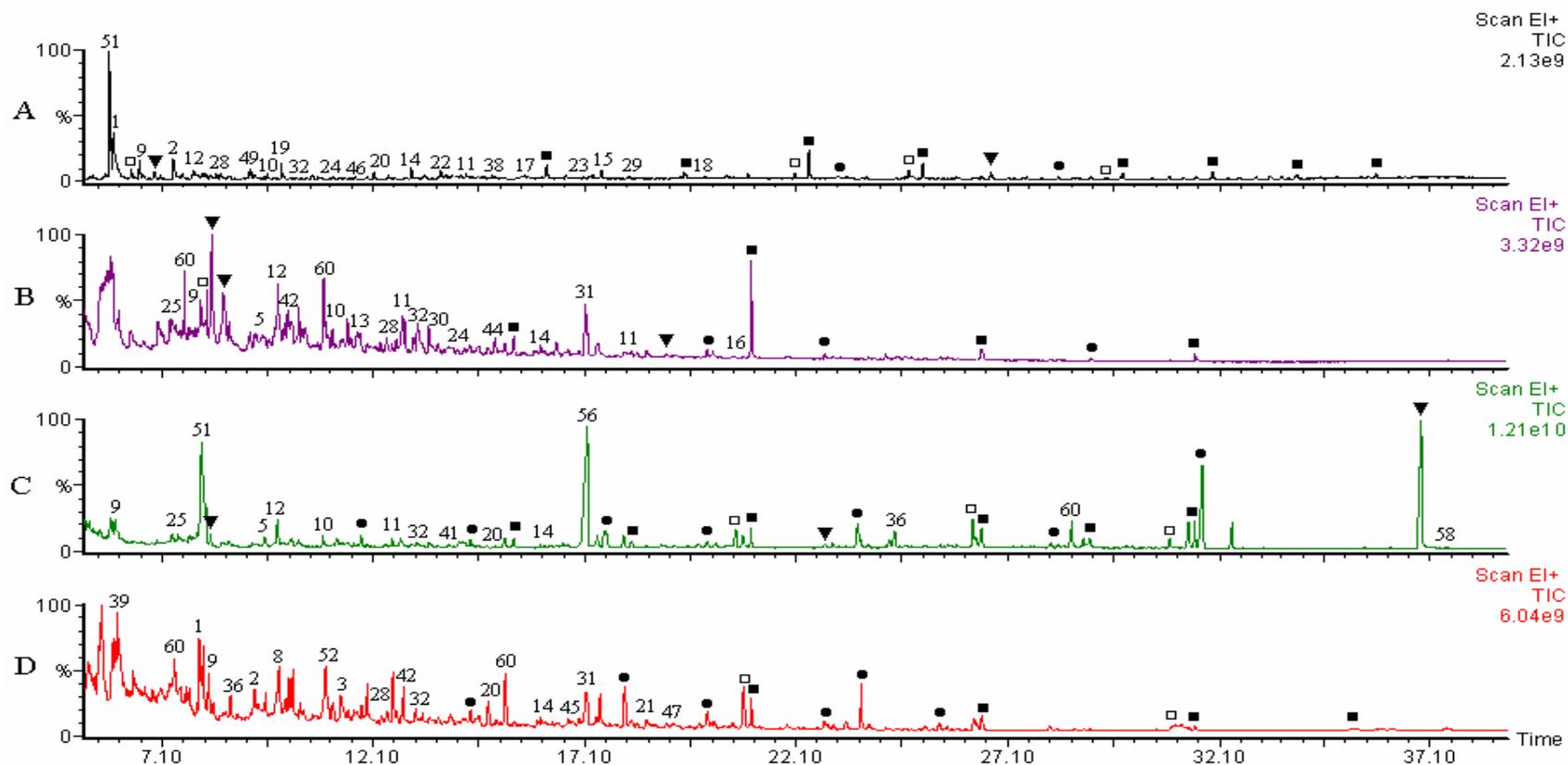


Figura 4.42: Pirogrammi-GC/MS (TIC) dei residui solidi derivanti dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH) dei seguenti campioni: A) HA Vico; B) FA Vico; C) HUM 1 Vico; D) HUM 2 Vico. I numeri dei picchi corrispondono ai composti elencati in *Tabella 4.12*.

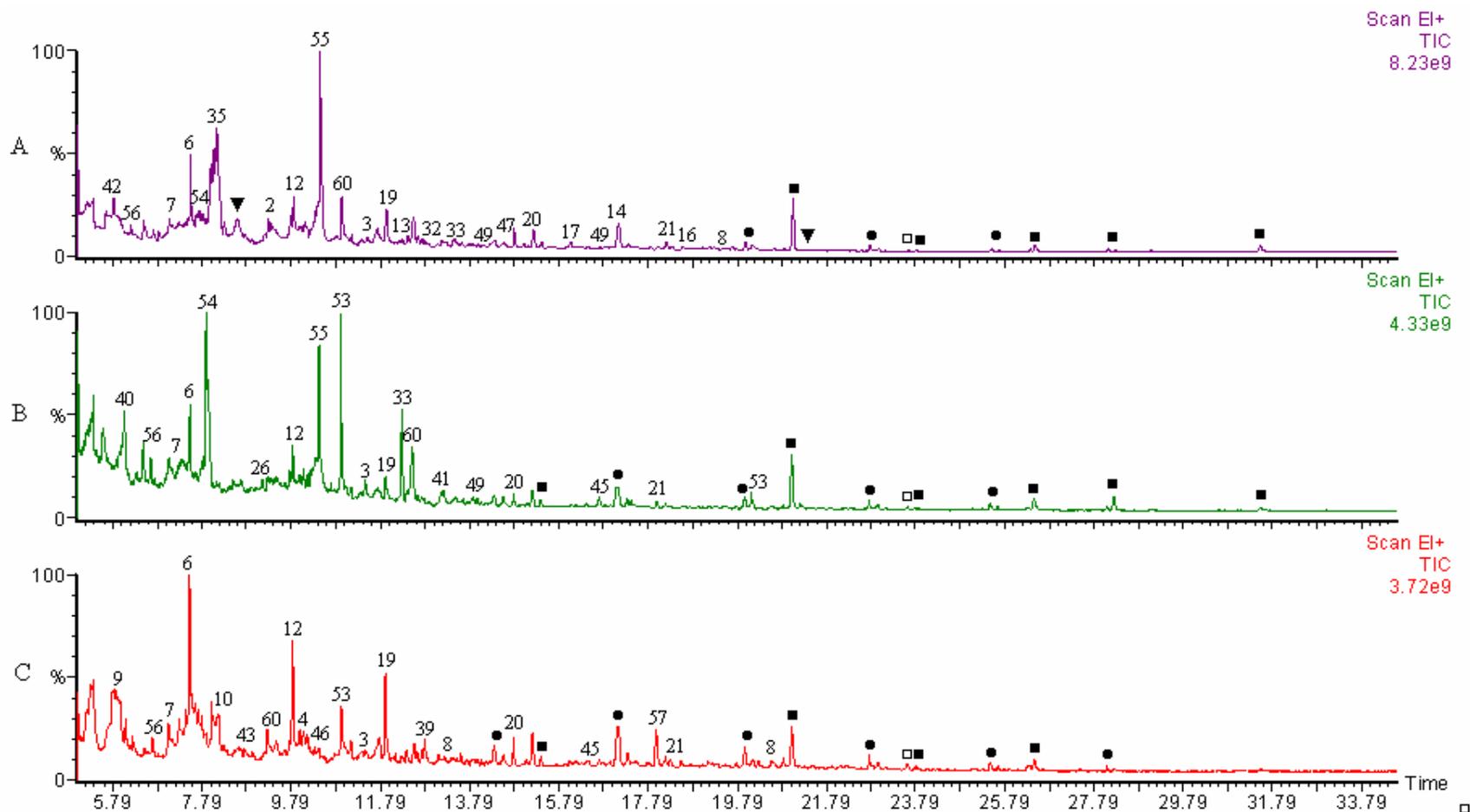


Figura 4.43: Pirogrammi GC/MS (TIC) dei residui solidi derivanti dalla reazione con HI dei seguenti campioni: A) HA Vico; B) HUM 1 Vico; C) HUM 2 Vico. I numeri dei picchi corrispondono ai composti elencati in *Tabella 4.12*.

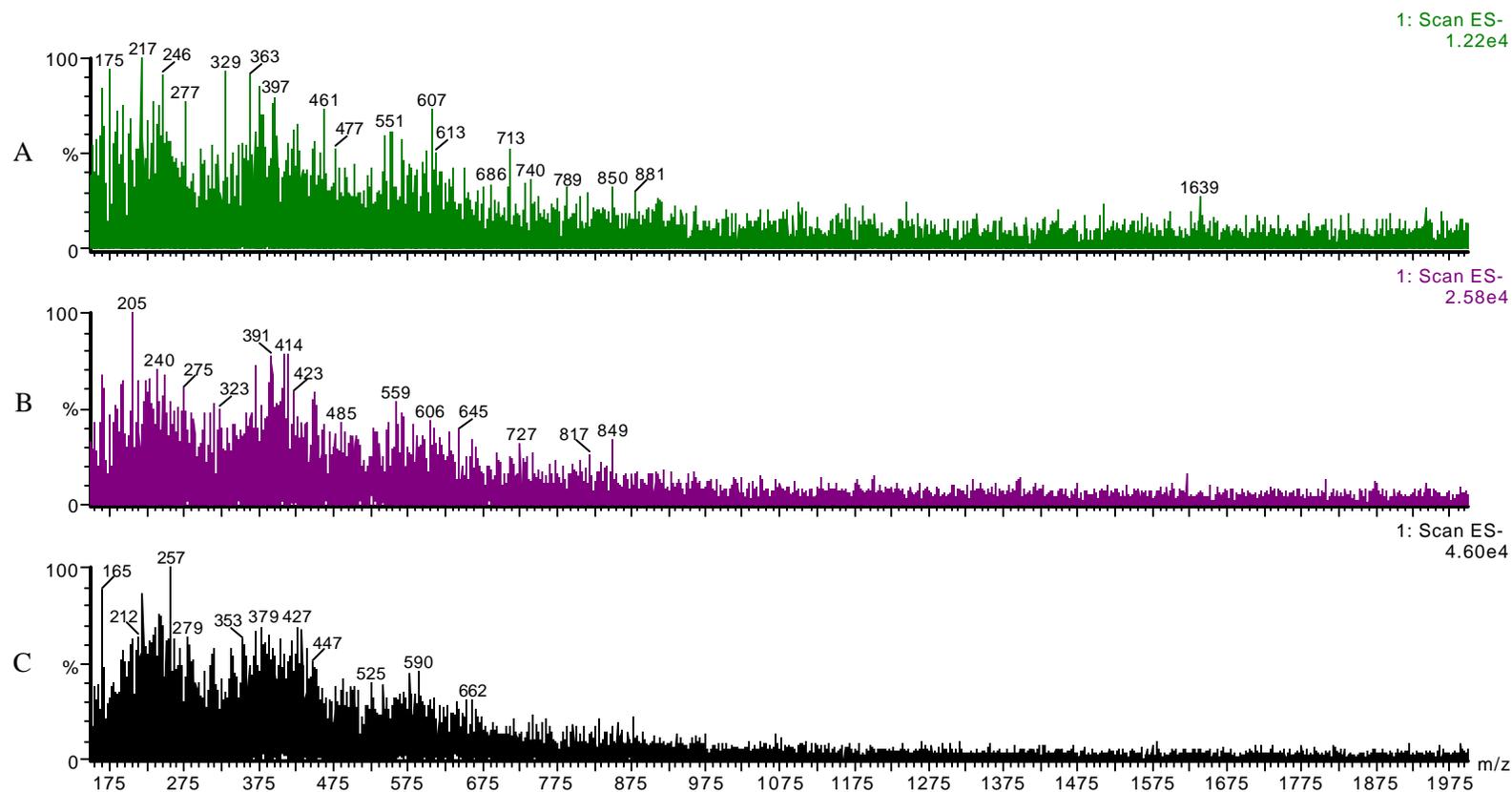


Figura 4.44: Spettri ESI/MS del campione HA Vico tal quale, ottenuti a -150 V, utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di acetato di ammonio 0.1 M/acetonitrile ed iniettando per infusione diretta: A) 20 μ L; B) 40 μ L e C) 60 μ L di campione.

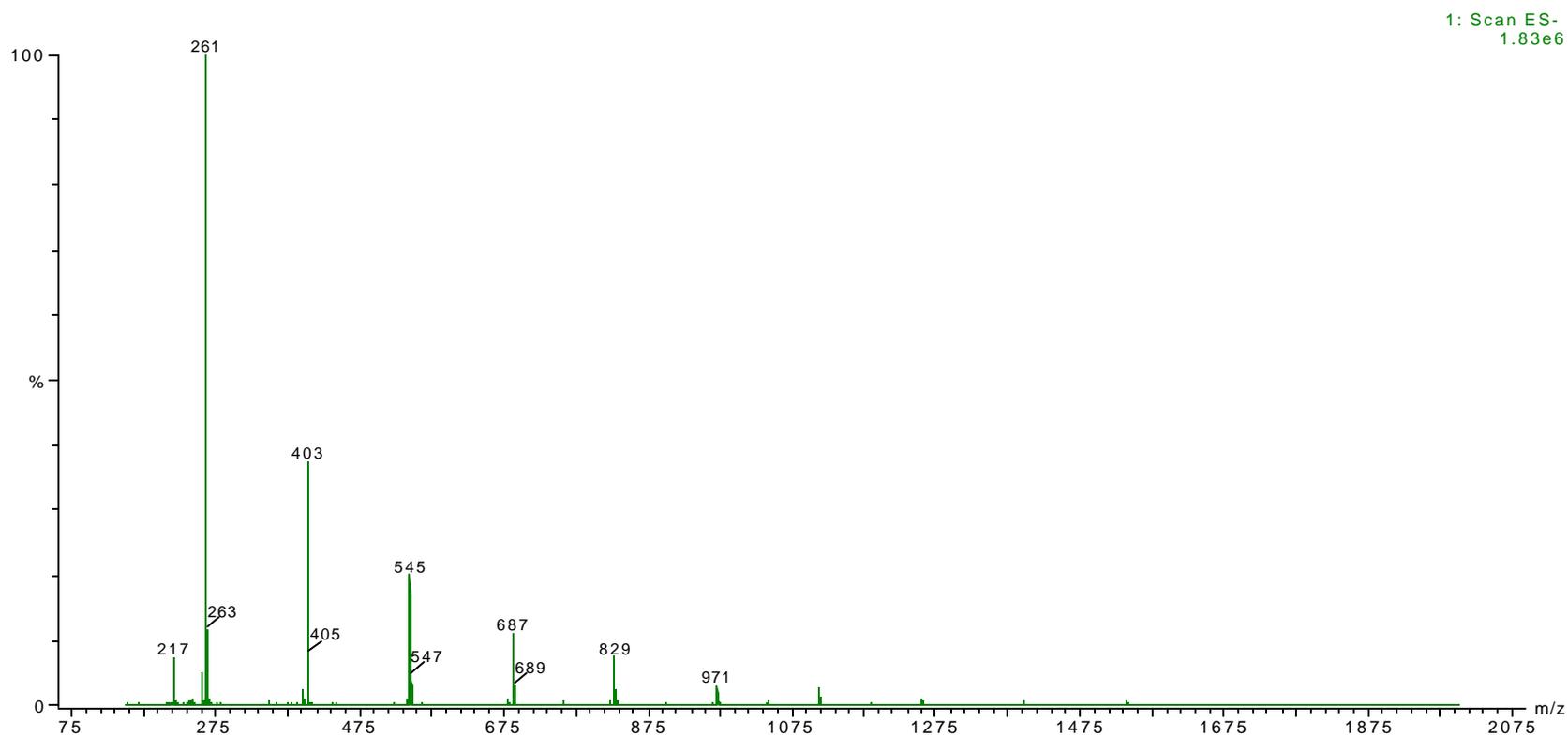


Figura 4.45: Spettro ESI/MS della frazione acquosa separata dopo trattamento con HI del campione HA Vico, ottenuto a -150 V, utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di acetato di ammonio 0.1 M/acetonitrile ed iniettando per infusione diretta 40 μ L di campione.

Tabella 4.13: Valori (espressi in Da) dei pesi molecolari medi numerici (M_n) e ponderali (M_w) calcolati dagli spettri ESI/MS, ottenuti utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di acetato di ammonio 0.1 M/acetone, delle diverse frazioni del campione HA Vico. Ogni valore è la media di tre misure. I valori delle deviazioni standard sono riportati tra parentesi.

		<i>replica 1</i>			<i>replica 2</i>		
		<i>20 μL</i>	<i>40 μL</i>	<i>60 μL</i>	<i>20 μL</i>	<i>40 μL</i>	<i>60 μL</i>
<u><i>tal quale</i></u>							
-90v	Mn =	750(\pm 30)	654(\pm 38)	582(\pm 14)	/	/	/
	Mw =	1080(\pm 39)	943(\pm 51)	823(\pm 21)	/	/	/
-150v	Mn =	713(\pm 26)	609(\pm 32)	543(\pm 12)	/	/	/
	Mw =	1041(\pm 30)	890(\pm 42)	774(\pm 24)	/	/	/
<u><i>residuo>KOH</i></u>							
-90v	Mn =	791(\pm 39)	740(\pm 36)	672(\pm 15)	874(\pm 43)	701(\pm 9)	673(\pm 32)
	Mw =	1110(\pm 39)	1044(\pm 40)	939(\pm 23)	1190(\pm 34)	1020(\pm 18)	959(\pm 45)
-150v	Mn =	789(\pm 43)	704(\pm 36)	623(\pm 11)	833(\pm 41)	668(\pm 19)	634(\pm 30)
	Mw =	1100(\pm 47)	999(\pm 47)	877(\pm 16)	1147(\pm 42)	958(\pm 31)	903(\pm 43)
<u><i>residuo>HI</i></u>							
-90v	Mn =	901(\pm 36)	759(\pm 44)	663(\pm 34)	/	/	/
	Mw =	1235(\pm 17)	1107(\pm 44)	1002(\pm 42)	/	/	/
-150v	Mn =	944(\pm 25)	786(\pm 15)	722(\pm 4)	/	/	/
	Mw =	1254(\pm 16)	1111(\pm 10)	1046(\pm 7)	/	/	/
<u><i>fase acquosa dopo transesterificazione</i></u>							
-90v	Mn =	828(\pm 18)	662(\pm 27)	704(\pm 15)	701(\pm 56)	622(\pm 34)	615(\pm 6)
	Mw =	1184(\pm 18)	1000(\pm 28)	997(\pm 17)	1009(\pm 61)	894(\pm 40)	863(\pm 1)
-150v	Mn =	828(\pm 2)	651(\pm 18)	636(\pm 17)	662(\pm 53)	642(\pm 125)	558(\pm 3)
	Mw =	1179(\pm 1)	1000(\pm 15)	929(\pm 23)	959(\pm 71)	913(\pm 176)	782(\pm 1)

Figura 4.46: Cromatogrammi TIC (A e B) e rispettivi spettri ESI/MS (C e D) del campione HA Vico tal quale, ottenuti a -150 V, iniettando per infusione diretta 40 μ L di campione ed utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di: A) acetato di ammonio 0.1 M/acetonitrile e B) ammoniaca 0.05%/acetonitrile.

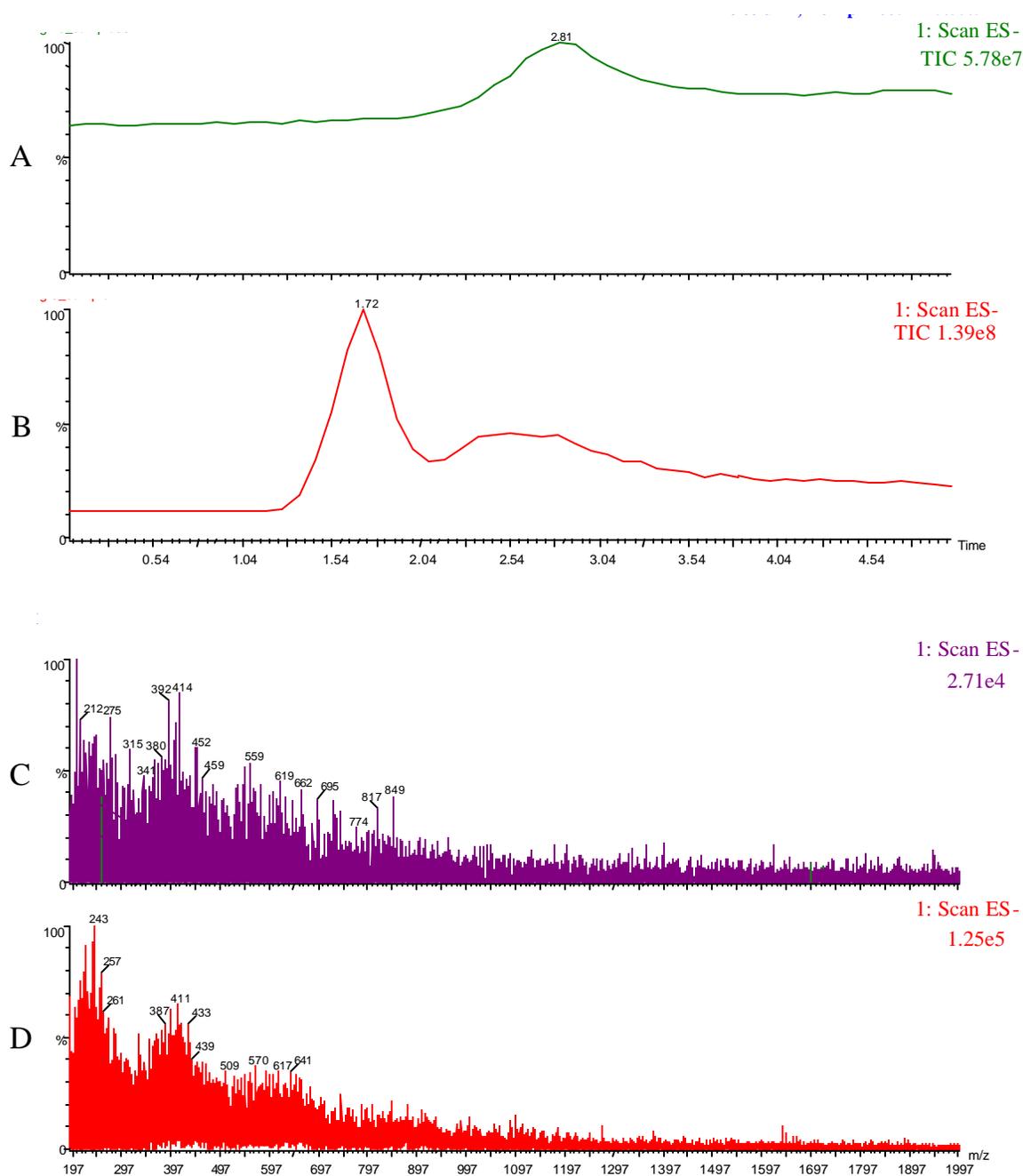


Tabella 4.14: Valori (espressi in Da) dei pesi molecolari medi numerici (M_n) e ponderali (M_w) calcolati dagli spettri ESI/MS, ottenuti utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di ammoniaca 0.05%/acetonitrile ed iniettando 40 μ L di campione. Ogni valore è la media di tre misure. I valori delle deviazioni standard sono riportati tra parentesi.

	HA VICO		HA PORTICI		FA VICO		
	<i>replica 1</i>	<i>replica 2</i>	<i>replica 1</i>	<i>replica 2</i>	<i>replica 1</i>	<i>replica 2</i>	
<u>tal quale</u>							
-90v	Mn =	531(\pm 16)	/	561(\pm 8)	/	497(\pm 6)	/
	Mw =	709(\pm 30)	/	812(\pm 14)	/	754(\pm 4)	/
-150v	Mn =	505(\pm 11)	/	479(\pm 6)	/	480(\pm 5)	/
	Mw =	682(\pm 26)	/	703(\pm 10)	/	728(\pm 6)	/
<u>residuo>KOH</u>							
-90v	Mn =	572(\pm 2)	587(\pm 16)	626(\pm 9)	/	/	/
	Mw =	727(\pm 8)	752(\pm 17)	898(\pm 13)	/	/	/
-150v	Mn =	556(\pm 1)	567(\pm 8)	536(\pm 4)	/	/	/
	Mw =	723(\pm 6)	744(\pm 11)	774(\pm 13)	/	/	/
<u>residuo>HI</u>							
-90v	Mn =	605(\pm 2)	/	523(\pm 5)	/	/	/
	Mw =	782(\pm 1)	/	795(\pm 5)	/	/	/
-150v	Mn =	594(\pm 10)	/	521(\pm 7)	/	/	/
	Mw =	786(\pm 8)	/	771(\pm 10)	/	/	/
<u>fase acquosa dopo transesterificazione</u>							
-90v	Mn =	509(\pm 11)	528(\pm 6)	634(\pm 5)	/	579(\pm 5)	564(\pm 3)
	Mw =	735(\pm 22)	712(\pm 6)	890(\pm 5)	/	788(\pm 9)	774(\pm 2)
-150v	Mn =	495(\pm 3)	508(\pm 5)	521(\pm 1)	/	500(\pm 7)	494(\pm 2)
	Mw =	715(\pm 9)	691(\pm 8)	739(\pm 2)	/	679(\pm 12)	670(\pm 3)

Tabella 4.15: Valori (espressi in Da) dei pesi molecolari medi numerici (M_n) e ponderali (M_w) calcolati dagli spettri ESI/MS, ottenuti dopo HPSEC analitico *on-line*, utilizzando come solvente una soluzione acquosa 9:1 (v/v) di ammoniacca 0.05%/acetonitrile. Ogni valore è la media di tre misure. I valori delle deviazioni standard sono riportati tra parentesi.

		HA VICO		HA PORTICI		FA VICO	
		<i>replica 1</i>	<i>replica 2</i>	<i>replica 1</i>	<i>replica 2</i>	<i>replica 1</i>	<i>replica 2</i>
<u>tal quale</u>							
-90v	Mn =	577(±15)	/	570(±21)	/	454(±25)	/
	Mw =	742(±30)	/	812(±37)	/	650(±50)	/
-150v	Mn =	488(±5)	/	438(±27)	/	381(±14)	/
	Mw =	616(±17)	/	590(±58)	/	479(±28)	/
<u>residuo>KOH</u>							
-90v	Mn =	594(±0)	593(±1)	672(±25)	/	/	/
	Mw =	783(±1)	745(±1)	937(±42)	/	/	/
-150v	Mn =	586(±3)	584(±0)	555(±16)	/	/	/
	Mw =	752(±3)	743(±1)	775(±28)	/	/	/
<u>residuo>HI</u>							
-90v	Mn =	646(±4)	/	606(±39)	/	/	/
	Mw =	809(±10)	/	854(±45)	/	/	/
-150v	Mn =	638(±12)	/	575(±3)	/	/	/
	Mw =	815(±22)	/	814(±8)	/	/	/
<u>fase acquosa dopo transesterificazione</u>							
-90v	Mn =	/	/	656(±5)	/	576(±4)	/
	Mw =	/	/	919(±5)	/	776(±4)	/
-150v	Mn =	/	/	542(±10)	/	497(±2)	/
	Mw =	/	/	780(±34)	/	661(±4)	/

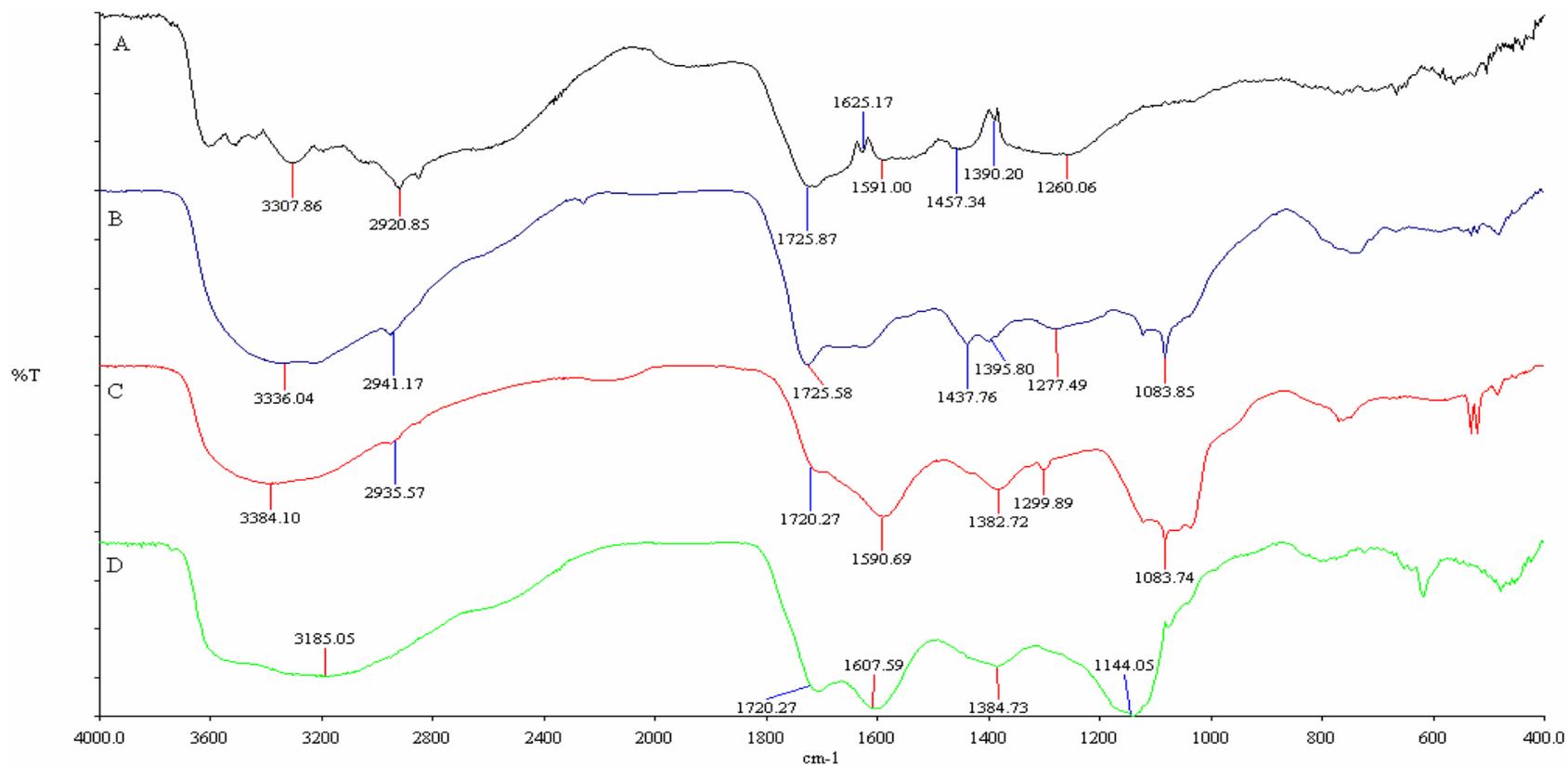


Figura 4.47: Spettri IR delle seguenti frazioni del campione di acido umico (HA) estratto dal suolo di Vico: A) tal quale; B) frazione acquosa derivante dalla reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-MeOH}$; C) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); D) residuo solido derivante dalla reazione con HI .

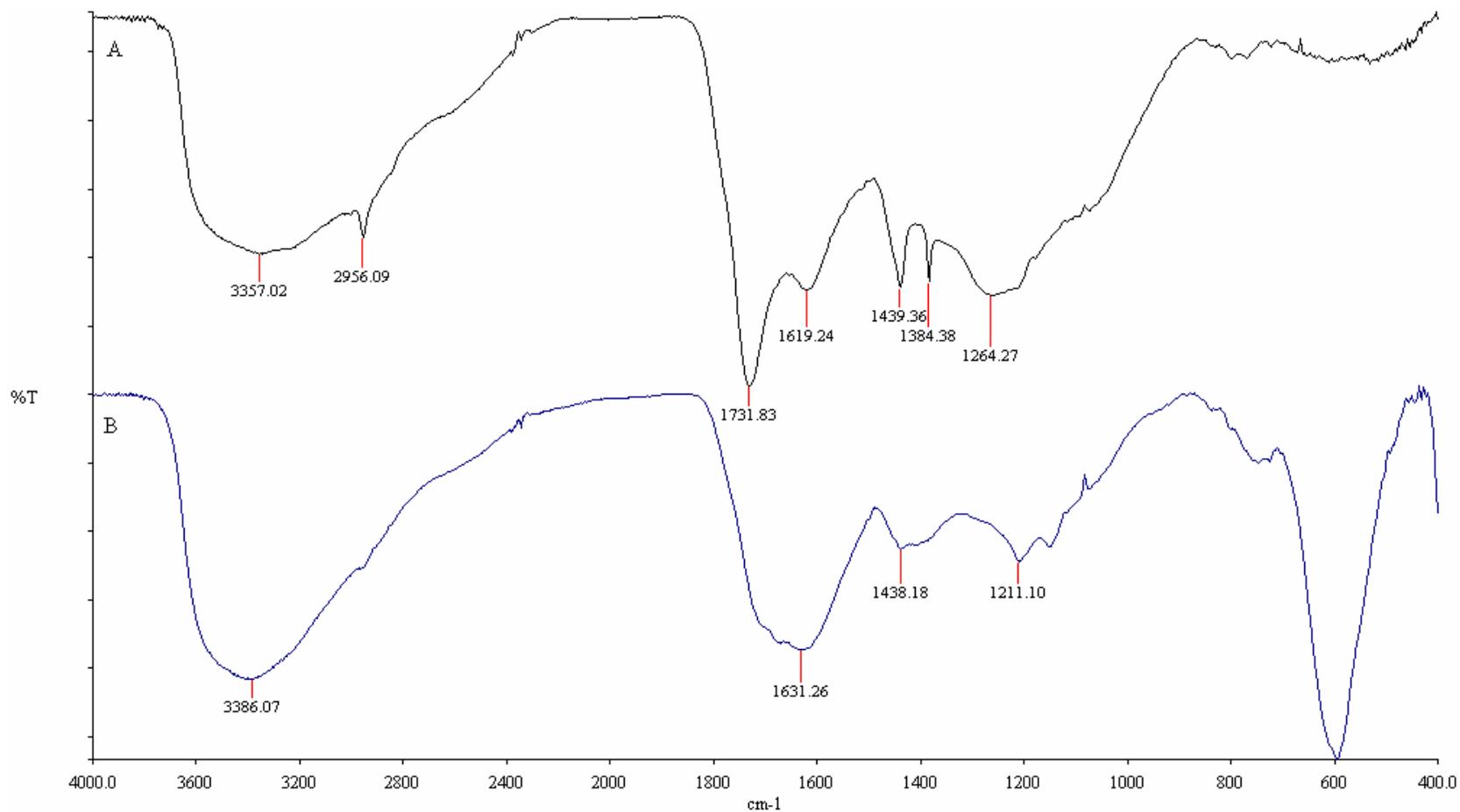


Figura 4.48: Spettri IR delle seguenti frazioni del campione di acido fulvico (FA) estratto dal suolo di Vico: A) tal quale; B) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH).

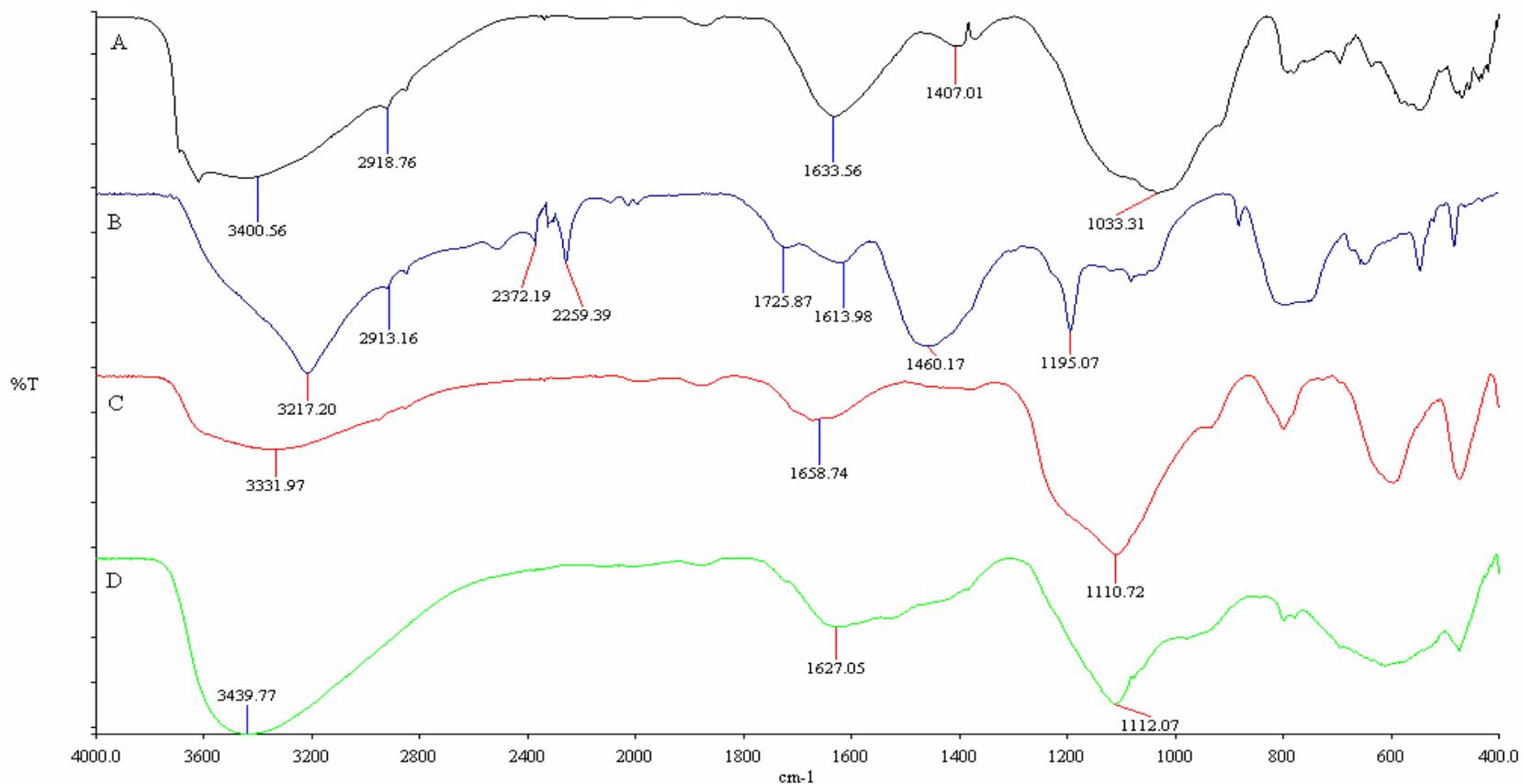


Figura 4.49: Spettri IR delle seguenti frazioni del campione di umina (HUM 1) estratta dal suolo di Vico: A) tal quale; B) frazione acquosa derivante dalla reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-MeOH}$; C) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); D) residuo solido derivante dalla reazione con HI .

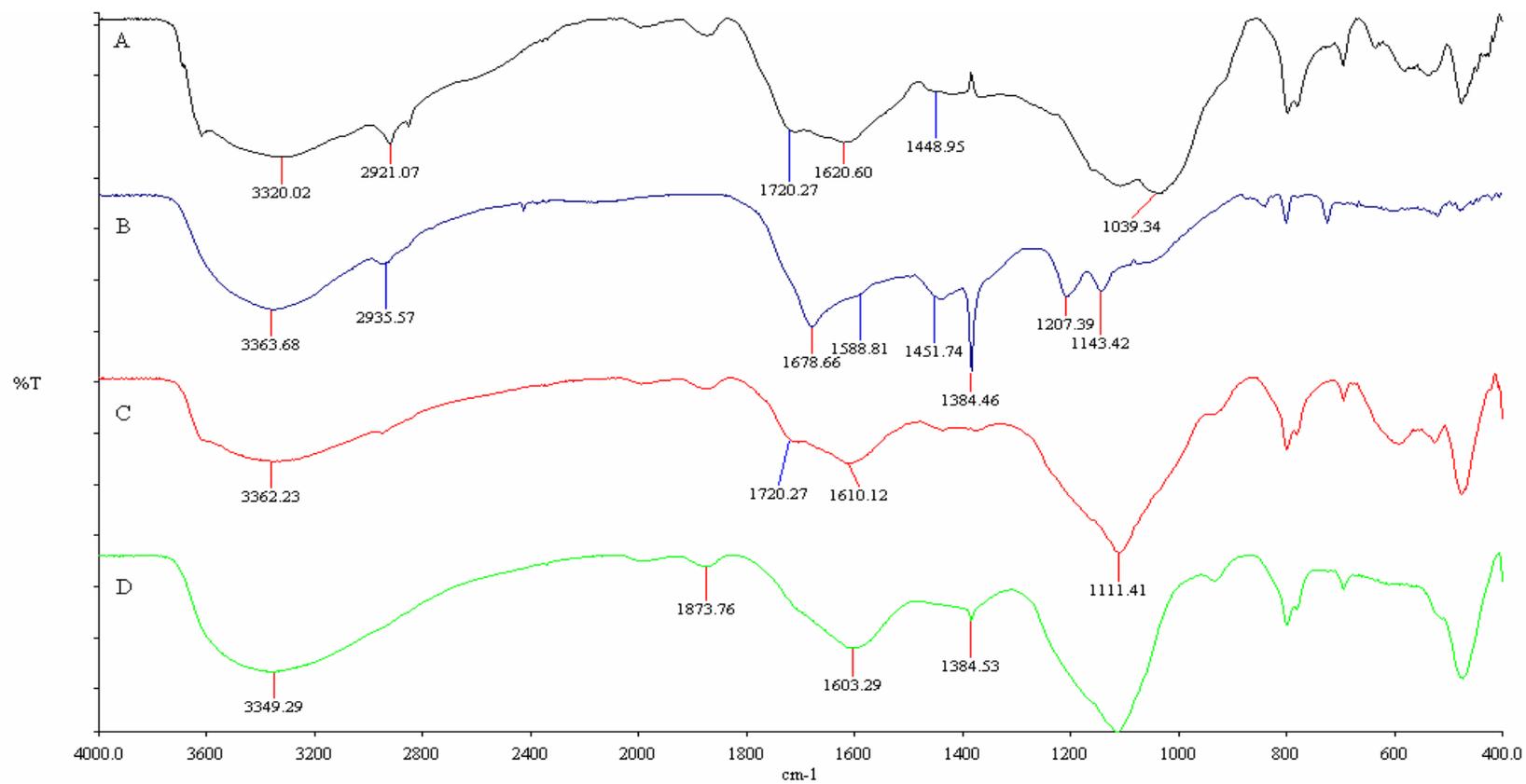


Figura 4.50: Spettri IR delle seguenti frazioni del campione di umina trattata (HUM 2) estratta dal suolo di Vico: A) tal quale; B) frazione acquosa derivante dalla reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-MeOH}$; C) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); D) residuo solido derivante dalla reazione con HI .

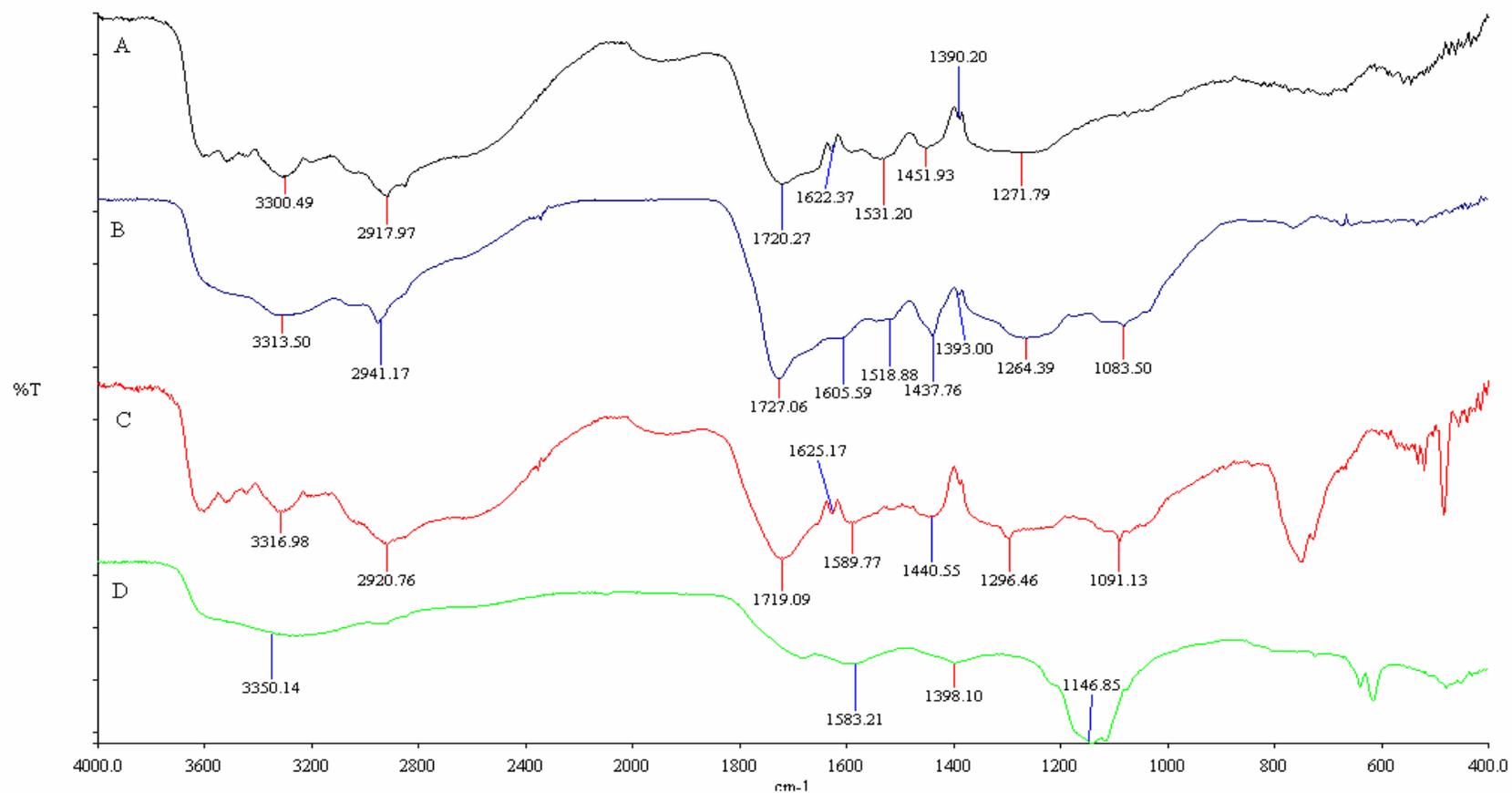


Figura 4.51: Spettri IR delle seguenti frazioni del campione di acido umico (HA) estratto dal suolo di Portici: A) tal quale; B) frazione acquosa derivante dalla reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-MeOH}$; C) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); D) residuo solido derivante dalla reazione con HI .

Figura 4.52: Spettri CPMAS- ^{13}C -NMR delle seguenti frazioni del campione di acido umico (HA) estratto dal suolo di Vico: A) tal quale; B) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); C) residuo solido derivante dalla reazione con HI.

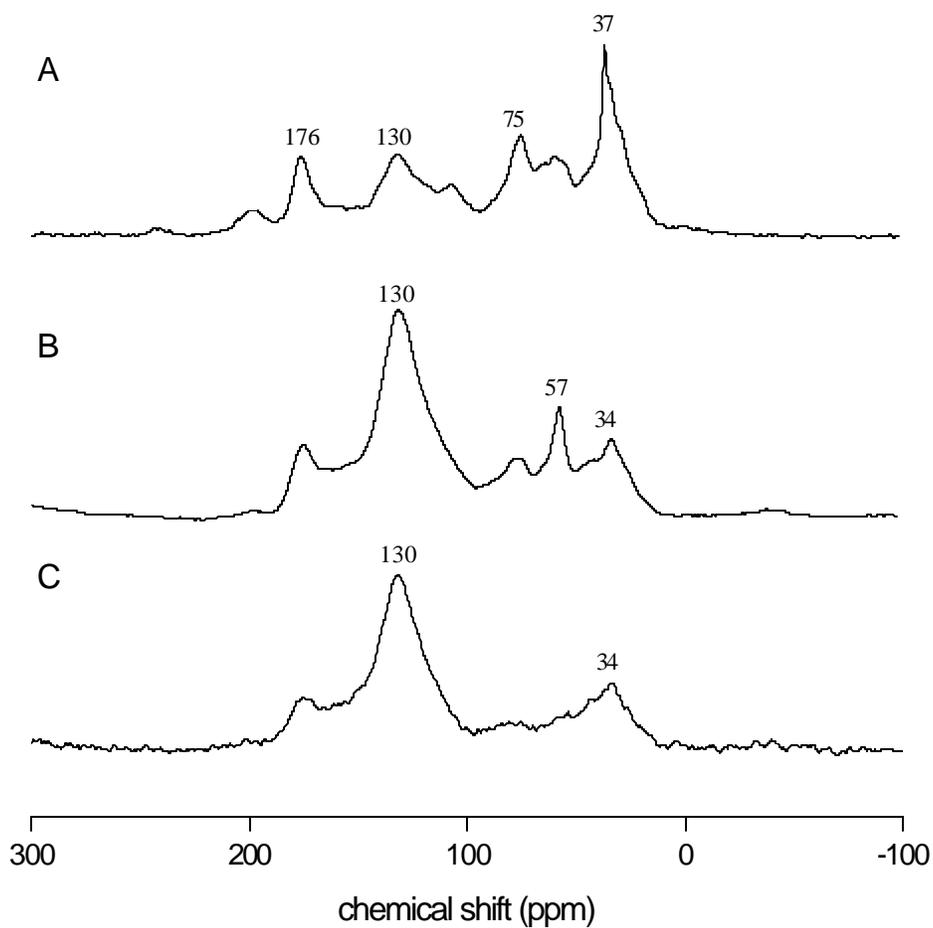


Figura 4.53: Spettri CPMAS- ^{13}C -NMR delle seguenti frazioni del campione di acido umico (HA) estratto dal suolo di Vico: A) frazione acquosa derivante dalla reazione con $\text{BF}_3\text{-MeOH}$; B) frazione acquosa derivante dalla reazione con HI.

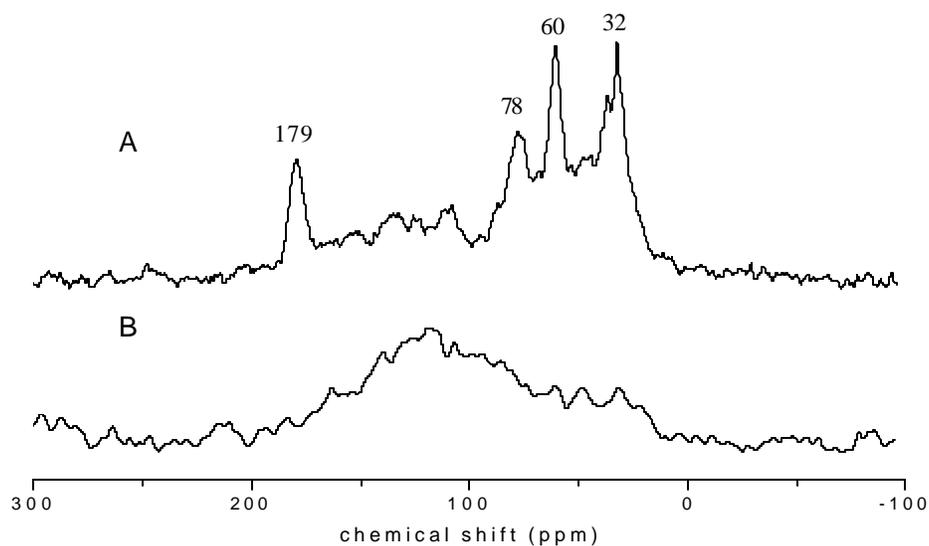


Figura 4.54: Spettri CPMAS- ^{13}C -NMR delle seguenti frazioni del campione di acido fulvico (FA) estratto dal suolo di Vico: A) tal quale; B) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH).

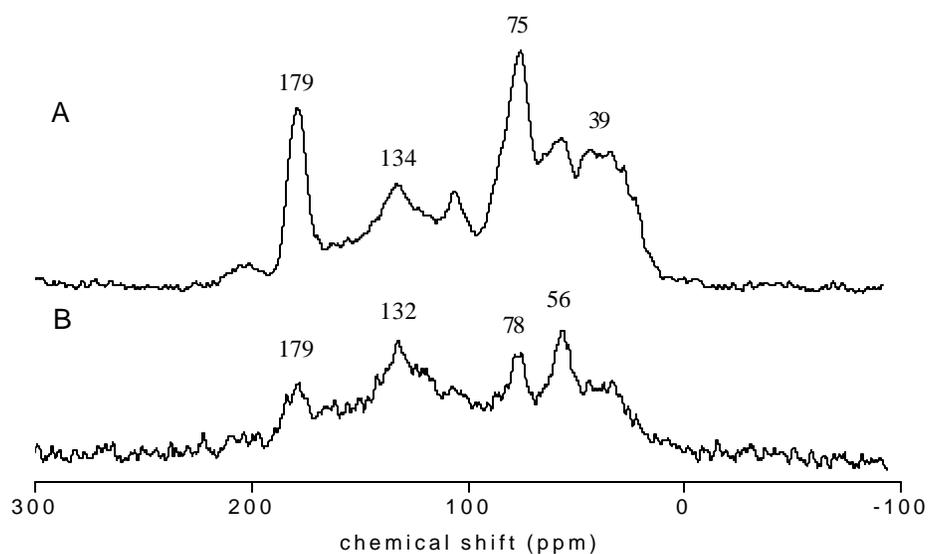


Figura 4.55: Spettri CPMAS- ^{13}C -NMR delle seguenti frazioni del campione di umina (HUM 1) estratta dal suolo di Vico: A) tal quale; B) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); C) residuo solido derivante dalla reazione con HI.

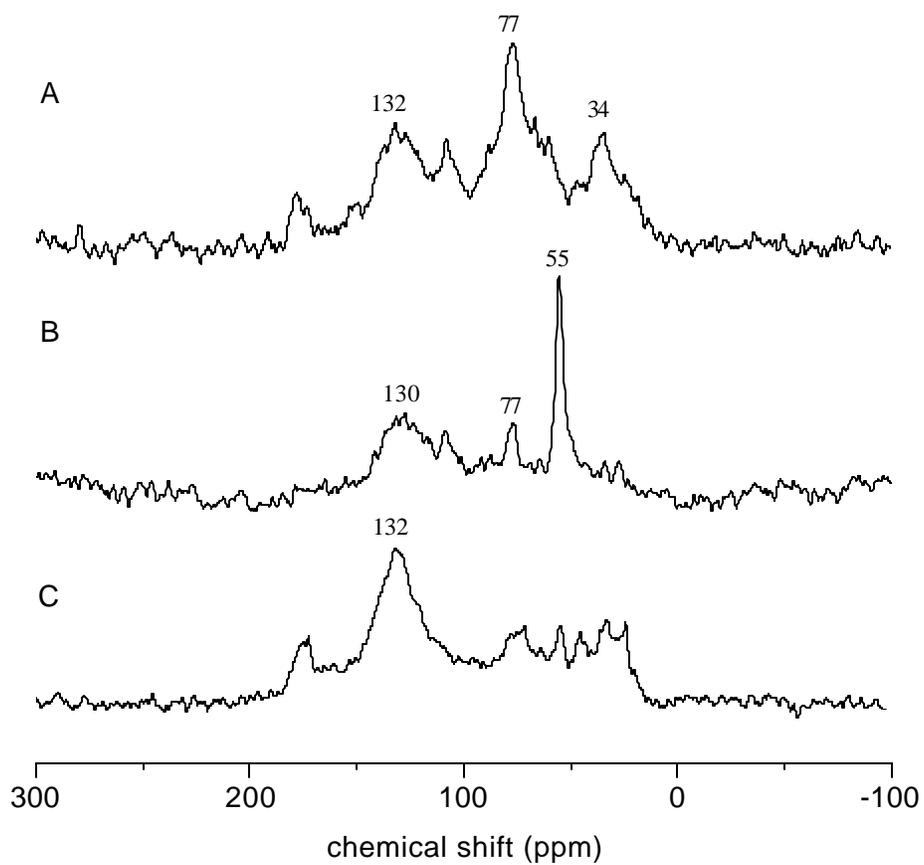


Figura 4.56: Spettri CPMAS- ^{13}C -NMR delle seguenti frazioni del campione di umina trattata (HUM 2) estratta dal suolo di Vico: A) tal quale; B) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); C) residuo solido derivante dalla reazione con HI.

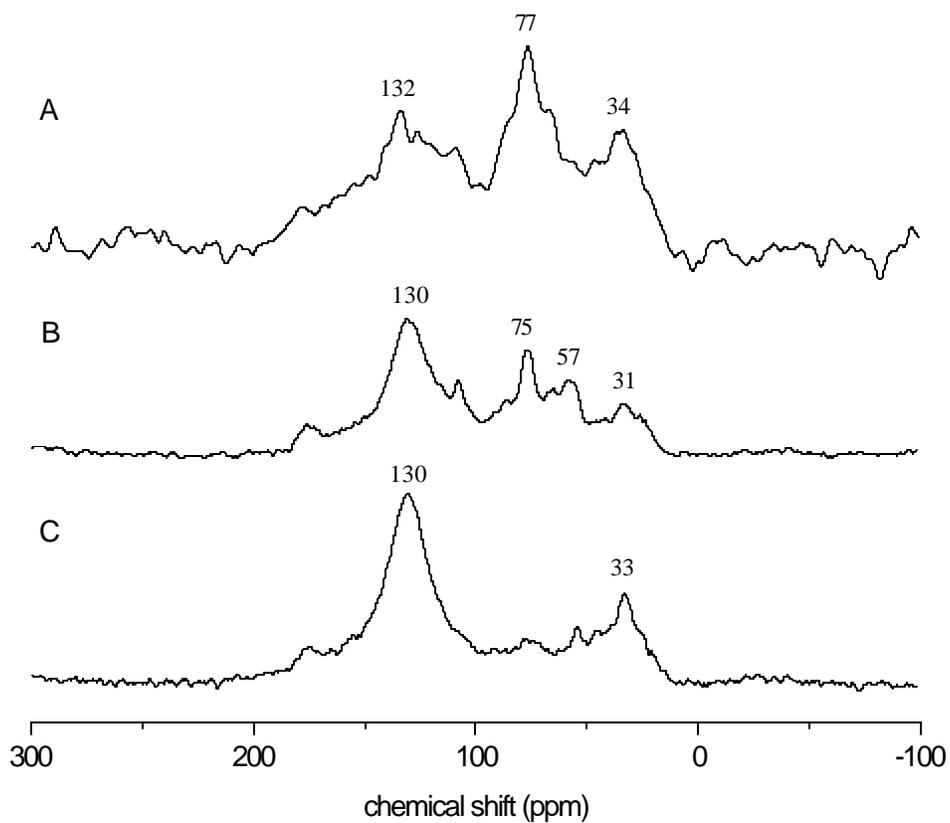
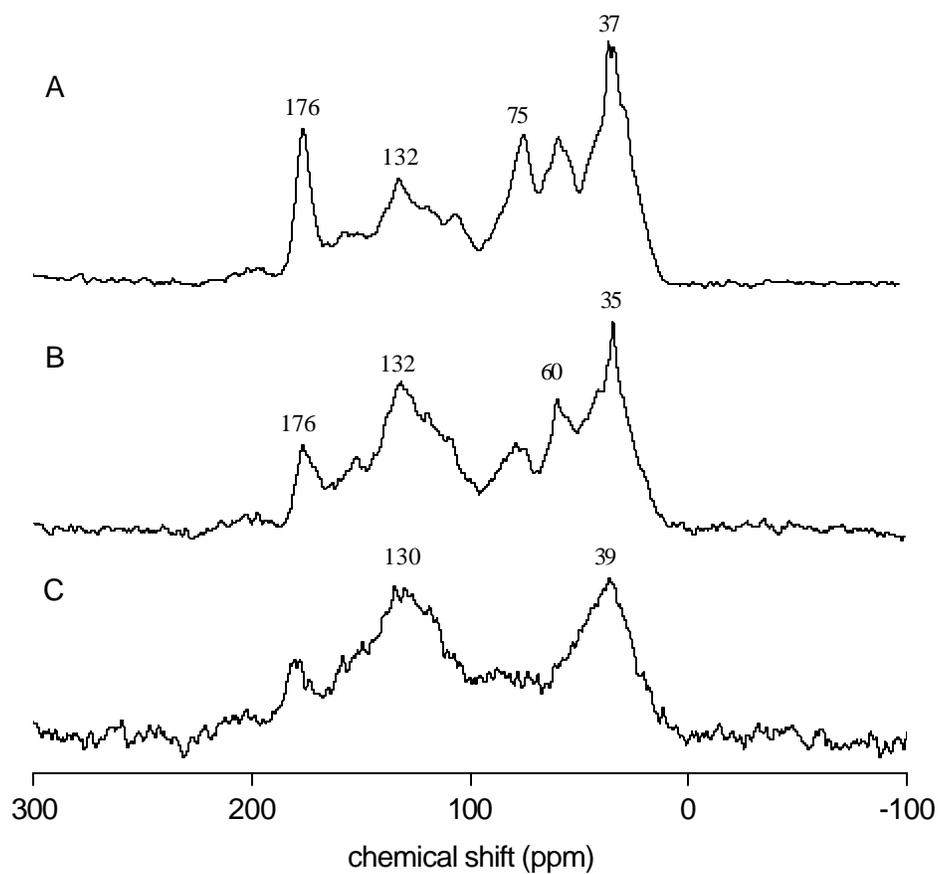


Figura 4.57: Spettri CPMAS- ^{13}C -NMR delle seguenti frazioni del campione di acido umico (HA) estratto dal suolo di Portici: A) tal quale; B) residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina (KOH in MeOH); C) residuo solido derivante dalla reazione con HI.



CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

5.1 Analisi GC/MS

La composizione delle frazioni estratte dopo le diverse fasi della procedura analitica di frazionamento può essere interpretata in termini dell'origine dei prodotti identificati. Il tipo di composti, la lunghezza delle catene alifatiche e la posizione delle sostituzioni, infatti, forniscono informazioni indicative circa la provenienza dei composti. Inoltre, l'accurata caratterizzazione della composizione di tutte le frazioni consente di seguirne la variazione al procedere della metodologia applicata, contribuendo alla ricostruzione della struttura molecolare di partenza.

Per i composti di natura alifatica possono essere distinte nei suoli tre fonti principali: i lipidi liberi, i biopoliesteri quali cutine e suberine ed i biopolimeri non idrolizzabili come cutani e suberani (Tegelaar, 1995; Nierop, 1998).

I dati disponibili in letteratura circa la composizione molecolare della frazione di lipidi liberi non sono molti (Naafs *et al.*, 2004). Tuttavia, il ruolo di questa frazione può essere molto importante, ad esempio, nel ritardare la decomposizione della SOM (Amblès *et al.*, 1993). Infatti, l'accumulo di lipidi sulla superficie delle particelle di suolo può incrementarne l'idrofobicità, diminuendo di conseguenza il tasso di degradazione del materiale organico. I lipidi comprendono acidi grassi, *n*-alcanoli, idrossiacidi, chetoni, steroidi, terpenoidi, acil gliceroli, idrocarburi, fosfolipidi e

lipopolisaccaridi (Stevenson, 1994). La principale fonte dei lipidi nei suoli è rappresentata dalla vegetazione (van Bergen *et al.*, 1997), ma tali composti possono originarsi, oltre che da piante e da animali come prodotti di deposizione, decomposizione e come essudati, anche da altre fonti pedogeniche, inclusi funghi, batteri e mesofauna (Naafs *et al.*, 2004).

La maggior parte dei prodotti identificati nelle frazioni qui esaminate è riconducibile ai principali blocchi costituenti dei polimeri vegetali, quali la cutina e la suberina. La cutina è associata con la maggior parte dei tessuti presenti nelle parti aeree (foglie, fiori, frutti) delle piante superiori e si trova negli strati sia esteriori che interiori delle cuticole vegetali e nelle lamelle che supportano lo strato protettivo epicuticolare fatto di cera (Tulloch, 1976; Walton, 1990). La suberina, invece, è una complessa rete polimerica che forma lo strato protettivo delle cortecce, dei tronchi lignei e delle parti sotterranee delle piante, quali le radici (Kolattukudy, 1984; Walton, 1990). La composizione chimica di questi biopolimeri è stata studiata con metodi di degradazione chimica come l'idrolisi alcalina (Bull *et al.*, 2000; Naafs & van Bergen, 2002), il trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (Kolattukudy, 1980), la pirolisi con TMAH (Nierop, 1998; Santos Bento *et al.*, 2001). Studi comparativi hanno mostrato che la cutina e la suberina sono strettamente correlate dal punto di vista chimico, data la similarità nei contenuti di componenti acide *n*-alchiliche ed ω -idrossicarbossiliche a catena media. Tuttavia, sono state riscontrate alcune differenze nella struttura monomerica e terziaria (Tegelaar *et al.*, 1995). La cutina è una macromolecola composta prevalentemente da idrossiacidi poliestrificati. Acidi *n*-alchilcarbossilici a catena lunga, ω -idrossiacidi, di, tri ed epossidrossiacidi costituiscono i principali monomeri alifatici. In particolare, gli acidi diidrossiesadecanoici e 9,10-epossi-18-idrossiottadecanoici ne rappresentano i maggiori

componenti (Kolattukudy, 1980; Holloway, 1982; Matzke & Riederer, 1991). In aggiunta a tali acidi alifatici, sono state identificate piccole quantità di acidi fenolici, come quelli *p*-cumarico e ferulico (Kolattukudy, 1980; Holloway, 1982). La suberina, invece, contiene considerevoli quantità di acidi dicarbossilici ed ω -idrossiacidi a catena lunga ($\approx C_{20}$). Oltre al dominio alifatico dominato da questi composti, si distingue nei tessuti suberizzati anche un dominio poliaromatico, spazialmente separato da quello polialifatico, che comprende acidi idrossicinnamici e loro derivati (Bernards & Lewis, 1998). Sulla base di queste differenze, è possibile distinguere i contributi relativi della cutina e della suberina alla materia organica del suolo.

Altre biomacromolecole altamente alifatiche e resistenti alla degradazione sono i cutani ed i suberani, identificati rispettivamente nella cuticola e nel periderma di molte piante superiori (Tegelaar *et al.*, 1989; Boom *et al.*, 2005). La funzione e la struttura di questi biopolimeri non sono state ancora del tutto chiarite. La presenza dei cutani, in particolare, nelle cuticole di alcune piante adattate a condizioni di siccità è stata, di recente, associata all'aumento dell'idrofobicità di tali cuticole, data la natura altamente alifatica del biopolimero considerato. Questo adattamento fisiologico consente alle piante di prevenire la perdita di acqua dalle foglie causata dall'evaporazione (Boom *et al.*, 2005). Analisi strutturali di questi biopolimeri sono state effettuate mediante pirolisi accoppiata alla gas-cromatografia/spettrometria di massa e mediante spettroscopia CPMAS- ^{13}C -NMR. La presenza nei cutani, da un lato, di serie omologhe di *n*-alcani, *n*-alcheni e di α , ω -alcadieni tra i prodotti di pirolisi e, dall'altro, di un picco a 32 ppm negli spettri NMR, associabile alla frequenza di risonanza dei carboni metilenici, ha portato alla conclusione che tali biopolimeri sono composti prevalentemente da unità polisaccaridiche che fanno da ponte tra le lunghe catene metileniche (Tegelaar *et al.*,

1989). Tuttavia, McKinney e colleghi (1996) non hanno riscontrato la presenza di unità polisaccaridiche nei cutani e, mediante termochemolisi in presenza di idrossido di tetrametilammonio, hanno evidenziato la presenza di strutture trimetossibenzeniche e di metil esteri di acidi grassi. Questo ha spinto alla proposta di una struttura differente, il cui scheletro consiste di anelli benzenici sostituiti tenuti insieme da gruppi incrociati, di natura non ancora ben definita, ma probabilmente di tipo carbonilico. Per quanto riguarda i suberani, la differente distribuzione di prodotti di pirolisi rispetto a quella dei cutani è il riflesso di una diversa struttura macromolecolare, sia per quanto riguarda la distribuzione delle lunghezze delle catene delle varie unità ripetitive sia per quanto riguarda i legami intramolecolari (Tegelaar *et al.*, 1995). Tuttavia, la loro struttura non è stata ancora del tutto chiarita e non risulta perciò possibile distinguere il loro contributo da quello dei cutani alle componenti alifatiche della materia organica del suolo.

5.1.1 Frazione dei lipidi liberi

5.1.1.1 Lipidi liberi nel campione HA Vico

Gli acidi mono e di-carbossilici rappresentano una porzione considerevole dei lipidi liberi estratti dall'acido umico di Vico. La distribuzione degli acidi monocarbossilici, all'abbondanza dei quali contribuiscono sia la cutina (<C₂₀) sia la suberina (=C₂₀), è paragonabile a quella osservata in precedenza per frazioni ottenute dopo idrolisi alcalina di residui vegetali (Bull *et al.*, 2000) e di residui di suolo (Grasset & Amblès, 1998). La predominanza dei membri a catena lunga, in particolare delle catene con un numero pari di atomi di carbonio, è molto pronunciata, confermando che questi composti sono originati dalle piante superiori. Si riscontra, inoltre, anche un

contributo di origine batterica. La presenza di acidi a 15 e 17 atomi di carbonio, ramificati in posizione *iso* ed *anteiso*, è, infatti, un riflesso dell'attività batterica (Amblès *et al.*, 1994; Grasset & Amblès, 1998), che trova riscontro anche nello scarso contributo degli acidi grassi insaturi sia a 16 che a 18 atomi di carbonio. Tali composti sono componenti molto comuni, generalmente trovate nei tessuti delle piante superiori (Gunstone *et al.*, 1986). Tuttavia la loro scarsità induce ad ipotizzare l'avvenuta ossidazione dei doppi legami in seguito a degradazione batterica.

Per quanto riguarda gli acidi dicarbossilici, il membro principale a 16 atomi di carbonio è stato identificato nelle cutine (Holloway, 1982), ma generalmente si associa alle suberine (Kolattukudy, 1980; Walton, 1990; Santos Bento *et al.*, 2001). La presenza dell'acido nonandioico, riportata anche da altri autori (Grasset & Amblès, 1998; Naafs & van Bergen, 2002), può, invece, essere associata con l'ossidazione enzimatica, dovuta alla degradazione batterica, di acidi con doppio legame in posizione 9, come l'acido oleico (Grasset & Amblès, 1998; Regert *et al.*, 1998).

Nella frazione presa in esame, anche gli idrossiacidi sono molto abbondanti, in particolare i diidrossiacidi a 18 atomi di carbonio e gli ω -idrossiacidi. Rispetto agli acidi 10,16 e 9,16-diidrossiesadecanoici, che sono i costituenti principali della cutina e della suberina (Kolattukudy, 1980; Holloway, 1982; Holloway, 1983; Ryser & Holloway, 1985), i diidrossiacidi a 18 atomi di carbonio sono meno comuni. Tuttavia, ne sono stati identificati due isomeri, con i gruppi ossidrilici in posizione 9 e 10 oppure 10 e 18. Anche gli ω -idrossiacidi sono componenti molto comuni sia della cutina (Holloway, 1982) che della suberina (Kolattukudy, 1980; Walton, 1990) e quelli identificati in questo campione provengono da entrambe le fonti.

Inoltre, l'origine degli alcoli, come quella degli acidi monocarbossilici, può distinguersi in base alla lunghezza delle catene carboniose, considerando i membri con meno di 18 atomi derivati dalla cutina e quelli con più di 18 atomi derivati della suberina (Kolattukudy, 1980; Matzke & Riederer, 1991). La prevalenza in questa frazione dell'ottadecanolo e del docosanolo rende chiara la superiorità del contributo della suberina. Tuttavia, in questa e nella maggioranza delle altre frazioni analizzate, non sono stati identificati né i membri *iso* ed *anteiso*, trovati da altri autori (Grasset & Amblès, 1998), né i dioli che vengono di solito identificati nei depolimerizzati della suberina (Walton, 1990; Riederer et al., 1993).

5.1.1.2 Lipidi liberi nel campione HUM 1 Vico

Anche nel caso della frazione di lipidi liberi estratti dall'umina del suolo di Vico, gli acidi mono e di-carbossilici rappresentano la maggioranza dei composti identificati. La distribuzione degli acidi monocarbossilici è molto simile a quella registrata per la stessa classe di composti nei lipidi liberi estratti dall'acido umico, con apporti da parte sia della cutina (<C₂₀) sia della suberina (=C₂₀). Sebbene venga riscontrata la presenza di ingenti quantità di membri insaturi, anche in questo caso si ipotizza un contributo batterico, data innanzitutto la presenza di acidi a 15 e 17 atomi di carbonio, ramificati in posizione *iso* ed *anteiso* (Amblès et al., 1994; Grasset & Amblès, 1998).

Tale ipotesi è supportata anche dalla distribuzione degli acidi dicarbossilici, dominata in questo campione da membri a catena corta, in particolare dal C₉, la cui origine è stata attribuita a processi di degradazione batterica (Naafs & van Bergen, 2002).

D'altronde, come gli acidi dicarbossilici, anche gli α -idrossiacidi a catena corta, identificati in tracce in questa frazione, possono essere considerati indicatori della degradazione ossidativa dei composti insaturi (Grasset & Amblès, 1998; Naafs & van Bergen, 2002). Nonostante la concentrazione di acido α -idrossiottadec-9-enoico rimanga relativamente alta, un'ulteriore conferma del fatto che si verificano i processi di β -ossidazione microbica e di auto-ossidazione del doppio legame proposti da Mlaker e Spiteller (1996) è data dalla presenza degli epossiacidi. Tali composti sono, infatti, i primi intermedi nel processo di ossidazione dei doppi legami e possono formarsi durante la conversione degli acidi insaturi nei corrispondenti triidrossiacidi (Almendros & Sanz, 1991). La presenza dunque di quantità considerevoli di acido 9,10,18-triidrossiottadecanoico va ricondotta in parte ai triidrossiacidi originariamente presenti nei tessuti suberizzati (Nierop, 1998; Santos Bento *et al.*, 2001) ed in parte all'idrolisi degli epossiacidi a 18 atomi di carbonio (Holloway, 1982). Analogamente, l'acido 9,10-diidrossiottadecandioico deriva sia dai composti originariamente contenenti due gruppi ossidrilici sia dagli epossiacidi (Holloway & Deas, 1973).

Contrariamente alla frazione di lipidi liberi estratta dall'acido umico, quella estratta dall'umina comprende anche alcuni composti aromatici ed alcuni steroli. Si ritiene che acidi aromatici semplici come quelli identificati in questa e nelle successive frazioni possano essere legati alla cutina mediante legami esterei (Kolattukudy, 1980; Holloway, 1982) oppure far parte dei domini aromatici della suberina (Kolattukudy, 1980; Bernards, 2002). Non si può escludere però che tali acidi si originino da prodotti di degradazione della lignina (Nierop *et al.*, 2003). Infine, il β -sitosterolo è stato identificato in precedenza nei depolimerizzati dei suoli (Amblès *et al.*, 1996; Gobé *et*

al., 2000) e della suberina (Walton, 1990). Altri steroli sono trovati nelle cere, ma la loro natura è ancora poco chiara.

5.1.1.3 Lipidi liberi nel campione HUM 2 Vico

Nella frazione di lipidi liberi estratti dall'umina trattata del suolo di Vico, la predominanza degli acidi dicarbossilici è molto più accentuata. La distribuzione degli acidi monocarbossilici è del tutto confrontabile con quella dell'umina non trattata e la presenza di acidi a 15 e 17 atomi di carbonio, ramificati in posizione *iso* ed *anteiso*, e di acidi dicarbossilici a catena corta valorizzano ancora una volta l'ipotesi di processi di degradazione batterica. Tuttavia, la predominanza di acidi dioici a catena lunga, in particolare del C₁₆, riconduce ai contributi diretti della cutina (Holloway, 1982) e della suberina (Kolattukudy, 1980; Walton, 1990; Santos Bento *et al.*, 2001).

Un'altra ipotesi da prendere in considerazione è che gli acidi dioici a catena lunga siano originati dall'ulteriore ossidazione degli ω -idrossiacidi (Amblès *et al.*, 1994), il che spiegherebbe anche lo scarso ammontare degli stessi ω -idrossiacidi. Di questi ultimi, i rappresentanti più abbondanti sono gli acidi ω -idrossiesadecanoico ed ω -idrossiottadec-9-enoico, comunemente trovati nella cutina (Holloway, 1982), ma l'abbondanza relativa del membro a 22 atomi di carbonio è per lo più associata alla suberina (Kolattukudy, 1980; Walton, 1990). Anche in questo campione, come nel precedente, la concentrazione dell'acido ω -idrossiottadec-9-enoico resta elevata e l'assenza di ω -idrossiacidi a catena corta in questo caso sembra indicare che i processi di degradazione ossidativi dei doppi legami sono solo parziali. Tuttavia, sono sempre presenti gli epossiacidi e l'acido 9,10,18-triidrossiottadecanoico da essi derivato, a testimonianza dell'avvenuta ossidazione dei composti insaturi (Almendros & Sanz,

1991). Per quanto riguarda i diidrossiacidi, il più abbondante è il 10,16-diidrossiesadecanoico, componente molto comune nella cutina e nella suberina (Kolattukudy, 1980; Holloway, 1982). Inoltre, come nelle frazioni di lipidi liberi dell'acido umico e dell'umina, si nota anche la presenza di monoidrossiacidi sostituiti in posizione α , di cui si trovano scarsi riferimenti in letteratura, che prevalgono nettamente su quelli sostituiti in posizione β . Questi ultimi, al contrario, sono stati identificati in precedenza negli estratti di humus (Almendros & Sanz, 1991) e si pensa che siano indicatori del metabolismo batterico, in particolare sono considerati marcatori molecolari derivati dai lipopolisaccaridi dei batteri Gram-negativi (Kawamura & Ishiwatari, 1982; Klok *et al.*, 1988).

Per le altre classi di composti non si riscontra alcuna differenza rispetto alle frazioni prese in esame finora, esclusa la presenza dello squalene, che è un importante intermedio nella sintesi degli steroidi ed in particolare è il diretto precursore del colesterolo.

5.1.2 Fra zione dopo transesterificazione

5.1.2.1 Transesterificato nel campione HA Vico

Nella frazione organica estratta dopo la reazione di transesterificazione dall'acido umico del suolo di Vico, le classi di acidi mono e di-carbossilici sono poste in secondo piano rispetto alla classe degli idrossiacidi. Nell'ambito degli acidi monocarbossilici, la predominanza degli acidi esadecanoico ed ottadecanoico e la prevalenza dei membri a catena lunga con un numero pari di atomi di carbonio conferma l'origine di questa classe di composti da piante superiori (Amblès *et al.*, 1994;

Bull *et al.*, 1998), già sottolineata nella frazione di lipidi liberi estratti dallo stesso campione. Anche in questo caso, comunque, si rilevano alcuni fattori che possono essere indicativi di attività batterica, quali lo scarso contributo di acidi monocarbossilici insaturi, la presenza di acidi a 15 e 17 atomi di carbonio, ramificati in posizione *iso* ed *anteiso* e, tra gli acidi dicarbossilici, l'apporto del membro a 9 atomi di carbonio.

La grande varietà di idrossiacidi identificati mette in risalto il contributo proveniente dai blocchi costituenti dei polimeri vegetali. Gli acidi diidrossiesadecanoici sono i monomeri più caratteristici della cutina e si trovano generalmente come miscele di diversi isomeri, con il gruppo ossidrilico centrale posizionato sul carbonio 7, 8 o, più frequentemente, 9 o 10 (Holloway & Deas, 1971). Tuttavia, in questa frazione come nelle altre esaminate in questo lavoro di tesi, sono stati identificati solo gli ultimi due isomeri. Analogamente, degli acidi diidrossiottadecanoici sono stati identificati solo gli isomeri con i gruppi ossidrilici posizionati, nelle diverse combinazioni, sui carboni 9, 10 e 18, mentre mancano gli isomeri sostituiti in posizione 7, 11 o 12, identificati da altri autori (del Río & Hatcher, 1998; Naafs & van Bergen, 2002). Una spiegazione risiede nella possibilità che i diversi isomeri, nelle condizioni analitiche utilizzate, vengano coeluiti nello stesso picco cromatografico e che lo spettro di massa sia dominato dalla frammentazione degli isomeri più abbondanti. Per quanto riguarda i monoidrossiacidi, da notare è la concentrazione dell'acido ω -idrossidocosanoico, relativamente bassa in confronto agli acidi ω -idrossiottadecanoico e ω -idrossiesadecanoico. Bull e collaboratori (2000) hanno proposto che l'accentuata degradazione dell'acido ω -idrossidocosanoico sia la conseguenza della degradazione biotica da parte di alcuni microrganismi che degradano in via preferenziale la componente a 22 atomi di carbonio, ma questa è un'ipotesi che richiede ulteriori indagini. Inoltre, rispetto a quanto

visto per le frazioni di lipidi liberi, nel transesterificato dell'acido umico la presenza di β -idrossiacidi è più evidente (Almendros & Sanz, 1991).

Infine, anche in questa frazione, la distribuzione degli alcoli, dominata dal tetracosanolo, è tipica del contributo prevalente della suberina rispetto alla cutina.

5.1.2.2 *Transesterificato nel campione HUM 1 Vico*

Nella frazione organica estratta dopo la reazione di transesterificazione dall'umina del suolo di Vico, la classe di acidi dicarbossilici prevale sulle altre, come visto per la frazione di lipidi liberi estratta dallo stesso campione. Non si verifica dunque la variazione, osservata per l'acido umico, che favorisce l'estrazione degli idrossiacidi dopo la reazione di transesterificazione.

Nell'ambito degli acidi monocarbossilici, si nota l'assenza dei composti a 15 e 17 atomi di carbonio, ramificati in posizione *iso* ed *anteiso*. Tuttavia, non si esclude il verificarsi di processi di degradazione batterica, dato lo scarso contributo degli acidi ottadecenoico e docosanoico e vista la presenza di abbondanti quantità di acido nonandioico, per quanto spiegato nei sottoparagrafi precedenti.

La presenza di acidi dicarbossilici a catena corta con gruppi ossidrilici in posizione α oppure β , già manifestatasi nel transesterificato dell'acido umico in maniera meno evidente, non trova riscontro in letteratura e deriva presumibilmente da meccanismi di α -ossidazione degli α e β -idrossiacidi corrispondenti.

Simili meccanismi di α -ossidazione, a partire, però, dall'acido ottadec-9-enoico, si spingono molto avanti, tanto da causare la prevalenza dei diacidi a 18 atomi di carbonio con due gruppi ossidrilici sul triidrossiacido corrispondente (Holloway &

Deas, 1973), sottolineando il rilievo che la degradazione biotica assume in condizioni ossidative.

Infine, l'unica altra differenza che si evidenzia nella distribuzione delle rimanenti classi di composti rispetto alle caratteristiche discusse per le altre frazioni esaminate è rappresentata dall'identificazione distinta di idrocarburi. Le serie di doppi picchi cromatografici per gli alcheni/alcani sono un classico prodotto della pirolisi delle sostanze umiche (Grasset & Amblès, 1998). Tuttavia, in questo caso, non si tratta di doppi picchi, bensì di alcheni a catena relativamente corta ed alcani a catena più lunga.

5.1.2.3 Transesterificato nel campione HUM 2 Vico

Nella frazione organica estratta dopo la reazione di transesterificazione dall'umina trattata del suolo di Vico, ancora una volta prevale la classe degli acidi dicarbossilici, come del resto nella frazione di lipidi liberi estratta dallo stesso campione.

Anche in questo caso come in quello della frazione precedente, si nota una brusca diminuzione del contributo da parte degli acidi monocarbossilici insaturi e, al tempo stesso, la scarsa presenza di acidi a 15 e 17 atomi di carbonio, ramificati in posizione *iso* ed *anteiso*. Questo potrebbe interpretarsi come un'indicazione del fatto che gli acidi monocarbossilici vengono degradati nel momento stesso in cui entrano a far parte della matrice umica. Di conseguenza, i lipidi liberi, che non sono completamente stabilizzati, contengono traccia dell'attività batterica in corso e materiale fresco non ancora degradato. Al contrario, nella frazione estratta dopo la reazione di transesterificazione, che interessa molecole più saldamente legate alla matrice umica, c'è solo materiale già degradato e l'attività batterica è in calo.

La predominanza di un composto come l'acido β -idrossidodecandioico può sorprendere, dati gli scarsi riferimenti in letteratura. Tuttavia, se si tiene conto dell'ipotesi che prevede i meccanismi di α -ossidazione, tale composto può considerarsi un derivato del corrispondente β -idrossiacido e dunque un indicatore del metabolismo batterico, a conferma della rilevanza dei processi degradativi di origine biotica.

Anche la distribuzione degli idrossiacidi, in particolare quella dei membri a 18 atomi di carbonio, non lascia dubbi circa il verificarsi di processi di degradazione ossidativa dei composti insaturi, con la presenza dell'eossiacido a 18 atomi di carbonio e degli acidi 9,10-diidrossiottadecandioico e 9,10,18-triidrossiottadecanoico, suoi derivati (Holloway, 1982).

Infine, le altre classi di composti presentano caratteristiche sostanzialmente uguali a quelle descritte per le frazioni precedenti.

5.1.3 Frazione dopo idrolisi alcalina

5.1.3.1 Idrolizzato nel campione HA Vico

Nella frazione organica estratta dopo la reazione di idrolisi alcalina dall'acido unico del suolo di Vico, non si verifica la netta predominanza di un'unica classe di composti e sia gli acidi mono e di-carbossilici sia gli idrossiacidi sono ugualmente rilevanti.

Nella classe degli acidi monocarbossilici, la presenza di numerosi omologhi con più di venti atomi di carbonio (fino a C₃₄) evidenzia l'elevato contributo della suberina. Tuttavia, la predominanza degli acidi esadecanoico ed ottadecanoico è riconducibile al prevalente apporto della cutina. Prove dell'attività batterica sono, come al solito,

rintracciabili nelle scarse quantità di acidi insaturi e nella presenza, seppur minima, dei composti a 15 e 17 atomi di carbonio, ramificati in posizione *iso* ed *anteiso* (Grasset & Amblès, 1998).

Anche la distribuzione dei diacidi esclusivamente a catena corta, già osservata in precedenza nei depolimerizzati dell'umina (Almendros *et al.*, 1991; Grasset & Amblès, 1998), suggerisce una derivazione da processi degradativi di origine batterica.

D'altro canto, però, in questa frazione sono del tutto assenti sia β -idrossiacidi sia γ -idrossiacidi a catena corta ed epossiacidi, che pure indicano un input batterico, in maniera diretta i primi (Kawamura & Ishiwatari, 1982; Klok *et al.*, 1988) ed indiretta i secondi (Grasset & Amblès, 1998; Naafs & van Bergen, 2002). A tal punto, a meno che non si consideri una degradazione completa degli epossiacidi, si può pensare che l'acido 9,10,18-triidrossiottadecanoico presente sia derivato esclusivamente dai triidrossiacidi a 18 atomi di carbonio presenti in origine nei tessuti suberizzati (Nierop, 1998; Santos Bento *et al.*, 2001).

La classe degli alcoli, infine, presenta una dominanza netta da parte del docosanolo. Di conseguenza, il contributo della suberina prevale rispetto a quello della cutina, così come dai domini poliaromatici della suberina sembrano derivare anche i composti aromatici identificati.

5.1.3.2 *Idrolizzato nel campione HUM 1 Vico*

Nella frazione organica estratta dopo la reazione di idrolisi alcalina dall'umina del suolo di Vico, la classe degli acidi dicarbossilici è nettamente prevalente sulle altre, come visto anche per le altre frazioni estratte da questo campione.

Per quanto riguarda la distribuzione degli acidi monocarbossilici, si nota un contributo particolarmente elevato di acidi insaturi. L'ampia varietà dei composti identificati non trova alcun raffronto in letteratura, dove di rado vengono riportati acidi insaturi diversi da quelli a 16 o 18 atomi di carbonio, sia oleico che linoleico.

Al contrario, la varietà degli acidi dicarbossilici è molto limitata, nonostante le loro quantità siano di gran lunga superiori a quelle degli altri composti. La presenza esclusiva di diacidi a catena corta si spiega solo ipotizzando che tali composti siano frammenti di composti più lunghi, derivati da processi di degradazione batterica, così come i membri a 9 atomi di carbonio, sotto forma sia di acido dicarbossilico che di β -idrossiacido, derivano dall'ossidazione enzimatica del doppio legame in posizione 9 dei composti a 18 atomi di carbonio (Grasset & Amblès, 1998; Regert *et al.*, 1998).

Un'altra particolarità di questa frazione estratta dall'umina è la presenza di diidrossiacidi a catena corta. Oltre ai diidrossiacidi comuni (C_{16} e C_{18}), in letteratura viene riportato anche il diidrossiacido a 14 atomi di carbonio come componente minore negli idrolizzati di suolo a basso pH (Naafs & van Bergen, 2002). Tuttavia, componenti a 4 o 6 atomi di carbonio, come quelle qui identificate, più che essere componenti minori dei polimeri vegetali, possono derivare dalla frammentazione di molecole più grandi.

Inoltre, anche gli alcoli presentano una peculiarità, ossia il contributo piuttosto abbondante del pentandiolo e del pentantriolo. Anche in questo caso, in letteratura non si trova alcuna indicazione circa dioli a catena corta, essendo stati identificati nei depolimerizzati della suberina dioli tra 12 e 26 atomi di carbonio, con massimo esponente a 16 (Walton, 1990). Questo induce a pensare che l'identificazione di tali composti non possa essere molto indicativa circa la loro origine.

5.1.3.3 Idrolizzato nel campione HUM 2 Vico

Nella frazione organica estratta dopo la reazione di idrolisi alcalina dall'umina trattata del suolo di Vico, gli acidi mono e di-carbossilici rappresentano la maggioranza dei composti identificati. La distribuzione registrata per entrambe le classi di composti è del tutto analoga a quella esaminata per l'idrolizzato dell'umina non trattata. Anche in questo caso, infatti, si nota una varietà enorme di acidi monocarbossilici insaturi, con componenti tra 14 e 22 atomi di carbonio, sebbene i composti più abbondanti siano sempre quelli a 16 e 18 atomi di carbonio, comunemente trovati nei tessuti delle piante superiori (Gunstone *et al.*, 1986).

Inoltre, anche in questo caso, l'origine degli acidi dicarbossilici e dei diidrossiacidi a catena corta è attribuibile a processi di degradazione che causano la frammentazione di molecole più grandi.

L'abbondanza di composti comunemente trovati nella cutina e nella suberina, quali gli acidi 10,16-diidrossiesadecanoico e 9,10-diidrossiottadecandioico, e la distribuzione degli alcoli, incentrata attorno al docosanolo e con netta prevalenza delle catene carboniose pari, consentono di identificare con certezza solo l'input proveniente dai polimeri vegetali. In particolare, la suberina sembra dare un contributo prevalente, data anche l'abbondanza di acidi aromatici identificati che possono essere originati dai domini poliaromatici dei tessuti suberizzati.

5.1.4 Frazione dopo acido iodidrico

L'acido iodidrico è uno dei reagenti specifici per la rottura dei legami eteri usati nella chimica organica classica, per esempio nel metodo Zeisel per determinare la

presenza e la concentrazione di gruppi metossili. La reazione con acido iodidrico è stata utilizzata in precedenza per studi strutturali del kerogene (Vella & Holzer, 1990; Amblès *et al.*, 1996). In seguito è stata applicata anche ad acidi umici ed umina per confermare la presenza di catene alchiliche legate alla matrice umica mediante legami eteri (Grasset & Amblès, 1998) o semplicemente per rimuovere le strutture carboidratiche (Almendros *et al.*, 1998).

La derivatizzazione dei prodotti di reazione si è rivelata un punto molto critico. Tradizionalmente, gli ioduri alchilici vengono trattati con LiAlD_4 con la conseguente formazione di deuteroalcani. In verità, l'intermedio radicalico che si forma nella riduzione con LiAlD_4 può reagire tanto con un protone del solvente quanto con l'atomo di deuterio del LiAlD_4 , limitando enormemente la formazione di prodotti deuterati (Ashby *et al.*, 1993). Di conseguenza, è stata sviluppata la procedura di riduzione con propionato di cesio (Grasset & Amblès, 1998) qui utilizzata. I risultati riportati in letteratura (Grasset & Amblès, 1998) confermano la presenza di strutture per lo più lineari tra 12 e 32 atomi di carbonio, con prevalenza di catene carboniose pari, legate alla matrice umica per mezzo di legami eteri.

L'impossibilità di rilevare tali prodotti nelle condizioni analitiche utilizzate in questo lavoro di tesi si può spiegare solo ipotizzando che la resa della derivatizzazione con propionato di cesio sia molto bassa. Da escludere è, invece, l'inefficacia della reazione con acido iodidrico. Infatti, gli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR mostrano l'avvenuta rottura dei legami eteri presenti nei vari residui sottoposti al trattamento con HI, confermando l'ipotesi che anche i legami eteri, oltre a quelli esterei, sono implicati in maniera notevole nella struttura delle sostanze umiche.

5.1.5 Frazioni derivanti daltrattamento del residuo finale

Sebbene i diversi trattamenti applicati al residuo finale della procedura di frazionamento non abbiano avuto buon esito, la possibilità di sciogliere tale residuo in ammoniaca si rivela di fondamentale importanza, dal momento che consente di non escludere in futuro un'ulteriore caratterizzazione molecolare del residuo.

La difformità di comportamento riscontrata nel residuo finale dell'acido umico di Vico, completamente solubile in ammoniaca, e nel residuo finale dell'acido umico estratto dal suolo di Portici, solubile in ammoniaca solo parzialmente, ha suscitato la necessità di approfondirne la causa.

Analisi preliminari all'assorbimento atomico hanno evidenziato un'unica differenza tra i campioni estratti dal suolo di Vico e quelli estratti dal suolo di Portici, ossia la presenza di alluminio nei primi, laddove nei secondi non ne è stata rilevata traccia.

Esiste quindi la possibilità concreta che nel processo di solubilizzazione del residuo intervenga la formazione di complessi allumino-organici. Questo apre una strada completamente nuova nella caratterizzazione molecolare delle sostanze umiche. Infatti, appropriati trattamenti del materiale umico, quali ad esempio la manipolazione del contenuto di cationi polivalenti, potrebbero consentirne un'accurata valutazione delle caratteristiche molecolari, andando oltre il limite finora imposto dalle difficoltà incontrate nel trattare tale materiale, fino a giungere ad una completa mappatura delle diverse molecole eterogenee che ne compongono la struttura supramolecolare.

5.1.6 Efficienza complessiva della procedura di frazionamento

La distribuzione dei composti nelle varie fasi della procedura di frazionamento può essere utile, insieme alle altre tecniche analitiche utilizzate in questo studio, per ricostruire la struttura molecolare di partenza.

I composti identificati nelle frazioni analizzate, attribuibili per lo più ai domini della cutina e della suberina ma anche in parte all'attività batterica, come visto in precedenza, sono presenti sia come molecole intrappolate nella rete macromolecolare insolubile dei suoli (Grasset & Amblès, 1998; Gobé *et al.*, 2000) sia come molecole legate alla matrice organica mediante legami esterei (Amblès *et al.*, 1991; Regert *et al.*, 1998). Tuttavia, i meccanismi chimici e fisici con cui tali molecole restano intrappolate o si esterificano non sono stati ancora del tutto chiariti. Inoltre, si deve considerare anche il ruolo svolto dalla matrice inorganica dal momento che una parte di tali composti può trovarsi sotto forma di complessi metallo-organici (Naafs & van Bergen, 2002). In particolare, si sa che composti aromatici, α -idrossiacidi e diacidi hanno una forte capacità di complessare i metalli (Kaiser & Guggenberger, 2000) e che Fe e Al interagiscono in via preferenziale con il materiale organico (Aran *et al.*, 2001).

Da un lato, la frazione dei lipidi liberi contiene tutte quelle molecole che possono essere estratte facilmente dalle sostanze umiche, dal momento che, pur restando intrappolate nella matrice umica, non vi sono legate per mezzo di legami chimici covalenti. Si consideri, in ogni caso, che la composizione dei lipidi liberi nei suoli è influenzata in maniera significativa anche dai processi di transesterificazione, che si è dimostrato sono attivi nel suolo (Amblès *et al.*, 1994). Dall'altro, i prodotti alifatici ed aromatici legati alla matrice umica mediante legami esterei, pur essendo considerati composti labili dal punto di vista chimico e biochimico (Derenne & Largeau, 2001), si trovano frequentemente nei suoli e la loro rilevanza aumenta con

l'umificazione (Almendros & Sanz, 1991; Bull *et al.*, 2000; Nierop *et al.*, 2003). Questo sta ad indicare che tali composti si accumulano nel suolo senza subire profonde alterazioni durante i processi di umificazione, grazie alla formazione di legami incrociati stabili che li rende resistenti alla decomposizione estensiva (Kögel-Knabner, 1993).

L'applicazione della procedura analitica di frazionamento all'acido umico estratto dal suolo di Vico ha portato all'estrazione di una percentuale di carbonio organico pari in media al 65% circa del carbonio organico totale presente nel campione di partenza (dati i pesi dei residui finali). Tuttavia, solo il 10% è stato identificato nelle frazioni organiche separate via via, mentre la restante parte è da ricercare nelle frazioni solubili in acqua, nei residui finali ed in quei composti legati mediante legami eteri che sono stati estratti mediante il trattamento con acido iodidrico, ma non identificati. La varietà della distribuzione delle classi di composti nelle tre frazioni estratte in sequenza evidenzia l'input diretto del materiale organico proveniente dalle piante superiori. Il fatto che nella frazione di lipidi liberi venga estratto il 6.0% del carbonio organico totale indica l'importanza dei lipidi estraibili dalla matrice umica con il solo utilizzo di solventi organici. La reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, d'altro canto, si rivela di grande efficacia, dal momento che la successiva reazione di idrolisi alcalina, finalizzata ad assicurare la rottura dei legami esterei ancora presenti nella sostanza organica e non modificati dalla reazione di transesterificazione, porta all'estrazione di una percentuale minima di carbonio organico.

Nel caso dell'umina estratta dal suolo di Vico, l'11.3% del carbonio organico totale presente nel campione di partenza viene identificato nelle frazioni organiche, contro il 40% circa che viene estratto in totale (dati i pesi dei residui finali). Questo è

l'unico caso in cui la frazione di lipidi liberi è meno ricca rispetto alla frazione estratta dopo la reazione di transesterificazione. Se si considera che l'umina è l'unico dei tre campioni a non essere stato sottoposto al processo di purificazione, allora è verosimile che ciò dipenda da una vera e propria protezione fisica che la parte minerale presente in questo campione offre ai lipidi liberi, che vengono schermati e dunque estratti con maggiore difficoltà. Da non scartare è anche l'ipotesi che si formino dei complessi con i metalli di e tri-valenti, presenti in questo campione non purificato, con il conseguente effetto di impedire la solubilizzazione di tali composti nell'ambito dei trattamenti usati. Al tempo stesso, la frazione estratta dopo transesterificazione è particolarmente ricca e la predominanza degli acidi dicarbossilici, in questa come nelle altre frazioni, può dipendere da condizioni ambientali che favoriscono l'ulteriore ossidazione degli idrossiacidi ad acidi dicarbossilici. Anche in questo caso, comunque, l'efficacia della reazione di transesterificazione trova conferma nella bassa percentuale di carbonio organico estratto nella successiva reazione di idrolisi alcalina.

Nel caso dell'umina estratta dal suolo di Vico e trattata con HF e HCl, la procedura analitica di frazionamento ha portato all'estrazione del 45% circa del carbonio organico totale presente nel campione di partenza (dati i pesi dei residui finali), ma solo l'11.5% viene identificato nelle frazioni organiche analizzate alla GC/MS. Come nel caso dell'acido umico, l'estrazione dei composti non legati covalentemente alla matrice permette di separare una quantità di carbonio organico maggiore rispetto all'estrazione delle molecole esterificate, di cui la stragrande maggioranza anche in questo caso viene estratta con il trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$. Come nel caso dell'umina non trattata, infine, le condizioni ambientali, data la predominanza degli acidi dicarbossilici,

sembrano aver favorito l'ossidazione dei composti provenienti per lo più dal forte contributo dato dai principali blocchi costituenti dei polimeri vegetali.

5.2 Pirolisi-GC/MS

La pirolisi con metilazione *in situ* consente l'analisi strutturale delle macromolecole. In questo processo vengono prodotti metil esteri di acidi carbossilici e metil eteri di composti ossidrilici. È stato dimostrato con esteri alifatici e acidi benzencarbossilici standard che questa procedura è una chemolisi assistita termicamente piuttosto che una vera e propria pirolisi seguita dalla metilazione *in situ* dei prodotti. La presenza di idrossido di tetrametilammonio evita la decarbossilazione degli acidi aromatici e la deidratazione dei prodotti alcolici inizialmente presenti come esteri, prevenendo così la perdita di importanti informazioni strutturali (de Leeuw & Baas, 1993). Questa tecnica, relativamente nuova, è stata introdotta da Challinor (1989) per la pirolisi e la simultanea metilazione dei polimeri fenolici ed è stata poi applicata a molti biopolimeri, quali la lignina (Clifford *et al.*, 1995; Kuroda, 2002), la cutina e la suberina (del Rio & Hatcher, 1998; Santos Bento *et al.*, 2001), alle sostanze umiche (Saiz-Jimenez, 1994; Martín *et al.*, 1994; Martín *et al.*, 1995; Grasset & Amblès, 1998; Guignard *et al.*, 2000) ed alla sostanza organica totale del suolo (Nierop, 2001; Nierop *et al.*, 2001).

Data la composizione complessa e variabile delle sostanze umiche, nei pirolizzati delle frazioni solubili in acqua separate dopo la reazione di transesterificazione e dei residui solidi rimanenti dopo la reazione di idrolisi alcalina e dopo il trattamento con acido iodidrico è stata identificata un'ampia gamma di prodotti di diversa origine, quali lipidi derivati da piante e microrganismi, macromolecole di

origine microbica e biomacromolecole derivate dalle cuticole vegetali, come cutine e suberine, ma anche cutani e suberani.

La distribuzione dei prodotti alifatici identificati nei vari campioni umici qui esaminati riflette il contributo da parte delle piante superiori. Infatti, i metil esteri degli acidi monocarbossilici saturi ed insaturi ed i dimetil esteri degli acidi α,ω -dicarbossilici sono generati dalla transesterificazione degli esteri corrispondenti, che fanno parte dei blocchi costitutivi della cutina e della suberina. Sebbene questi biopolimeri siano solo costituenti minori della biomassa originale, il loro contributo è così alto poiché sono più refrattari alla biodegradazione di altri componenti vegetali più importanti, inclusa la lignina (Martín *et al.*, 1995). Tuttavia, non sono stati identificati altri composti caratteristici della cutina e della suberina, quali i diidrossiacidi a 16 o 18 atomi di carbonio e gli ω -idrossiacidi, solitamente rilevati tra i prodotti pirolitici delle sostanze umiche (Martín *et al.*, 1995; Guignard *et al.*, 2000). Altri composti che comunemente vengono prodotti durante la pirolisi delle sostanze umiche (Grasset & Amblès, 1998) sono le serie di doppiette di alcheni/alcani, la cui origine non è stata ancora del tutto chiarita. Possibili fonti sono i biopolimeri vegetali difficilmente idrolizzabili, quali cutani (Nip *et al.*, 1986) o suberani (Tegelaar *et al.*, 1995), polimeri microbici (Lichtfouse *et al.*, 1995) oppure lipidi polimerizzati sui minerali argillosi (Almendros *et al.*, 1996). Gli alcheni a catena corta identificati in alcuni campioni potrebbero, invece, derivare dalla pirolisi dei complessi argillo-organici (Nierop & van Bergen, 2002), mentre gli alcani a catena molto lunga (C_{29} , C_{31} , C_{33}) sono tipici del materiale erbaceo (van Bergen *et al.*, 1997). La distribuzione dei composti alifatici identificati non mostra differenze sostanziali tra i vari residui analizzati, se non la presenza di catene alifatiche più lunghe nel caso della frazione acquosa separata dopo transesterificazione e del

residuo solido rimanente dopo idrolisi alcalina dell'acido umico, che potrebbe indicare per questo campione un maggiore contributo da parte della suberina.

I composti aromatici identificati nei pirogrammi delle frazioni analizzate mostrano il contributo di tutti i blocchi costituenti della lignina, ossia delle unità *p*-cumariliche, guaiaciliche e siringiliche. In termini generali, le unità *p*-cumariliche derivano dall'alcool *p*-cumarico (4-[3-idrossi-1-propenil] fenolo) e sono caratteristiche delle piante erbacee, le unità guaiaciliche, specifiche delle gimnosperme, hanno origine dal guaiacolo (2-metossifenolo), mentre le unità siringiliche, derivate dal siringolo (2,6-dimetossifenolo) sono tipiche delle angiosperme (Martín *et al.*, 1995). I prodotti pirolitici da loro derivati sono, ad esempio, i metil *p*-metossicinnamati, i metossifenoli, i metil mono, di e tri-metossibenzoati, i mono, di e tri-metossibenzeni e così via. Anche gli alchilbenzeni possono originarsi dalla lignina (Saiz-Jimenez & de Leeuw, 1986), ma sono stati identificati in precedenza anche nei pirolizzati delle proteine (van Bergen *et al.*, 1998) e dei polisaccaridi (Pouwels *et al.*, 1989), mentre i fenoli ed i metilfenoli derivano più probabilmente dai polifenoli solubili in acqua presenti nelle piante (Harborne, 1997). Sono stati identificati anche prodotti poliaromatici (naftalene, antracene) che derivano da dense strutture aromatiche presenti nel carbone (Pastorova *et al.*, 1994).

Un altro consistente gruppo di prodotti identificati nei pirogrammi delle frazioni analizzate è rappresentato dai composti contenenti azoto. Pirroli, piridine, indoli, benzonitrili ed altri composti N-eterociclici, più che prodotti di degradazione pirolitica di altre molecole, sono stati considerati come blocchi costitutivi della sostanza organica del suolo (Schulten & Schnitzer, 1998). Tuttavia, sia che siano prodotti di pirolisi sia che siano presenti tal quali nella sostanza organica del suolo, questi composti derivano

da aminoacidi, proteine ed altri polipeptidi (van Bergen *et al.*, 1998, Schulten & Schnitzer, 1998). Sono stati identificati anche alcuni composti (1H-pirrolo-2-carbossaldeide) attribuibili alla chitina presente sia nei glucani delle pareti cellulari dei funghi (Windig *et al.*, 1982) sia negli artropodi (Stankiewicz *et al.*, 1996), mentre ancora incerta è la fonte di composti quali il 2-metilbenzoxazolo, la chinolina e l'isochinolina, identificati anche in precedenza (Nierop *et al.*, 2001).

Infine, un contributo, seppur minimo, è dato dai prodotti derivati dai polisaccaridi. In precedenza, tali prodotti sono risultati dominanti nei pirolizzati del materiale vegetale fresco, ma meno abbondanti nei pirolizzati dei campioni di suolo (van Bergen *et al.*, 1997, 1998; Nierop *et al.*, 2001). Nei campioni qui esaminati sono stati identificati solo furani e loro derivati. Tuttavia, tali composti hanno pesi molecolari bassi e non possono essere messi in relazione ad uno specifico zucchero.

Come per i composti alifatici, anche per quelli aromatici ed azotati la tipologia di composti nei vari campioni presi in considerazione non mostra variazioni di rilievo. Da notare è solo l'aumento del rapporto aromatici/alifatici nei residui solidi rimanenti dopo l'idrolisi alcalina ed il trattamento con acido iodidrico rispetto alla frazione solubile in acqua separata dopo la transesterificazione, per ciascun campione esaminato. Tale variazione, confermata anche dagli spettri CPMAS-¹³C-NMR, rispecchia la diversa natura e composizione delle frazioni acquose e dei residui solidi separati nel corso della procedura estrattiva. I risultati ottenuti con questa tecnica suggeriscono che le componenti alifatiche vengono rimosse in maniera efficace con i trattamenti blandi applicati, mentre le componenti aromatiche non vengono solubilizzate in maniera significativa.

5.3 Analisi ESI/MS

L'applicabilità della tecnica ESI/MS alle sostanze umiche è ancora oggetto di dibattito. Una caratterizzazione basata sulla valutazione della distribuzione della massa molecolare per tali sostanze può essere complicata dal fatto che esse sono miscele complesse di natura eterogenea, di cui non tutte le componenti vengono ionizzate nella stessa misura e rilevate con la stessa intensità. Una fonte di errore è stata per lungo tempo considerata la possibilità che si formassero, nel processo di ionizzazione, ioni a carica multipla, cosa che avrebbe rappresentato un pregiudizio a favore delle molecole umiche con bassi valori di peso molecolare medio (Novotny & Rice, 1995). Tuttavia, utilizzando l'ESI in combinazione con la spettrometria di massa per risonanza di ciclotrone ionica in trasformata di Fourier ad alta risoluzione (FT IRC-MS), è stata dimostrata la presenza di soli ioni a carica singola nei materiali umici (Stenson *et al.*, 2002; Stenson *et al.*, 2003), potendo escludere così la formazione di ioni a carica multipla. Inoltre, non sono state riscontrate evidenze dirette della frammentazione in sorgente delle molecole umiche più grandi, con conseguente formazione di ioni artificiali a bassa massa molecolare, proposta da These e Reemtsma (2003). In ogni caso, si deve considerare la forte dipendenza dell'efficacia della ionizzazione dal solvente utilizzato e da parametri strumentali, quali il volume di campione iniettato ed il voltaggio di cono. Di conseguenza, questa variabilità rende molto delicata la fase di ottimizzazione delle condizioni di misura.

5.3.1 Spettri di massa ESI per infusione diretta

La notevole differenza riscontrata nell'intensità degli spettri ottenuti utilizzando come solvente la soluzione acquosa di acetato di ammonio ed acetonitrile oppure quella

di ammoniaca ed acetonitrile è un riflesso della forte influenza che il solvente può esercitare sul processo di ionizzazione. La presenza di ammoniaca, piuttosto che di acetato di ammonio, favorisce la deprotonazione dei gruppi funzionali carbossilici, alcolici e fenolici presenti nei campioni analizzati, facendo quindi aumentare l'intensità degli spettri ottenuti ed il rapporto segnale/rumore. Di conseguenza, i valori di M_n e di M_w calcolati utilizzando il secondo solvente sembrano rispecchiare meglio la realtà, essendo meno influenzati dal rumore di fondo.

Anche l'aumento di intensità degli spettri all'aumentare del volume di campione iniettato è una conseguenza della maggiore efficacia del processo di ionizzazione. Negli spettri ottenuti con l'iniezione di 20 μL di campione l'intensità è piuttosto bassa ed il rumore di fondo, relativamente elevato, va ad influire in maniera significativa sul calcolo dei valori di M_n e di M_w , che risultano spostati verso valori di massa più alti. Più attendibili sono, invece, i valori di M_n e di M_w calcolati iniettando 40 e 60 μL di campione. La maggior parte delle misure, quindi, è stata effettuata con 40 μL , giungendo così ad un buon compromesso tra volume di campione ed intensità degli spettri.

Un altro parametro critico, che può influenzare la ionizzazione complessiva delle molecole umiche, è il voltaggio di cono applicato durante il processo di ionizzazione. Leenheer e colleghi (2001) hanno evidenziato la frammentazione di acidi carbossilici standard a basso peso molecolare con la variazione del voltaggio di cono da -20 a -70 V. Anche per la ionizzazione di sostanze umiche acquatiche (These & Reemtsma, 2003), con l'aumento del voltaggio di cono da -20 a -140 V, negli spettri di massa è stato notato lo spostamento della distribuzione dei picchi verso valori di m/z più bassi. Tale spostamento è stato imputato ad una frammentazione più intensa delle componenti ad

alto peso molecolare con conseguente produzione di molecole più piccole. La scelta di valori piuttosto elevati di voltaggio di cono utilizzati in questo lavoro di tesi è stata dettata dalla necessità di ottenere, nelle condizioni strumentali applicate, un'intensità degli spettri sufficiente a garantire un elevato rapporto segnale/rumore e, di conseguenza, una buona valutazione dei valori di M_n e di M_w . Come valori limite sono stati scelti -90 e -150 V, avendo un'indagine iniziale mostrato che a -60 V gli spettri di massa avevano lo stesso andamento, ma un'intensità inadeguata. Contrariamente a quanto riportato da altri autori (These & Reemtsma, 2003), quindi, la distribuzione dei picchi non è risultata variabile al variare del voltaggio di cono ed i valori di M_n e di M_w calcolati a -90 e -150 V non hanno mostrato differenze significative. La leggera inferiorità dei valori calcolati a -150 V, rispetto a quelli calcolati a -90 V, va correlata alla maggiore intensità degli spettri piuttosto che alla frammentazione delle molecole.

L'aumento dei pesi molecolari medi all'avanzare della procedura di frazionamento, passando dunque dal tal quale al residuo solido derivante dalla reazione di idrolisi alcalina e poi al residuo finale, può spiegarsi con la diversa composizione delle varie frazioni, già evidenziata con le pirolisi e confermata anche dagli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR. Nonostante la forma degli spettri delle varie frazioni sia simile, la composizione molecolare di ogni frazione e, di conseguenza, la sua disposizione spaziale in soluzione differisce da quella delle altre, e questo può avere un effetto sulla formazione di ioni nel processo di ionizzazione. Quando miscele di composti, come le sostanze umiche, vengono analizzate con la tecnica ESI/MS, i composti presenti sulla superficie delle gocce generate dalla sorgente ESI possono completamente mascherare la presenza dei composti che sono più solubili nella parte interna della goccia (De Hoffmann & Stroobant, 2001). Dal momento che per fattori termodinamici, quali gli

effetti idrofobici, le molecole che si concentrano in superficie sono quelle idrofobiche, sono proprio queste ultime ad essere rilevate all'ESI in maniera preferenziale rispetto alle molecole più idrofiliche, mantenute ben dissolte dall'acqua nella parte interna della goccia (Piccolo & Spiteller, 2003). Di conseguenza, i pesi molecolari medi risultano dominati prevalentemente dalle componenti idrofobiche, quali gli acidi grassi e le catene alchiliche lunghe. La progressiva diminuzione di queste ultime, all'avanzare della procedura di frazionamento, determina una ionizzazione più efficiente dei composti polari ed i pesi molecolari medi aumentano di conseguenza. La limitatezza dell'ESI/MS nella ionizzazione delle molecole in miscele complesse, contenenti composti idrofobici ed idrofilici allo stesso tempo, è stata considerata la causa della similarità riscontrata nei valori delle masse molecolari medie degli acidi umici tal quali e delle loro frazioni dimensionali separate tramite HPSEC preparativa (Piccolo & Spiteller, 2003).

5.3.2 Spettri di massa ESI con HPSEC analitica on-line

Oltre che per infusione diretta, l'ESI/MS è stata spesso applicata alle sostanze umiche in accoppiamento con la cromatografia ad esclusione molecolare ad alta prestazione (HPSEC) *on-line* (Pfeifer *et al.*, 2001; Reemtsma & These, 2003; These & Reemtsma, 2003; Piccolo & Spiteller, 2003). Infatti, la separazione cromatografica determinata dall'HPSEC riduce la complessità delle miscele prese in esame, migliorandone la ionizzazione.

I risultati ottenuti a riguardo sembrano essere discordanti. These e Reemtsma (2003), applicando la separazione SEC *on-line*, hanno mostrato che l'aumento progressivo del voltaggio d con porta ad un aumento dell'intensità ionica totale e ad

uno spostamento del picco cromatografico verso tempi di eluizione più bassi, che sono tipici dei composti a più alto peso molecolare. In contraddizione con questo risultato, lo spostamento della distribuzione di massa multimodale verso valori di m/z decrescenti all'aumentare del voltaggio di cono è stato attribuito alla frammentazione sempre più spinta nella sorgente delle molecole in unità a peso molecolare minore. Per tale ragione, pur ammettendo che la determinazione dei pesi molecolari medi è più affidabile quando i campioni vengono frazionati tramite SEC per ridurre la polidispersione (M_w/M_n) prima dell'analisi MS, l'accoppiamento SEC-ESI/MS non è stato ritenuto da questi autori una tecnica adatta alla determinazione dei pesi molecolari medi degli acidi umici e fulvici.

Al contrario, Piccolo e Spiteller (2003) hanno attribuito le discrepanze riscontrate tra i valori dei pesi molecolari medi dell'acido umico tal quale e quelli delle varie frazioni dimensionali da esso separate alla ionizzazione differenziale delle varie classi di molecole eterogenee che costituiscono il materiale umico, dimostrando così che tramite HPSEC *on-line* si possono ulteriormente separare molecole umiche distinte per incrementarne l'efficienza di ionizzazione tramite ESI.

L'applicazione della separazione HPSEC *on-line* sui campioni esaminati in questo lavoro di tesi non ha determinato l'effetto sperato. Per ciascun campione sottoposto a separazione HPSEC si è ottenuto, infatti, un singolo picco cromatografico, con una distribuzione di massa nel relativo spettro ESI del tutto simile a quella ottenuta per infusione diretta. In effetti, l'ulteriore separazione attraverso HPSEC analitica *on-line* era stata registrata solo per le frazioni di dimensioni molecolari minori, in cui il contenuto di componenti idrofobiche è presumibilmente più basso (Piccolo & Spiteller, 2003).

In ogni caso, per tutti i campioni analizzati, i valori di M_n e di M_w determinati sia per infusione diretta che attraverso HPSEC analitica *on-line* sono risultati generalmente <1000 Da, confermando dunque la teoria secondo cui le sostanze umiche, più che macropolimeri, sono associazioni supramolecolari di dimensioni molecolari solo apparentemente grandi.

5.4 Analisi DRIFT

Gli spettri DRIFT acquisiti per i campioni umici presi in esame e per le loro frazioni, separate nel corso della procedura analitica applicata loro, forniscono delle indicazioni generali circa la diversificazione dei gruppi funzionali nelle varie fasi della procedura.

Nella frazione acquosa separata dopo la reazione di transesterificazione dell'acido umico estratto dal suolo di Vico, la diminuzione del segnale corrispondente ai carbossilati ed il prevedibile aumento del segnale relativo ai gruppi funzionali più idrofilici, come quelli polisaccaridici (1083 cm^{-1}) ed ammidici ($1560\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$), risultano evidenti dal confronto con lo spettro dell'acido umico tal quale. Nel residuo rimanente dopo l'idrolisi alcalina, invece, le condizioni di reazione provocano la deprotonazione dei gruppi carbossilici e questo può spiegare l'aumento della banda corrispondente all'assorbimento dei gruppi carbossilati (1590 e 1380 cm^{-1}). Tuttavia, la banda a 1590 cm^{-1} è piuttosto slargata e si può supporre che copra il segnale proveniente dagli aromatici. Tale ipotesi sembra essere avvalorata dalla maggiore evidenza dell'assorbimento da parte dei carboni aromatici nello spettro del residuo solido finale rimanente dopo il trattamento con acido iodidrico (1144 cm^{-1}), in cui si evidenzia anche un'ulteriore diminuzione dei segnali provenienti dai carboni alifatici.

Similmente, anche nel caso dell'acido fulvico, l'ampiezza della banda centrata attorno a 1630 cm^{-1} nello spettro del residuo rimanente dopo idrolisi alcalina riflette l'aumento relativo degli aromatici, suffragato dalle bande dei fenoli intorno a 1211 cm^{-1} .

Nel caso dell'umina, la situazione è differente rispetto a quella descritta per l'acido umico. Nella frazione acquosa l'ampiezza del segnale attribuibile ai gruppi Si-O (1033 cm^{-1}) è ridotta rispetto al campione tal quale, mentre diventa più intenso il segnale corrispondente al legame C-H degli alifatici e quello degli alcoli e/o fenoli. Data la scarsità di materiale a disposizione, non è stato nemmeno possibile investigare ulteriormente su questa anomalia, per esempio con la spettroscopia NMR in fase solida. Per quanto riguarda i residui dopo idrolisi alcalina e dopo trattamento con acido iodidrico, similmente al caso dell'acido umico, si verifica, come previsto, l'appiattimento dei segnali alifatici e carbossilici rispetto a quelli aromatici e resta piuttosto intenso l'assorbimento a 1112 cm^{-1} , attribuibile ai sistemi aromatici polisostituiti ma anche ai legami Si-O, probabilmente dovuti ai materiali silicatici presenti in questo campione residuo di suolo.

La frazione solubile in acqua dell'umina trattata presenta caratteristiche ancora diverse da quelle della stessa frazione dell'acido umico, ma meno inconsuete rispetto a quelle della frazione acquosa dell'umina non trattata. L'assorbimento a 1678 cm^{-1} può, infatti, essere attribuito ai gruppi ammidici, che potrebbero verosimilmente ripartirsi nella frazione idrofila. Tuttavia, anche in questo caso, la mancanza di quantità sufficienti di materiale ne impedisce una successiva verifica tramite spettroscopia NMR in fase solida. I due residui solidi restanti dopo idrolisi alcalina e dopo trattamento con acido iodidrico confermano, invece, quanto già visto per gli altri campioni, in

particolare l'aumento relativo del segnale attribuibile agli aromatici rispetto a quello degli alifatici.

Infine, gli spettri DRIFT dell'acido umico estratto dal suolo di Portici e delle sue frazioni confermano quanto visto per l'acido umico estratto dal suolo di Vico. Come verificato con gli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR, però, l'efficacia dei trattamenti di transesterificazione e di idrolisi alcalina è più bassa sull'acido umico di Portici, data la permanenza nel residuo corrispondente di segnali ancora intensi dovuti ai gruppi carbossilici. Nel residuo finale dopo trattamento con acido iodidrico, in ogni caso, questi segnali non sono più rilevabili e non ci sono differenze rispetto agli altri residui finali già esaminati.

I dati ottenuti con questo tipo di analisi spettroscopica sono, come visto, indicativi della variabilità dei gruppi funzionali presenti nei vari campioni, ma informazioni sicuramente più dettagliate sulla loro composizione chimica possono essere ricavate attraverso la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare in fase solida.

5.5 Analisi CPMAS- ^{13}C -NMR

I risultati ottenuti con le tecniche sinora considerate trovano conferma nelle informazioni strutturali ricavate dagli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR. Le variazioni di composizione chimica dei residui solidi ottenuti dopo la reazione di idrolisi alcalina e dopo il trattamento con acido iodidrico, rispetto ai corrispondenti campioni umici tal quali, sono piuttosto sistematiche, indicando dunque una buona riproducibilità dei trattamenti applicati ai diversi campioni di sostanze umiche.

Dagli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR risulta evidente che il trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, seguito dall'idrolisi alcalina con KOH in CH_3OH , determina, innanzitutto, la

prevista metilazione dei residui. Inoltre, l'aumento dell'intensità relativa dei sistemi aromatici è il riflesso dell'avvenuta rimozione selettiva dal campione del materiale alchilico, legato alla matrice umica per mezzo di legami esterei. Questi due trattamenti, soprattutto nel caso del campione di umina non trattata, sembrano rimuovere anche la maggior parte del materiale carboidratico, derivato probabilmente dall'alterazione dell'emicellulosa o da strutture glicolipidiche microbiche (Almendros *et al.*, 1998). Tuttavia, la ripartizione preferenziale del materiale carboidratico nelle frazioni solubili in acqua, confermata dalla presenza di grandi quantità di carboni polari di natura idrofilica nella frazione acquosa, separata dopo il trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, del campione di acido umico, ne rende impossibile l'identificazione tramite GC/MS.

I cambiamenti più significativi si verificano, comunque, dopo il trattamento con acido iodidrico, in seguito al quale si ottengono profili NMR tipici delle strutture simili al kerogene, con uno scheletro di sistemi aromatici a bassa funzionalità e di strutture alchiliche (Wilson, 1987). Il trattamento con acido iodidrico, oltre ad eliminare dai residui i metossili introdotti dal trattamento con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, rimuove anche tutte le strutture carboidratiche residue. In tutti i campioni, dunque, il trattamento con acido iodidrico fornisce un contributo solo addizionale all'estrazione dei carboni alchilici, la maggior parte dei quali è esterificata alla matrice umica e viene rimossa con le reazioni di transesterificazione e di idrolisi alcalina.

Gli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR, come del resto i risultati delle pirolisi, mostrano che il rapporto aromatici/alifatici tende ad aumentare nel corso dei successivi trattamenti. Ciononostante, nei residui finali si osserva ancora una certa quantità di carboni alchilici. La presenza del picco a circa 170 ppm, anche dopo il trattamento con acido iodidrico, sebbene molto ridotto rispetto al campione di partenza, indica la

notevole resistenza dei carboni carbonilici che può riflettere la presenza di esteri recalcitranti e non idrolizzabili, derivanti da biopolimeri alifatici quali cutani e suberani. Questo segnale NMR può derivare anche da materiale proteico recalcitrante o da gruppi carbossilici poco reattivi sulle superfici interne delle associazioni umiche (Almendros *et al.*, 1998). La predominanza delle unità aromatiche nei residui finali indica che solo una porzione limitata di queste è legata alla matrice umica mediante legami esterei oppure eterei, come suggerito anche dal contributo limitato di tali composti negli estratti organici analizzati tramite GC/MS. In precedenza, il segnale aromatico a 130 ppm negli spettri NMR in fase solida delle sostanze umiche di alcuni suoli è stato attribuito a carbone policondensato più che all'umificazione dei materiali vegetali (Haumaier & Zech, 1995). Pur non essendoci evidenze che escludono a priori che il carbone policondensato sia un precursore delle sostanze aromatiche di alcuni suoli, è difficile accertarne il contributo e, anche per la tipologia di composti identificati nei pirogrammi dei residui finali, è più probabile che la fonte delle componenti fenoliche sia rappresentata dalla lignina e da altri costituenti vegetali aromatici, quali i tannini. Inoltre, se anche le sostanze umiche avessero un "nucleo" aromatico, non si tratterebbe di un "nucleo" aromatico in senso stretto. Infatti, il materiale alchilico sembra organizzarsi in una complessa rete di composti ciclici e ramificati, con una significativa quantità di catene legate mediante legami ossigenati, esterei ed eterei principalmente, ma anche ammidici, stericamente protetti o associati con la frazione minerale. La presenza di quantità variabili di residui carbossilici nei livelli macromolecolari di diversa stabilità suggerisce, dunque, un'organizzazione gerarchica molto complessa dei gruppi funzionali contenenti ossigeno, sia sulle superfici che nelle regioni interne delle

associazioni umiche, che reagiscono e si condensano in maniera diversificata a formare la struttura delle sostanze umiche.

CAPITOLO 6

MODELLISTICA MOLECOLARE

Gli studi di modellistica circa le sostanze umiche rappresentano un valido strumento per chiarire la natura delle interazioni deboli che stabilizzano le molecole umiche nelle loro strutture supramolecolari. Tuttavia, la complessità e l'eterogeneità di questi materiali, così importanti a livello sia biologico sia ambientale, ne rende complicato lo sviluppo.

Il rapido progresso nel miglioramento di software di modellistica 3D ed il perfezionamento delle tecniche che forniscono dati strutturali sulle sostanze umiche naturali, quali la pirolisi-GC/MS e le tecniche spettroscopiche, in combinazione con i risultati chimici, fisici e biologici, favoriscono l'approccio modellistico tridimensionale alle sostanze umiche (Schulten, 1995; Schnitzer & Schulten, 1998).

Numerosi studi di modellistica riguardano i meccanismi cinetici e termodinamici di assorbimento di diverse classi di xenobiotici o di metalli pesanti alla sostanza organica naturale (Schulten *et al.*, 2001; Alvarez-Puebla *et al.*, 2005). Sforzi significativi sono stati fatti nell'ottica di migliorare la conoscenza dei possibili meccanismi delle interazioni intramolecolari ed intermolecolari tra xenobiotici e sostanza organica naturale ed all'interno della sostanza organica naturale stessa, in modo tale da consentire lo sviluppo di modelli che simulino in maniera accurata le interazioni tra materiale umico e contaminanti di diversa natura.

In tali studi sono state proposte svariate unità caratteristiche dei blocchi costituenti delle sostanze umiche (Steelink, 1985; Beckett, 1990; Stevenson, 1994; Jansen *et al.*, 1996; Schulten & Leinweber, 1996), con formule molecolari e distribuzione dei gruppi funzionali diverse.

In questo lavoro di tesi è stata sviluppata una serie di modelli molecolari rappresentativi delle frazioni estratte in ogni passo della procedura analitica di frazionamento sviluppata sul campione di acido umico del suolo di Vico (Capitolo 3), utilizzando come dati di riferimento i valori, mediati su due repliche, ricavati dall'analisi qualitativa e quantitativa dei cromatogrammi GC/MS degli estratti organici separati nelle varie fasi della procedura.

Il primo passo è consistito nella creazione di un data base, contenente tutte le principali molecole identificate alla GC/MS. Ogni molecola è stata disegnata con gli strumenti forniti dal programma di simulazione molecolare Discover, parte del software di modellistica 3D Materials Studio (Accelrys), e rifinita per produrre una conformazione stabile attraverso una procedura di ottimizzazione geometrica che minimizza l'energia totale della molecola.

A questo punto è stata costruita una cella per ciascuno dei tre estratti organici derivanti dalla procedura di frazionamento. In *Tabella 6.1, 6.2 e 6.3* in Appendice 3 sono riportati i criteri di scelta e le proprietà delle molecole che sono state inserite nelle celle rappresentanti rispettivamente i lipidi liberi estratti dall'acido umico, la frazione organica separata dopo la reazione di transesterificazione e quella separata dopo la reazione di idrolisi alcalina. In ciascuna frazione, sono state prese in considerazione le percentuali relative delle varie classi di composti, quantificate in base all'analisi dei cromatogrammi GC/MS. Nell'ambito di ciascuna classe, sono stati considerati uno

oppure due composti, presenti in quantità maggiori rispetto agli altri, ed è stato attribuito loro un valore percentuale che rispecchiasse la quantità di composto effettivamente presente nel campione. Tale valore, rapportato al valore percentuale della classe di composti corrispondente, è stato convertito proporzionalmente in un numero intero di molecole da inserire nella cella. In tal modo, nella cella rappresentante i lipidi liberi, sono state inserite 23 molecole, per un totale di 424 atomi di carbonio, 838 atomi di idrogeno e 74 di ossigeno. Nella cella rappresentante l'estratto organico separato dopo la reazione di transesterificazione, sono state inserite 26 molecole, per un totale di 434 atomi di carbonio, 836 atomi di idrogeno e 83 di ossigeno, e nella cella della frazione separata dopo idrolisi alcalina sono state inserite 25 molecole, per un totale di 458 atomi di carbonio, 894 atomi di idrogeno e 64 di ossigeno.

Nei casi dei due estratti dopo le reazioni di transesterificazione e di idrolisi alcalina, sono state costruite altre due celle, una per ciascun passo della procedura di frazionamento. Infatti, è stata valutata la considerazione che i composti identificati alla GC/MS nei due estratti organici sono, in realtà, i prodotti delle reazioni di transesterificazione e di idrolisi e che, di conseguenza, possono essere originariamente presenti sotto forma esterificata. In queste due celle aggiuntive, dunque, sono stati inseriti gli esteri derivanti dalla combinazione, del tutto casuale, dei gruppi carbossilici e dei gruppi alcolici presenti nelle celle originarie corrispondenti, come mostrato in *Tabella 6.4* ed in *Tabella 6.5* in Appendice 3, rispettivamente per l'estratto dopo transesterificazione e dopo idrolisi alcalina. Queste celle presentano, ovviamente, un numero di molecole più basso rispetto alle celle di partenza, ma il numero di atomi di carbonio resta invariato.

Infine, ogni cella costruita nel modo sopra descritto è stata affiancata da un'altra cella contenente le stesse molecole, differente solo per l'aggiunta di 100 molecole di acqua.

Tutte le celle sono state realizzate con la serie di strumenti computazionali offerti da Amorphous Cell, che consente di costruire modelli rappresentativi di sistemi amorfi complessi. Le celle, periodiche nelle tre dimensioni, sono state costruite a 298 K, con densità finale impostata a 1 g/cc ed con il campo di forza COMPASS (Condensed phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies), parametrizzato con metodi *ab initio* in un ampio intervallo di gruppi funzionali, in modo tale da poter predire proprietà strutturali, vibrazionali, conformazionali, equazioni di stato ed energie coesive per svariate molecole organiche e non (Sun, 1998). Per ogni cella sono state sviluppate 4 diverse configurazioni, tra le quali è stata scelta quella ad energia potenziale totale minore per effettuare una simulazione di dinamica molecolare tramite il programma Discover. Lo sviluppo di questi modelli nel tempo è stato simulato utilizzando il classico approccio di dinamica molecolare, che implica l'integrazione simultanea dell'equazione di moto di Newton per tutti gli atomi del sistema. Volume e temperatura dei sistemi sono stati mantenuti costanti (insieme termodinamico NVT), permettendo al sistema di scambiare calore con l'ambiente ad un valore controllato della temperatura (298 K) e ad un volume dipendente dalla densità predefinita. Il controllo della temperatura è stato effettuato con il metodo Andersen (Andersen, 1980). In tutti i sistemi esaminati, le interazioni di Coulomb e quelle di Van der Waals sono state calcolate con l'algoritmo della cella multipolo (Ding *et al.*, 1992). Inoltre, il tempo di ciascun passo della simulazione dinamica è stato fissato ad un valore di 1 fs nell'algoritmo d'integrazione utilizzato (Verlet, 1967). Considerando un tempo totale di

125 ps, si è ottenuto un buon compromesso tra la stabilità dell'energia potenziale durante il tempo della simulazione ed il tempo di corsa effettivo. Ogni 250esima configurazione all'equilibrio è stata salvata per scopi analitici.

Il programma di simulazione molecolare Discover fornisce, infatti, una serie di strumenti per l'analisi delle proprietà sia strutturali sia dinamiche delle traiettorie generate dalle simulazioni sviluppate. Per esempio, la funzione di distribuzione delle lunghezze può dare una misura della distanza tra l'inizio e la fine di ciascuna molecola, permettendo di avere informazioni circa la disposizione e la geometria molecolare durante la simulazione. La funzione di distribuzione radiale $g(r)$, invece, è una misura della probabilità che, data la presenza di un certo atomo all'origine di un quadro arbitrario di riferimento, ci sia un altro atomo situato alla distanza r dal primo. Questa funzione è di fondamentale importanza, dal momento che consente di relazionare i vari gruppi funzionali (o anche i singoli atomi dei gruppi funzionali) tra loro e con gli altri, determinando separatamente i contributi intramolecolari e quelli intermolecolari.

Un'altra analisi strutturale utile per investigare i modelli sviluppati è quella dei profili di concentrazione, specifica per osservare l'interpenetrazione delle specie, in maniera tale da poter ipotizzare la presenza di tasche idrofobiche ed idrofiliche. Infine, un'analisi di tipo dinamico come quella dello spostamento quadratico medio può essere di grande interesse per determinare la mobilità delle specie e sottolineare le differenze tra i diversi tipi di molecole e soprattutto tra i sistemi con e senza acqua.

Tuttavia, in questo lavoro di tesi è stato intrapreso soltanto uno studio preliminare di modellistica, che non ha riguardato l'analisi dei modelli costruiti. In un futuro, però, la determinazione delle proprietà sia strutturali sia dinamiche dei sistemi molecolari sopra descritti, attraverso gli strumenti forniti dal programma di simulazione

adottato, potrebbe permettere di ricavare dettagliate informazioni circa le geometrie molecolari, le conformazioni, le associazioni fisiche e chimiche e la mobilità delle varie componenti delle sostanze umiche, contribuendo a migliorare la comprensione di sistemi molecolari tanto complessi. Risulta essenziale, dunque, che lo studio iniziale qui riportato sia approfondito ed ampliato.

APPENDICE 3

CLASSI DI COMPOSTI	%	COMPOSTO	%	N° molecole	FORMULA MOLECOLARE	M _w	C(%)	H(%)	O(%)
acidi monocarbossilici	27.1								
		acido esadecanoico	13.3	3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	75.0	12.5	12.5
		acido ottadecanoico	13.8	3	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	76.1	12.7	11.3
acidi dicarbossilici	25.9								
		acido esadecandioico	14.9	3	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286	67.1	10.5	22.4
		acido docosandioico	11.0	3	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370	71.2	11.3	17.3
alcoli	2.7								
		1-ottadecanolo	2.7	1	C ₁₈ H ₃₈ O	270	79.7	14.0	5.9
α, β-idrossiacidi	4.9	acido 3-idrossitetradecanoico	4.9	1	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	244	68.9	11.5	19.7
? -idrossiacidi	19.1	acido 22-idrossidocosanoico	19.1	4	C ₂₂ H ₄₄ O ₃	356	73.9	12.3	13.4
di, tri- idrossiacidi	20.0	acido 10,16-diidrossiesadecanoico	4.5	1	C ₁₆ H ₃₂ O ₄	288	66.7	11.1	22.2
		acido 9,10-diidrossiottadecanoico	9.0	2	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	316	68.4	11.4	20.3
		acido 9,10,18-triidrossiottadecanoico	6.5	2	C ₁₈ H ₃₆ O ₅	332	65.1	10.8	24.1
alcani, alcheni	0.3								
		triacontano	0.3	0	C ₃₀ H ₆₂	423	85.1	14.7	0
		TOT		23	C₄₂₄H₈₃₈O₇₄	7110	71.5	11.8	16.6

Tabella 6.1: Criteri di scelta e proprietà delle molecole inserite nel modello rappresentante la frazione dei lipidi liberi estratti dall'acido umico del suolo di Vico.

CLASSI DI COMPOSTI	%	COMPOSTO	%	N° molecole	FORMULA MOLECOLARE	Mw	C(%)	H(%)	O(%)
acidi monocarbossilici	5.9								
		acido esadecanoico	3.2	1	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	75	12.5	12.5
		acido ottadecanoico	2.7	1	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	76.1	12.7	11.3
acidi dicarbossilici	6.2								
		acido 3-idrossiundecandioico	3.0	1	C ₁₁ H ₂₀ O ₅	232	56.9	8.6	34.5
		acido esadecandioico	3.2	1	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286	67.1	10.5	22.4
alcoli	4.9								
		1-ottadecanolo	2.3	1	C ₁₈ H ₃₈ O	271	79.7	14.0	5.9
		1-tetracosanolo	2.6	1	C ₂₄ H ₅₀ O	354	81.4	14.1	4.5
α , β -idrossiacidi	27.7								
		acido 3-idrossitetradecanoico	10.9	2	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	244	68.9	11.5	19.7
		acido 3-idrossipentadecanoico	8.3	2	C ₁₅ H ₃₀ O ₃	258	69.8	11.6	18.6
		acido 3-idrossieptadecanoico	8.5	2	C ₁₇ H ₃₄ O ₃	286	71.3	11.9	16.8
? -idrossiacidi	19.9								
		acido 16-idrossiesadecanoico	8.4	2	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	272	70.6	11.8	17.6
		acido 18-idrossi-9-ottadecenoico	11.5	3	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	298	72.5	11.4	16.1
di, tri- idrossiacidi	29.7								
		acido 9,10-diidrossiottadecanoico	9.4	2	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	316	68.4	11.4	20.3
		acido 10,18-diidrossiottadecanoico	11.2	2	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	316	68.4	11.4	20.3
		acido 9,10,18-triidrossiottadecanoico	9.1	2	C ₁₈ H ₃₆ O ₅	332	65.1	10.8	24.1
composti aromatici	4.8								
		acido 3,4 -diidrossibenzoico	2.0	1	C ₇ H ₆ O ₄	154	54.5	3.9	41.6
		acido 3,4 -diidrossicinnamico	2.8	1	C ₉ H ₈ O ₄	180	60	4.4	35.6
steroli	0.9	sitosterolo	0.9	1	C ₂₉ H ₅₀ O	414	84.1	12.1	3.9
		TOT		26	C₄₃₄H₈₃₆O₈₃	7372	70.5	11.3	18.0

Tabella 6.2: Criteri di scelta e proprietà delle molecole inserite nel modello rappresentante la frazione estratta dopo transesterificazione dall'acido umico del suolo di Vico.

CLASSI DI COMPOSTI	%	COMPOSTO	%	N° molecole	FORMULA MOLECOLARE	Mw	C(%)	H(%)	O(%)
acidi monocarbossilici	20.9								
		acido esadecanoico	14.1	3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	75	12.5	12.5
		acido ottadecanoico	6.8	2	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	76.1	12.7	11.3
acidi dicarbossilici	13.2								
		acido nonandioico	13.2	3	C ₉ H ₁₆ O ₄	188	57.4	8.5	34.0
alcoli	7.5								
		1-docosanol	7.5	2	C ₂₂ H ₄₆ O	326	81.0	14.1	4.9
α , β - idrossiacidi	7.4	acido 3-idrossitetraicosanoico	7.4	2	C ₂₄ H ₄₈ O ₃	384	75.0	12.5	12.5
? - idrossiacidi	22.3	acido 16-idrossiesadecanoico	11.0	2	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	272	70.6	11.8	17.6
		acido 22-idrossidocosanoico	11.3	3	C ₂₂ H ₄₄ O ₃	356	74.2	12.4	13.5
di, tri - idrossiacidi	14.1	acido 9,18-diidrossiottadecanoico	14.1	3	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	316	68.4	11.4	20.3
composti aromatici	6.1								
		acido 4-idrossibenzoico	6.1	2	C ₇ H ₆ O ₃	138	60.9	4.3	34.8
steroli	2.9	sitosterolo	2.9	1	C ₂₉ H ₅₀ O	414	84.1	12.1	3.9
alcani, alcheni	5.6	triacontano	5.6	2	C ₃₀ H ₆₂	422	85.3	14.7	
		TOT		25	C₄₅₈H₈₉₄O₆₄	7414	74.1	12.1	13.8

Tabella 6.3: Criteri di scelta e proprietà delle molecole inserite nel modello rappresentante la frazione estratta dopo idrolisi alcalina dall'acido umico del suolo di Vico.

<i>gruppo COOH + gruppo OH</i>	N° molecole	FORMULA MOLECOLARE	Mw	C(%)	H(%)	O(%)
acido esadecanoico + acido 3,4 -diidrossicinnamico	1	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418	71.8	9.1	19.1
acido ottadecanoico + acido 3,4 -diidrossibenzoico	1	C ₂₅ H ₄₀ O ₅	420	71.4	9.5	19.0
acido 3-idrossiundecandioico + sitosterolo	1	C ₄₀ H ₇₀ O ₅	630	76.2	11.1	12.7
acido esadecandioico + acido 9,10,18-triidrossiottadecanoico	1	C ₃₄ H ₆₄ O ₈	600	68.0	10.7	21.3
acido 10,18 -diidrossiottadecanoico + 1-ottadecanolo	1	C ₃₆ H ₇₂ O ₄	568	76.1	12.7	11.3
acido 9,10-diidrossiottadecanoico + 1-tetracosanolo	1	C ₄₂ H ₈₄ O ₄	652	77.3	12.9	9.8
acido 3-idrossitetradecanoico + acido 18-idrossi-9-ottadecenoico	1	C ₃₂ H ₆₀ O ₅	524	73.3	11.5	15.3
acido 3-idrossipentadecanoico + acido 16-idrossiesadecanoico	1	C ₃₁ H ₆₀ O ₅	512	72.7	11.7	15.6
acido 9,10,18-triidrossiottadecanoico + acido 3-idrossieptadecanoico	1	C ₃₅ H ₆₈ O ₇	600	70.0	11.3	18.7
acido 10,18 -diidrossiottadecanoico + acido 3-idrossitetradecanoico	1	C ₃₂ H ₆₂ O ₆	542	70.8	11.4	17.7
acido 3-idrossipentadecanoico + acido 9,10-diidrossiottadecanoico	1	C ₃₃ H ₆₄ O ₆	556	71.2	11.5	17.3
acido 18-idrossi-9-ottadecenoico + acido 3-idrossieptadecanoico	1	C ₃₅ H ₆₆ O ₅	566	74.2	11.7	14.1
acido 16-idrossiesadecanoico + acido 18-idrossi-9-ottadecenoico	1	C ₃₄ H ₆₄ O ₅	552	73.9	11.6	14.5
TOT	13	C₄₃₄H₈₁₂O₇₀	7140	72.9	11.4	15.7

Tabella 6.4: Abbinamento dei gruppi carbossilici e dei gruppi alcolici delle molecole inserite nel modello rappresentante la frazione estratta

dopo transesterificazione dall'acido umico del suolo di Vico.

<i>gruppo COOH + gruppo OH</i>	N° molecole	<i>FORMULA MOLECOLARE</i>	<i>Mw</i>	<i>C(%)</i>	<i>H(%)</i>	<i>O(%)</i>
acido esadecanoico + acido 4-idrossibenzoico	1	$C_{23}H_{36}O_4$	376	73.4	9.6	17.0
acido ottadecanoico + sitosterolo	1	$C_{47}H_{84}O_2$	680	82.9	12.4	4.7
acido nonandioico + acido 9,18-diidrossiottadecanoico	1	$C_{27}H_{50}O_7$	486	66.7	10.3	23.0
acido 22-idrossidocosanoico + 1-docosanol	1	$C_{44}H_{88}O_3$	664	79.5	13.3	7.2
acido 3-idrossitetraicosanoico + acido 16-idrossiesadecanoico	1	$C_{40}H_{78}O_5$	638	75.2	12.2	12.5
acido esadecanoico + acido 9,18-diidrossiottadecanoico	1	$C_{34}H_{66}O_5$	554	73.6	11.9	14.4
acido ottadecanoico + acido 4-idrossibenzoico	1	$C_{29}H_{40}O_4$	404	74.3	9.9	15.8
acido nonandioico + acido 22-idrossidocosanoico	1	$C_{31}H_{58}O_6$	526	70.7	11.0	18.3
acido 16-idrossiesadecanoico + 1-docosanol	1	$C_{38}H_{76}O_3$	580	78.6	13.1	8.3
acido 3-idrossitetraicosanoico + acido 9,18-diidrossiottadecanoico	1	$C_{42}H_{82}O_6$	682	73.9	12.0	14.1
acido esadecanoico + acido nonandioico + acido 22-idrossidocosanoico	1	$C_{47}H_{88}O_7$	764	73.8	11.5	14.7
triacontano	2	$C_{30}H_{62}$	422	85.3	14.7	
TOT	13	$C_{458}H_{870}O_{52}$	7198	76.4	12.1	11.6

Tabella 6.5: Abbinamento dei gruppi carbossilici e dei gruppi alcolici delle molecole inserite nel modello rappresentante la frazione estratta

dopo idrolisi alcalina dall'acido umico del suolo di Vico.

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI

I risultati dell'attività sperimentale svolta in questo lavoro di tesi hanno confermato le potenzialità offerte dalla combinazione delle tecniche separative e spettroscopiche adoperate per la caratterizzazione molecolare delle sostanze umiche estratte da suolo vulcanico.

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ha mostrato con chiarezza l'efficacia delle varie estrazioni effettuate in sequenza e l'avvenuta rimozione selettiva dalle strutture umiche di partenza del materiale alchilico, legato alla matrice umica per mezzo di legami esterei ed eterei. Dal momento che la maggior parte di tale materiale è presente in forma esterificata nella matrice umica, le reazioni di transesterificazione e di idrolisi alcalina ne hanno rimosso la percentuale più alta. Tuttavia, anche il trattamento con acido iodidrico si è dimostrato di fondamentale importanza, soprattutto per la rimozione dei gruppi metossilici introdotti con i precedenti trattamenti e delle strutture carboidratiche residue.

La procedura adottata per l'identificazione molecolare del materiale umico, benché puntuale e quantitativa, non è, comunque, esaustiva. In particolare, non è stata possibile, con i metodi impiegati, l'identificazione dei composti legati alla matrice organica che vengono rilasciati nella fase acquosa per rottura dei legami eterei (principalmente carboidrati). Analogamente, la ripartizione preferenziale del materiale

carboidratico e proteico nelle frazioni solubili in acqua, ne ha impedito il riconoscimento diretto tramite GC/MS, limitando le informazioni a riguardo a quelle fornite dalle pirolisi. Questo, in ogni caso, non esclude che tali materiali potranno essere meglio caratterizzati in futuro attraverso l'utilizzo di procedure di isolamento e derivatizzazione diverse da quella qui sperimentata, per quanto riguarda i composti legati alla matrice per mezzo di legami eteri, e di tecniche analitiche specifiche per le frazioni solubili in acqua, per quanto riguarda il materiale più idrofilico come un'estesa applicazione della spettrometria di massa alla fase acquosa.

I dati raccolti mediante GC/MS circa la composizione molecolare dei vari estratti organici separati dopo ciascuna fase della procedura di frazionamento, hanno contribuito alla ricostruzione della struttura molecolare di partenza, confermando la presenza nel materiale unico di un gran numero di molecole eterogenee di varia natura. Da non sottovalutare è anche la conclusione a cui si è giunti confrontando la procedura SPE con la tradizionale estrazione liquido-liquido dopo la reazione di transesterificazione con $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$. Essendosi rivelato il metodo di estrazione su fase solida ugualmente, se non più efficace e riproducibile rispetto al metodo tradizionale, per tutte le classi di composti identificati, dal punto di vista sia qualitativo che quantitativo, l'impiego dell'estrazione su fase solida è altamente consigliabile non solo per la maggiore praticità, ma soprattutto per il minor consumo di campione e di solventi utilizzati per l'estrazione. Per tutti gli estratti organici della procedura di frazionamento, comunque, e da un lato l'analisi qualitativa non ha lasciato adito ad alcun dubbio, dall'altro la riproducibilità dei dati quantitativi si è dimostrata alquanto variabile. Tuttavia, le informazioni ricavate anche a livello quantitativo sono state sufficienti a confermare la netta prevalenza del contributo alla materia organica del suolo da parte

delle piante superiori, essendo la distribuzione dei composti identificati attribuibile per lo più ai blocchi costitutivi della cutina e, in misura ancora superiore, della suberina. Sebbene questi polimeri vegetali siano solo costituenti minori della biomassa originale, il loro contributo è così alto poiché sono più refrattari alla biodegradazione rispetto ad altri componenti vegetali. Inoltre, sono stati individuati anche molti indizi a testimonianza dell'attività batterica e quindi della rilevanza dei processi degradativi di origine biotica, specialmente in condizioni ossidative. Essi sono rappresentati dal riconoscimento di indicatori diretti del metabolismo batterico e dalla presenza di prodotti derivanti dalla degradazione ossidativa dei composti insaturi, per lo più attraverso processi di β -ossidazione microbica. Tali processi biodegradativi sono sembrati essere più intensi nelle frazioni più giovani e, di conseguenza, meno stabili del materiale umico, come le frazioni dei lipidi liberi, in cui si è riscontrata la presenza di materiale fresco non ancora degradato, al contrario che nella frazione più stabile della matrice umica, legata per mezzo di legami chimici covalenti, dove si è evidenziato un calo dell'attività batterica.

I composti alifatici, riconducibili sia ai domini dei polimeri vegetali sia all'attività batterica, sebbene in misura minore, sono presenti in primo luogo come molecole intrappolate nella rete supramolecolare insolubile, e, poiché non legate ad essa in maniera covalente, facilmente estraibili sotto forma di lipidi liberi, ed in secondo luogo come molecole esterificate alla matrice organica, che necessitano dunque di reazioni incisive di idrolisi per esserne estratte. L'esterificazione, comunque, non è l'unico tipo di legame presente nelle matrici umiche. Anche i legami eteri contribuiscono in misura rilevante all'inserimento di tali composti nella struttura delle sostanze umiche, come confermato dagli spettri CPMAS- ^{13}C -NMR.

Al contrario, solo una porzione limitata delle unità aromatiche, derivanti probabilmente dalla lignina e da altri costituenti vegetali aromatici, quali i tannini, sembra essere legata alla matrice umica mediante legami esterei oppure eterei, dal momento che tali composti non sono stati solubilizzati in misura significativa dai blandi trattamenti idrolitici applicati mentre la loro predominanza nei residui finali è risultata netta.

Inoltre, nell'organizzazione della complessa rete di composti ciclici e ramificati, con una significativa quantità di catene legate mediante legami ossigenati, esterei ed eterei principalmente, ma anche ammidici, si deve considerare anche il ruolo svolto dalla frazione minerale che può avere interagito con la frazione organica, offrendole una vera e propria protezione sterica e limitandone l'estraibilità. Anche la formazione di complessi metallo-organici, soprattutto con Fe e Al, può essere stata causa di un'ulteriore riduzione della possibilità di solubilizzare i composti considerati nella procedura di frazionamento sviluppata. Il risultato complessivo sembra dunque essere un'organizzazione gerarchica molto complessa dei gruppi funzionali contenenti ossigeno, sia sulle superfici che nelle regioni interne delle associazioni umiche, che reagiscono e si condensano in maniera diversificata a formare la struttura della sostanza organica del suolo.

Questi risultati, insieme alle distribuzioni dei pesi molecolari medi determinate con la spettrometria di massa in fase liquida con interfaccia ad elettrospray, hanno dunque confermato uno degli aspetti della teoria supramolecolare della sostanza organica naturale, mostrando che il materiale umico estraibile dai suoli è composto da un gran numero di molecole eterogenee, di varia natura, a massa molecolare relativamente bassa. Si è inoltre messo in evidenza che opportuni trattamenti del

materiale umico, come ad esempio la manipolazione del contenuto di cationi polivalenti, possono portare ad una possibile completa mappatura delle diverse molecole eterogenee che ne compongono la struttura supramolecolare.

In conclusione, le evidenze sperimentali ottenute con questo lavoro di tesi sono di grande importanza per continuare il lavoro di messa a punto di una tecnologia analitica seriale che permetta l'identificazione strutturale di tutto il materiale molecolare presente in qualsivoglia substrato di sostanza organica naturale dell'ambiente. Una tale tecnologia di identificazione analitica può diventare la base di una nuova metodologia che, emulando trattazioni esistenti come la genomica, la proteomica, la metabonomica, può chiamarsi umeomica. In altre parole, la mappatura umeomica della sostanza organica naturale dell'ambiente può rappresentare uno strumento essenziale per le correlazioni struttura-attività del materiale umico in campi come la nutrizione organico-biologica delle piante e la previsione del destino dei contaminanti dei suoli e dei sedimenti.

BIBLIOGRAFIA

- Almendros G., Sanz J., 1989. Compounds released from humic acids upon BF₃-MeOH transesterification. *Sci. Total Environ.* 81/82, 51-60.
- Almendros G., Sanz J., 1991. Structural study on the soil humin fraction–boron trifluoride-methanol transesterification of soil humin preparations. *Soil Biol. Biochem.* 23, 1147-1154.
- Almendros G., Guadalix M. E., González-Vila F. J., and Martín F., 1996. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *Org. Geochem.* 24, 651-659.
- Almendros G., Guadalix M. E., González-Vila F. J., and Martín F., 1998. Distribution of structural units in humic substances as revealed by multi-step selective degradations and ¹³C-NMR of successive residues. *Soil Biol. Biochem.* 30, 755-765.
- Alvarez-Puebla R. A., Garrido J. J., Valenzuela -Calahorro C., Goulet P. J. G., 2005. Retention and induced aggregation of Co (II) on a humic substance: sorption isotherms, infrared absorption, and molecular modeling. *Surface Sci.* 575, 136-146.
- Amalfitano C., Quezada R. A., Wilson M. A., Hanna J. V., 1995. Chemical composition of humic acids: a comparison with precursor 'light fraction' litter from different vegetations using spectroscopic techniques. *Soil Sci.* 159, 391-401.
- Ambès A., Jacquesy J. C., Jambu P., Joffre J., Maggi-Churin R., 1991. Polar lipid fraction in soil: a kerogen-like matter. *Org. Geochem.* 17, 341-349.

- Ambless A., Jambu P., Jacquesy J. C., Parlanti E., Secouet B., 1993. Changes in the ketone portion of lipidic components during the decomposition of plant debris in a hydromorphic forest-podzol. *Soil Sci.* 156, 49-56.
- Ambless A., Jambu P., Parlanti E., Joffre J., Riffe C., 1994. Incorporation of natural monoacids from plant residues into a hydromorphic forest podzol. *European J. Soil Sci.* 45, 175-182.
- Ambless A., Grasset L., Dupas G., Jacquesy J. C., 1996. Ester- and ether bond cleavage in immature kerogens. *Org. Geochem.* 24, 681-690.
- Andersen H. C., 1980. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.* 72, 2384.
- Andreux F., 1996. "Humus in world soils" in: *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Piccolo A. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 45-100.
- Aran D., Gury M., Jeanroy E., 2001. Organo-metallic complexes in an Andosol: a comparative study with a Cambisol and Podzol. *Geoderma* 99, 65-79.
- Ashby E. C., Welder C. O., Doctorovich F., 1993. Single electron transfer in the reaction of an alkyl iodide with LiAlH_4 and LiAlD_4 in the absence of a halogen atom radical chain process. *Tetrahedron Letters* 34, 7235-7238.
- Beckett R., 1990. *Surface and colloid chemistry in natural water and water treatment*. Beckett R. ed., Plenum Press, New York, pp. 3-20.
- Bellamy L. J., 1975. *The infra-red spectra of complex molecules*. Chapman & Hall, London.
- Bernards M. A., Lewis N. G., 1998. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue; a changing paradigm. *Phytochem.* 47, 915-933.
- Bernards M. A., 2002. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80, 227-240.

- Boom A., Sinnige Damsté J. S., de Leeuw J. W., 2005. Cutan, a common aliphatic biopolymer in cuticles of drought-adapted plants. *Org. Geochem.* 36, 595-601.
- Brown T. L., Rice J. A., 2000. Effect of experimental parameters on the ESI FT-ICR mass spectrum of fulvic acid. *Anal. Chem.* 72, 384-390.
- Bull I. D., van Bergen P. F., Poulton P. R., and Evershed R. P., 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – II. Soils from the Hoosfield Spring Barley experiment treated with different quantities of manure. *Org. Geochem.* 28, 11-26.
- Bull I. D., Nott C. J., van Bergen P. F., Poulton P. R., Evershed R. P., 2000. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – IV. The occurrence and source of organic acids in an experimental grassland soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1367-1376.
- Cambardella C. A., Elliot E. T., 1992. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 777-783.
- Cantor C. R., Schimmel P. R., 1980. *Biophysical chemistry. Part II: techniques for the study of biological structure and function.* Freeman, New York, pp. 399-404.
- Capriel P., 1997. Hydrophobicity of the organic matter in arable soils: influence of management. *European J. Soil Sci.* 48, 457-462.
- Challinor J. M., 1989. A pyrolysis – derivatization - gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 16, 323-333.
- Chefetz B., Tarchitzky J., Deshmukh A. P., Hatcher P. G., Chen Y., 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 129-141.

- Cheshire M. V., Hayes M. H. B., 1990. "Compositions, origins, structures and reactivities of soil polysaccharides" in: Soil colloids and their association in aggregates. De Boodt M. F. ed., Plenum Press, New York, pp. 307-336.
- Clifford D. J., Carson D. M., Mc Kinney D. E., Bortiatynski J. M., Hatcher P. G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23, 169-175.
- Conte P., Piccolo A., 1999. Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1682-1690.
- Conte P., Spaccini R., Chiarella M., Piccolo A., 2003. Chemical properties of humic substances in soils of an Italian volcanic system. *Geoderma* 117, 243-250.
- Conte P., Spaccini R., Piccolo A., 2004. State of the art of CPMAS ^{13}C -NMR spectroscopy applied to natural organic matter. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 44, 215-223.
- Cozzolino A., Conte P., Piccolo A., 2001. Conformational changes of soil humic substances induced by some hydroxy-, cheto-, and sulphonic acids. *Soil Biol. Biochem.* 33, 563-571.
- Davis W. M., Erickson C. L., Johnston C. T., Delfino J. J., Porter J. E., 1999. Quantitative Fourier transform infrared spectroscopic investigation of humic substance functional group composition. *Chemosphere* 38, 2913-2928.
- De Hoffmann E., Stroobant V., 2001. Mass spectrometry. Principles and Applications. 2nd ed. Wiley, Chichester.

- de Leeuw J. W., Baas M., 1993. The behaviour of esters in the presence of tetramethylammonium salts at elevated temperatures; flash pyrolysis or flash chemolysis? *J. Anal. Appl. Pyrol.* 26, 175-184.
- del Rio J. C., and Hatcher P. G., 1998. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography - mass spectrometry. *Org. Geochem.* 29, 1441-1451.
- Derenne S., Largeau C., 2001. A review of some important families of refractory macromolecules: composition, origin and fate in soils and sediments. *Soil Sci.* 166, 833-847.
- Ding D. Q., Karasawa N., Goddard W. A., 1992. Atomic level simulations on a million particles: the cell multipole method for Coulomb and London nonbond interactions. *J. Chem. Phys.* 97, 4309.
- Engelbrecht R. R., von Wandruszka R., 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1934-1941.
- Fiorentino G., Spaccini R., Piccolo A., 2005. Separation of molecular constituents from a humic acid by solid-phase extraction following a transesterification reaction. *Talanta*, in stampa.
- Flaig W., 1966. "The chemistry of humic substances" in: *The use of isotopes in soil organic matter studies. Report of FAO/IAEA Technical Meeting*, Pergamon Press, New York, pp. 103-127.
- Flaig W., 1988. "Generation of model chemical precursor" in: *Humic substances and their role in the environment*. Frimmel F. H., Christman F. ed., Wiley, New York, pp. 75-92.
- Freifelder D., 1982. "Physical biochemistry". 2nd ed. Freeman, New York, pp. 500-503.

- Gobé V., Lemée L., Amblès A., 2000. Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Org. Geochem.* 31, 409-419.
- Gosh K., Schnitzer M., 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.* 129, 266-276.
- Grasset L., Amblès A., 1998. Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47, 1-12.
- Guignard C., Lemée L., Amblès A., 2000. Structural characterization of humic substances from an acidic peat using thermochemolysis techniques. *Agronomie* 20, 465-475.
- Gunstone F. D., Harwood J. L., Padley F. B., 1986. *The Lipid Handbook*. Chapman & Hall, London.
- Gutiérrez A., del Río J. C., González-Vila F. J., Martín F., 1998. Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr.* 823, 449-455.
- Haider K., Martin J. P., Filip Z., 1975. "Humus biochemistry" in: *Soil biochemistry*. Paul E. A., Mc Larens ed., Marcel Dekker, New York, vol. 4, pp. 195-244.
- Harborne J. B., 1997. "Role of phenolic secondary metabolites in plants and their degradation in nature" in: *Driven by Nature; Plant litter quality and decomposition*. Cadish G. & Giller K. E. ed., CAB International, Wallingford, pp. 67-74.
- Haumaier L., Zech W., 1995. Black carbon-possible source of highly aromatic components of soil humic acids. *Org. Geochem.* 23, 191-196.

- Hayes M. H. B., Swift R. S., 1978. "The chemistry of soil organic colloids" in: The chemistry of soil constituents. Greenland & Hayes ed., pp. 179-320.
- Hayes M. H. B., Mac Carthy P., Malcolm R. L., Swift R. S., 1989. "The search for structure: setting the scene" in: Humic substances II: in search of structure. Hayes M. H. B., Mac Carthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 3-31.
- Hayes M. H. B., Swift R. S., 1990. "Genesis, isolation, composition and structures of soil humic substances" in: Soil colloids and their association in aggregates. NATO ASI Series. Series B: Physics, vol. 215. de Boodt M. I., Hayes M. H. B., Herbillon A. ed. , Plenum Press, New York, pp. 245-305.
- Holloway P. J., Deas A. H. B., 1971. Occurrence of positional isomers of dihydroxyhexadecanoic acid in plant cutins and suberins. *Phytochem.* 10, 2781-2785.
- Holloway P. J., Deas A. H. B., 1973. Epoxyoctadecanoic acids in plant cutins and suberins. *Phytochem.* 12, 1721-1735.
- Holloway P. J., 1982. "The chemical constitution of plant cutins" in: The plant cuticle. Cutler D. F., Alvin K. L., Price C. E. ed., Linnean Society Symposium Series No. 10. Academic Press, London.
- Holloway P. J., 1983. Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochem.* 22, 495-502.
- ICOMAND (International Committee for Andosols), 1986. Circular letter n° 8. New Zealand Soil Bureau, Lower Hutt.

- Ikeda T., Holtman K., Kadla J. F., Chang H., Jameel H., 2002. Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* 50, 129-135.
- Insam H., 1996. "Microorganisms and humus in soils" in: *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Piccolo A. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 265-296.
- Jambu P., Amblès A., Jacquesy J. C., Secouet B., and Parlanti E., 1993. Incorporation of natural alcohols from plant residues into a hydromorphic forest-podzol. *J. Soil Sci.* 44, 135-146.
- Jansen S. A., Malaty M., Nwabara S., Johnson E., Ghabbour E., Davies G., Varnum J. M., 1996. Structural modeling in humic acids. *Mat. Sci. Engin. C* 4, 175-179.
- Kaiser K., Guggenberger G., 2000. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils. *Org. Geochem.* 31, 711-725.
- Kawamura K., Ishiwatari R., 1982. Tightly bound β -hydroxy acids in a recent sediment. *Nature* 297, 144-145.
- Klaus U., Pfeifer T., Spiteller M., 2000. APCI-MS/MS: a powerful tool for the analysis of bound residues resulting from the interaction of pesticides with DOM and humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3514-3520.
- Klok J., Baas M., Cox H. C., de Leeuw J. W., Rijpstra W. I. C., Schenck P. A., 1988. The mode of occurrence of lipids in a Namibian shelf diatomaceous ooze with emphasis on the β -hydroxy fatty acids. *Org. Geochem.* 12, 75-80.
- Kögel-Knabner I., 1993. "Biodegradation and humification processes in forest soils" in: *Soil biochemistry*. Bollag J.-M., Stotzky G. ed., Marcel Dekker, New York, pp. 101-137.

- Kolattukudy P. E., Kronman K., Poulouse A. J., 1975. Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiol.* 55, 567-573.
- Kolattukudy P. E., 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990-1000.
- Kolattukudy P. E., 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany* 62, 2918-2933.
- Kuroda K., 2002. Electron-impact (EI) mass spectra of 1,2-dimethoxybenzenes related to the pyrolysis products of guaiacyl lignin in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *J. Anal. Appl. Pyrol.* 64, 433-451.
- Leenheer J. A., Rostad C. E., Gates P. M., Furlong E. T., Ferrer I., 2001. Molecular Resolution and Fragmentation of Fulvic Acid by Electrospray Ionization/Multistage Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 1461-1471.
- Leenheer J. A., Croue J. P., 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, 18A-26A.
- Lichtfouse É., Dou S., Girardin C., Grably M., Balesdent J., Behar F., Vandembroucke M., 1995. Unexpected ^{13}C -enrichment of organic components from wheat crop soils: evidence for the in situ origin of soil organic matter. *Org. Geochem.* 23, 865-868.
- Lichtfouse É., Chenu C., Baudin F., Leblond C., Da Silva M., Behar F., Derenne S., Largeau C., Wehrung P., Albrecht P., 1998. A novel pathway of soil organic matter formation by selective preservation of resistant straight-chain biopolymers: chemical and isotope evidence. *Org. Geochem.* 28, 411-415.

- Liotta R., 1979. Selective alkylation of acidic hydroxyl groups in coal. *Fuel* 58, 724-728.
- Liotta R., Rose K., Hippo E., 1981. O-Alkylation chemistry of coal and its implications for the chemical and physical structure of coal. *J. Org. Chem.* 46, 277-283.
- Lu F., Ralph J., 1997. DFRC method for lignin analysis. 1. New method for β -aryl ether cleavage: lignin model studies. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4655-4660.
- Lulli L., Bidini D., Quantin P., 1988. A climo and litho soil-sequence on the Vico volcano (Italy). *Cah. ORSTOM, Sér. Pédol.* XXIV, 49-60.
- Martin J. P., Haider K., Saiz-Jimenez C., 1974. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 38, 760.
- Martín F., González-Vila F. J., del Rio J. C., Verdejo T., 1994. Pyrolysis derivatization of humic substances. I: Pyrolysis of fulvic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 28, 71-80.
- Martín F., del Rio J. C., González-Vila F. J., Verdejo T., 1995. Pyrolysis derivatization of humic substances. II: Pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 31, 75-83.
- Matzke K., Riederer M., 1991. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta* 185, 233-245.
- McKinney D. E., Bortiatynski J. M., Carson D. M., Clifford D. J., de Leeuw J. W., Hatcher P. G., 1996. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of the aliphatic biopolymer cutan: insights into the chemical structure. *Org. Geochem.* 24, 641-650.

- Mlaker A., Spiteller G., 1996. Distinction between enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation. *J. Chromatogr.* 743, 293-300.
- Naafs D. F. W., van Bergen P. F., 2002. A qualitative study on the chemical composition of ester-bound moieties in an acidic andosolic forest soil. *Org. Geochem.* 33, 189-199.
- Naafs D. F. W., van Bergen P. F., Boogert S. J., de Leeuw J. W., 2004. Solvent extractable lipids in an acid andic forest soil - variations with depth and season. *Soil Biol. Biochem.* 36, 297-308.
- Naafs, D. F. W., Nierop, K. G. J., van Bergen, P. F. & de Leeuw, J. W. 2005. Changes in the molecular composition of ester-bound aliphatics with depth in an acid andic forest soil. *Geoderma*, 127, 130-136.
- Nierop K. G. J., 1998. Origin of aliphatic compounds in a forest soil. *Org. Geochem.* 29, 1009-1016.
- Nierop K. G. J., 2001. Temporal and vertical organic matter differentiation along a vegetation succession as revealed by pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 61, 111-132.
- Nierop K. G. J., Pulleman M. M., Marinissen J. C. Y., 2001. Management induced organic matter differentiation in grassland and arable soil: a study using pyrolysis techniques. *Soil Biol. Biochem.* 33, 755-764.
- Nierop K. G. J., van Bergen P. F., 2002. Clay and ammonium catalyzed reactions of alkanols, alkanolic acids and esters under flash pyrolytic conditions. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 63, 197-208.

- Nierop K. G. J., Naafs D. F. W., Verstraten J. M., 2003. Occurrence and distribution of ester-bound lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Org. Geochem.* 34, 719-729.
- Nip M., Tegelaar E. W., Brinkhuis H., de Leeuw J. W., Schenck P. A., Holloway P. J., 1986. Analysis of modern and fossil plant cuticles by Curie point Py-GC and Curie point Py-GC-MS: Recognition of a new, highly aliphatic and resistant biopolymer. *Org. Geochem.* 10, 769-778.
- Novotny F. J., Rice J. A., 1995. Characterization of fulvic acid by laser-desorption mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2464-2466.
- Pastorova I., Botto R. E., Arisz P. W., Boon J. J., 1994. Cellulose char structure: a combined analytical Py-GC-MS, FTIR and NMR study. *Carbohydrate Research* 262, 27-47.
- Pfeifer T., Klaus U., Hoffmann R., Spiteller M., 2001. Characterisation of humic substances using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation mass spectrometry combined with size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.* 926, 151-159.
- Piccolo A., 1996. "Humus and soil conservation" in: *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Piccolo A. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 225-264.
- Piccolo A., Conte P., 1998. "Advances in nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopies of soil organic particles" in: *Structure and surface reactions of soil particles*. Huang P. M., Senesi N., Bubble J. ed., pp. 183-250.
- Piccolo A., Conte P., Cozzolino A., 1999. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *European J. Soil Sci.* 50, 687-694.

- Piccolo A., Conte P., 2000. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. *Adv. Environm. Res.* 3, 508-521.
- Piccolo A., Conte P., Cozzolino A., 2000. "Differences in high performance size exclusion chromatography between humic substances and macromolecular polymers" in: *Humic substances: versatile components of plants, soil and water.* Ghabbour E. A., Davies G. ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 111-124.
- Piccolo A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 166, 810-832.
- Piccolo A., Cozzolino A., Conte P., 2001. Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances as compared to macromolecular polymers. *Soil Sci.* 166, 174-185.
- Piccolo A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75, 57-134.
- Piccolo A., Spiteller M., 2003. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal. and Bioanal. Chem.* 377, 1047-1059.
- Pouwels A. D., Eijkel G. B., Boon J. J., 1989. Curie point pyrolysis-capillary gas chromatography-high resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 14, 237-280.
- Preston C. M., 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science* 161, 144-166.

- Quantin P., Dabin P., Bouleau A., Lulli L., Bidini D., 1985. Characteristics and genesis of two andosols in central Italy, in volcanic soil. *Catena, Suppl. 7*, 107-117.
- Ray A. K., Lin Y. Y., Gérard H. C., Chen Z. J., Osman S. F., Fett W. F., Moreau R. A., and Stark R. E., 1995. Separation and identification of lime cutin monomers by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Phytochem.* 38, 1361-1369.
- Reemtsma T., These A., 2003. On-line coupling of size exclusion chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of aquatic fulvic and humic acids. *Anal. Chem.* 75, 1500-1507.
- Regert M., Bland H. A., Dudd S. N., van Bergen P. F., Evershed R. P., 1998. Free and bound fatty acid oxidation products in archaeological ceramic vessels. *Proceedings of the Royal Society of London, B.* 265, 2027-2032.
- Richardson S.D., 2004. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 76, 3337-3364.
- Riederer M., Matzke K., Ziegler F., Kögel-Knabner I., 1993. Occurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soils. *Org. Geochem.* 20, 1063-1076.
- Ruiz-Gutiérrez V., Pérez-Camino M. C., 2000. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr.* 885, 321-341.
- Ryser U., Holloway P. J., 1985. Ultrastructure and chemistry of soluble and polymeric lipids in cell walls from seed coats and fibres of *Gossypium* species. *Planta* 163, 151-163.
- Saiz-Jimenez C., de Leeuw, 1986. Lignin pyrolysis products: their structures and their significance as biomarkers. *Org. Geochem.* 10, 869-876.

- Saiz-Jimenez C., 1994. Pyrolysis/methylation of soil fulvic acids: benzenecarboxylic acids revisited. *Environ. Sci. Technol.* 28, 197-200.
- Saiz-Jimenez C., 1996. "The chemical structure of humic substances: recent advances" in: *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Piccolo A. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 1-44.
- Santos Bento M. F., Pereira H., Cunha M. Á., Moutinho A. M. C., van den Berg K. J., and Boon J. J., 2001. A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC – MS. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 57, 45-55.
- Schlesinger W. H., 1997. *Biogeochemistry: an analysis of global change*. 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- Schnitzer M., 1972. *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker, New York.
- Schnitzer M., Skinner S. I. M., 1974. *Soil Sci.* 118, 322.
- Schnitzer M., Schulten H.-R., 1998. "New ideas on the chemical make-up of soil humic and fulvic acids" in: *Future prospects for soil chemistry*. Huang P. M., Sparks D. L., Boyd S. A. ed., Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI. SSSA Spec. Publ. 55, pp. 153-177.
- Schulten H.-R., 1995. The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 351, 72-73.
- Schulten H.-R., Leinweber P., 1996. Characterization of humic and soil particles by analytical pyrolysis and computer modeling. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 38, 1-53.
- Schulten H.-R., Schnitzer M., 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils* 26, 1-15.

- Schulten H.-R., Thomsen M., Carlsen L., 2001. Humic complexes of diethyl phthalate: molecular modeling of the sorption process. *Chemosphere* 45, 357-369.
- Simpson A. J., 2002. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 40, S72-S82.
- Spaccini R., Piccolo A., Conte P., Haberhauer G., Gerzabek M. H., 2000. Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by ^{13}C distribution and CPMAS-NMR spectra. *European J. Soil Sci.* 51, 583-594.
- Spaccini R., Piccolo A., Conte P., Haberhauer G., Gerzabek M. H., 2002. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1839-1851.
- Stankiewicz B. A., van Bergen P. F., Duncan I. J., Carter J. F., Briggs D. E. G., Evershed R. P., 1996. Recognition of chitin and proteins in invertebrate cuticles using analytical pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10, 1747-1757.
- Steelink C., 1985. "Implications of elemental characteristics of humic substances" in: *Humic substances in soil, sediments and water*. Aiken G. R., Mc Knight D. M., Wershaw R. L., Mc Carthy P. ed., Wiley Interscience, New York, pp. 457-476.
- Stenson A. C., Landing W. M., Marshall A. G., Cooper W. T., 2002. Ionization and fragmentation of humic substances in electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 4397-4409.
- Stenson A. C., Marshall A. G., Cooper W. T., 2003. Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee river fulvic acids from ultrahigh resolution

- electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. *Anal. Chem.* 75, 1275-1284.
- Stevenson F. J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, and reactions*. 2nd ed. Wiley-Intersci., New York.
- Sun H., 1998. COMPASS: an *ab initio* forcefield optimized for condensed-phase applications – overview with details on alkane and benzene compounds. *J. Phys. Chem. B.* 102, 7338-7364.
- Sutton R., Sposito G., 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.*, in stampa.
- Tegelaar E. W., de Leeuw J. W., Holloway P. J., 1989. Some mechanisms of flash-pyrolysis of naturally occurring higher plant polyesters. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 15, 289-295.
- Tegelaar E. W., Hollman G., van der Vegt P., de Leeuw J. W., Holloway P. J., 1995. Chemical characterization of the periderm tissue of some angiosperm species: recognition of an insoluble, non-hydrolyzable, aliphatic biomacromolecule (suberan). *Org. Geochem.* 23, 239-250.
- These A., Reemtsma T., 2003. Limitations of electrospray ionization of fulvic and humic acids as visible from size exclusion chromatography with organic carbon and mass spectrometric detection. *Anal. Chem.* 75, 6275-6281.
- Tulloch A. P., 1976. "Chemistry of waxes of higher plants" in: *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Kolattukudy P. E. ed., Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp. 235-287.

- van Bergen P. F., Bull I. D., Poulton P. R., Evershed R. P., 1997. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments. I: Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Org. Geochem.* 26, 117-135.
- van Bergen P. F., Flannery M. B., Poulton P. R., Evershed R. P., 1998. "Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments. III: Nitrogen-containing macromolecular moieties in soil organic matter from Geescroft Wilderness" in: Nitrogen-containing macromolecules in the bio- and geosphere. Stankiewicz B. A., van Bergen P. F. ed. , ACS Symposium Series, 707, Oxford University Press, New York, pp. 321-338.
- Vella A. J., Holzer G., 1990. Ether-derived alkanes from sedimentary organic matter. *Org. Geochem.* 15, 209-214.
- Verlet L., 1967. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* 159, 98-103.
- von Wandruszka R., Engebretson R. R., Yates L. M., 1999. "Humic acid pseudomicelles in dilute aqueous solution: fluorescence and surface tension measurements" in: Understanding humic substances: advanced methods, properties and applications. Ghabbour E. A., Davies G. ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 79-85.
- Walton T. J., 1990. "Waxes, cutin and suberin" in: Methods in Plant Biochemistry. Harwood J. L., Bowyer J. R. ed., Academic Press, London.
- Wershaw R. L., 1986. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil water and sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.* 1, 29-45.

- Wershaw R. L., 2004. Evaluation of conceptual models of natural organic matter (humus) from a consideration of the chemical and biochemical processes of humification. U. S. Geological Survey, Reston, Virginia.
- Wilson M. A., 1987. NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry. Pergamon Press, Oxford.
- Windig W., de Hoog G.S., Haverkamp J., 1982. Chemical characterization of yeasts and yeast-like fungi by factor analysis of their pyrolysis-mass spectra. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 3, 213-220.
- Yonebayashi K., Hattori T., 1989. Chemical and biological studies on environmental humic acids: II. ^1H -NMR and IR spectra of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35, 383-392.
- Zech W., Guggenberger G., 1996. "Organic matter dynamics in forest soils of temperate and tropical ecosystems" in: *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Piccolo A. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 101-170.