

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Sviluppo di una tecnica analitica per la caratterizzazione di
tannini e dei loro complessi con cromo**

Relatore: Prof. Paolo Centomo

Correlatrice: Prof. ssa. Sara Bogialli

Controrelatrice: Prof. ssa. Giulia Licini

Laureando: Strada Tommaso

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	1
1.1 CONCIA DELLE PELLI.....	1
1.1.1 Stadi del processo di concia.....	1
1.1.2 Concia al cromo.....	3
1.1.3 Concia vegetale.....	3
1.1.4 Acque reflue conciare.....	3
1.2 TANNINI.....	4
1.2.1 Classificazione dei tannini.....	5
1.2.2 Interazione dei tannini con centri metallici.....	7
1.2.3 UHPLC-ESI-MS per la caratterizzazione dei tannini.....	8
1.3 CROMO.....	10
1.3.1 Cromo (III).....	11
1.4 RESINE PER IL TRATTAMENTO DELLE ACQUE REFLUE.....	11
1.4.1 Solid phase extraction.....	11
2. SCOPO DELLA TESI.....	15
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	17
3.1 ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA DI SOLUZIONI DI TANNINI.....	17
3.2 CARATTERIZZAZIONE DI TANNINI.....	21
3.2.1 Caratterizzazione HPLC-UV.....	22
3.2.2 Caratterizzazione UHPLC-ESI-MS.....	23
3.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COMPLESSI DI Cr(III) CON ACIDO GALLICO E TANNINI.....	34
3.3.1 complessi di Cr(III) con acido gallico.....	34
3.3.2 complessi di Cr(III) con tannini.....	37

3.4 CARATTERIZZAZIONE HPLC-UV-DAD E ICP-MS DI SOLUZIONI CONTENENTI Cr(III) E ACIDO TANNICO.....	40
4. CONCLUSIONI.....	47
5. PARTE SPERIMENTALE.....	49
5.1 REAGENTI.....	49
5.2 STRUMENTAZIONE.....	51
5.3 ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA DI SOLUZIONI DI TANNINI.....	51
5.3.1 Preparazione della resina XAD4 per l'estrazione in fase solida. .	51
5.3.2 Estrazione in fase solida di soluzioni di tannini.....	52
5.4 CARATTERIZZAZIONE DI TANNINI.....	52
5.4.1 Caratterizzazione HPLC-UV.....	52
5.4.2 Caratterizzazione UHPLC-ESI-MS.....	53
5.5 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COMPLESSI DI Cr(III) CON ACIDO GALLICO E TANNINI.....	54
5.5.1 complessi di Cr(III) con Acido gallico.....	54
5.5.2 complessi di Cr(III) con tannini.....	56
5.6 CARATTERIZZAZIONE HPLC-UV-DAD E ICP-MS DI SOLUZIONI CONTENENTI Cr(III) E ACIDO TANNICO.....	57
6. BIBLIOGRAFIA.....	59

1. INTRODUZIONE

1.1 CONCIA DELLE PELLI

La concia delle pelli è un processo largamente usato per trasformare la pelle in cuoio, materiale resistente, duraturo e termicamente isolante. Le ottime proprietà meccaniche del cuoio permettono il suo utilizzo in molti ambiti, come la produzione di indumenti protettivi, borse e rivestimenti¹.

1.1.1 Stadi del processo di concia

La pelle è un sistema complesso, costituito da molti elementi, tra cui epidermide, peli, collagene, grasso, sangue, elastina e tessuto sottocutaneo; conseguentemente, la sua lavorazione risulta lunga e richiede l'impiego di molte sostanze chimiche². Gli stadi principali del processo di ottenimento del cuoio, che saranno descritti brevemente di seguito, sono riviera, concia e wet end.

a) **Riviera** è il processo preliminare durante il quale vengono rimossi i componenti non strutturali dal materiale grezzo e vengono pretrattate le fibre di collagene, in previsione la fase di concia vera e propria. La riviera consiste in una sequenza di operazioni, quali conservazione, rinverdimento, calcinazione, macerazione e piclaggio.

La *conservazione* rappresenta la fase durante la quale si agisce sulla pelle per proteggerla dall'attacco di microrganismi, che ne causerebbero la decomposizione, in previsione della lavorazione vera e propria. La conservazione può essere realizzata mediante salatura, essiccazione della pelle a bassa temperatura (per evitare il danneggiamento delle fibre di collagene), oppure per semplice raffreddamento in bagni di ghiaccio (nel caso di periodi brevi di conservazione) con aggiunta di additivi battericidi.

Il *rinverdimento* consiste nella reidratazione della pelle e nella rimozione delle componenti non strutturali, quali proteine globulari, sangue e eccesso di sale derivante dalla conservazione e sporcizia.

La *calcinazione* che rappresenta il processo in cui la pelle viene rigonfiata, con conseguente separazione delle fibre di collagene, che permette la penetrazione degli agenti concianti nelle fasi successive. Durante la

calcinazione si utilizza calce idrata ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) per portare il pH del bagno a circa 12: in queste condizioni la superficie delle fibre di collagene si carica negativamente e diventa quindi più idrofila. Durante questa fase avviene anche l'eliminazione di pelo ed epidermide, attraverso l'uso di solfuro di sodio (Na_2S). La calcinazione è seguita dalla decalcinazione, processo durante il quale il bagno viene portato a $\text{pH} \sim 8$ attraverso l'uso di acidi deboli (acido lattico, acidi dicarbossilici) o CO_2 , con conseguente rimozione degli ioni Ca^{2+} . La *macerazione* permette di ammorbidire la pelle grazie alla parziale idrolisi delle fibre di collagene da parte di enzimi, la cui attività è favorita nelle condizioni del processo di decalcificazione.

Il *piclaggio* rappresenta l'ultimo stadio che precede la concia, durante il quale il pH viene abbassato a circa 2, al fine di protonare i gruppi carbossilici e limitarne le interazioni con il $\text{Cr}(\text{III})$, permettendo una penetrazione profonda e uniforme dell'agente conciante³.

b) La **Concia** è la fase chiave del processo, che prevede la penetrazione dell'agente conciante tra le fibre di collagene, modificandone le proprietà in modo da renderle meccanicamente più resistenti e più stabili all'ambiente e agli attacchi microbici. Inoltre la concia previene il collasso della struttura che consegue alla rimozione dell'acqua. I principali processi di concia sono la *wet blue*, nella quale il $\text{Cr}(\text{III})$ agisce da agente conciante, e la *wet white*, in cui vengono, invece, utilizzati i tannini.

c) **Wet end** è l'ultimo processo e prevede la lavorazione della pelle conciata per ottenere il prodotto finito. Il wet end si divide in: riconcia, tintura, ingrasso ed essiccamento.

La *riconcia* è stadio nel quale si riempiono i vuoti lasciati tra le fibre di collagene dilatate. Come agenti riconcianti possono essere usati i tannini sintetici oppure resine (in particolare le resine metacriliche sono molto promettenti)². I primi interagiscono direttamente con il collagene e non danno un riempimento selettivo, mentre le resine tendono a non interagire con le fibre di collagene, riempiendo selettivamente gli spazi più grandi¹. Alternativamente a tannini sintetici e resine, possono essere usati anche sali di cromo.

La *tintura* rappresenta fase in cui si impartisce alla pelle il colore desiderato, utilizzando tipicamente coloranti a base di anilina.

L'*ingrasso* permette di impartire al prodotto morbidezza, resistenza e idrofobicità utilizzando grassi, sottoforma di emulsioni con acqua.

L'*essiccamento*, Che può essere eseguito all'aperto o in appositi essicatori, rappresenta l'ultimo stadio prima di ottenere il prodotto finito¹.

1.1.2 Concia al cromo

Tra le tecniche di concia, quella basata sull'utilizzo di cromo porta al prodotto più stabile e garantisce un processo rapido, economico e versatile rispetto al tipo di prodotto ottenibile. Il potere conciante del cromo deriva dalla sua capacità di formare complessi con il collagene, a seguito dell'interazione tra il metallo e i gruppi carbossilici della proteina. L'agente conciante è il Cr(III), ottenibile partendo direttamente da sali di quest'ultimo oppure per riduzione di sali di Cr(VI)^{1,2}.

1.1.3 Concia vegetale

Il processo di concia può essere attuato anche usando i tannini come agenti concianti. In questo caso, il potere conciante deriva dalla formazione di legami a idrogeno tra i gruppi idrossilici dei polifenoli, costituenti dei tannini, e gli atomi di ossigeno e azoto del collagene^{1,2}. La concia vegetale avviene adoperando inizialmente tannini a basso peso molecolare, in modo da facilitare la diffusione tra le fibre di collagene e ottenere una maggiore omogeneità; successivamente, una volta stabilizzata la struttura, si utilizzano tannini a peso molecolare maggiore, che interagiscono con le fibre di collagene presenti sulla superficie. Inoltre, i tannini utilizzati nei processi di concia vengono spesso solfonati per aumentarne la solubilità. I tannini utilizzati principalmente nei processi di concia sono quelli di mimosa, quebracho, castagno e tara (spesso usati anche nel processo di riconcia).

1.1.4 Acque reflue conciarie

A valle del processo di concia, la grande quantità di acqua e di sottoprodotti derivanti dalle varie fasi della lavorazione vengono raccolti sotto forma di reflui⁴. Un problema fondamentale dell'industria conciaria consiste nello smaltimento delle acque reflue, in quanto contengono una grande quantità di specie potenzialmente dannose per l'ecosistema, se rilasciate tal quali⁵. Le

principali componenti dei reflui e relative concentrazioni sono riportate in *Tabella 1.1*.

Tabella 1.1: specie presenti nelle acque reflue conciarie e relative concentrazioni¹

Componente	Concentrazione (ppm)
<i>Solidi sospesi</i>	116
<i>Chemical Oxygen Demand (COD)</i>	188
<i>Biological Oxygen Demand (BOD)</i>	68
<i>Cr(III)</i>	5
<i>Solfuri</i>	7
<i>Azoto ammoniacale</i>	5
<i>Azoto totale</i>	15
<i>Solfati</i>	170
<i>Cloruri</i>	81

Un metodo molto utilizzato per il trattamento delle sostanze inquinanti consiste nella biodegradazione batterica. Tuttavia, questa tecnica risulta poco efficace nei confronti di sostanze difficilmente biodegradabili come tannini, cromo, solfuri e cloruri, che inibiscono l'attività batterica^{4,5}. Un altro fattore importante da considerare nella scelta del metodo di trattamento delle acque reflue è il pH, che normalmente risulta prossimo a 8, a causa delle specie utilizzate nel trattamento della pelle⁵. Alla luce dei limiti del trattamento biologico dei reflui, si è reso necessario lo studio di metodi alternativi, incentrati in particolar modo sulla rimozione del cromo, tra cui l'uso di filtri a membrana, l'adsorbimento su carbone attivo, la precipitazione alcalina e lo scambio ionico^{6,7}. Il problema della rimozione del cromo nasce dal fatto che circa il 60% si trova sotto forma di complessi di Cr(III)⁷, che risultano solubili e difficili da precipitare in quanto chimicamente stabili (Paragrafo 1.3.1).

1.2 TANNINI

I tannini sono una classe di composti polifenolici, tipicamente solubili in acqua e con peso molecolare compreso tra 500 e 30000 uma⁸. Questi composti sono largamente presenti in natura, in particolare nelle piante

appartenenti al clade delle embriofite, e possono trovarsi sostanzialmente in qualsiasi costituente della pianta, compreso il frutto⁹. I tannini sono noti in particolar modo per il loro potere conciante, tanto che il termine deriva dal francese "tanin", che significa sostanza conciante¹⁰. I tannini utilizzati nel processo di concia possono essere estratti attraverso l'uso di solventi polari o, nel caso in cui siano insolubili in questo tipo di solventi, con etere di petrolio o diclorometano⁸.

1.2.1 Classificazione dei tannini

I tannini comprendono un vasto gruppo di composti che differiscono tra loro nella struttura e nel comportamento¹⁰. A causa di queste differenze, i tannini vengono divisi in quattro gruppi principali: idrolizzabili, condensati, complessi e florotannini.

I tannini idrolizzabili assumono questa denominazione in quanto possono essere idrolizzati nei loro costituenti. I tannini idrolizzabili sono classificati ulteriormente in gallotannini, costituiti da un'unità centrale di zucchero esterificata con diverse molecole di acido gallico (un esempio è l'acido tannico), e ellagitannini, in cui l'unità centrale è circondata da molecole di acido esaidrossifenico (HHDP) o acido ellagico, derivante dalla condensazione del precedente.¹⁰⁻¹² Si riportano in *Figura 1.1* alcuni esempi di strutture fondamentali dei tannini idrolizzabili.

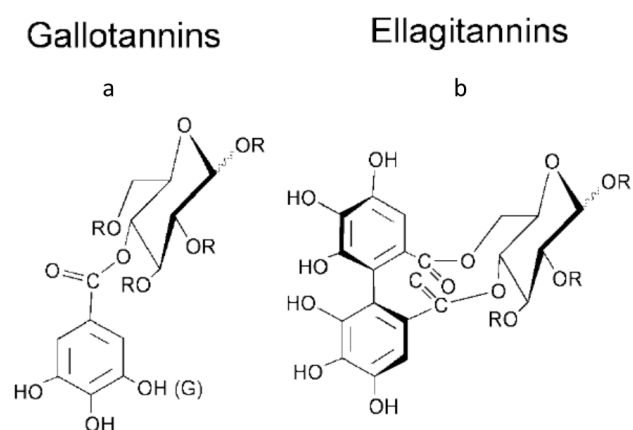
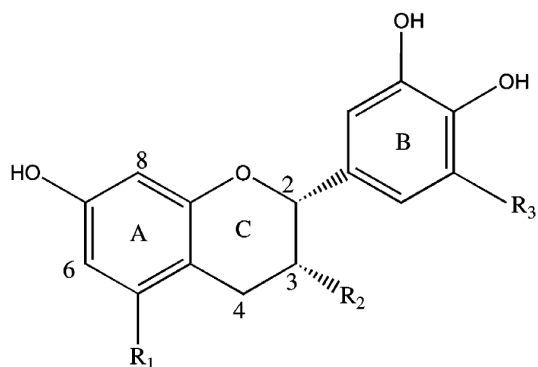


Figura 1.1: struttura della glucogallina (a) e dell'HHDP-glucopiranosio (b), strutture base di gallotannini ed ellagitannini

I tannini condensati, anche detti proantocianidine, comprendono un gruppo di oligomeri e polimeri, in cui le sub-unità di flavonoli sono connesse tra loro tramite legami C-C¹³. I vari flavonoli differiscono tra loro in base ai sostituenti R₁ e R₃, mentre R₂ è generalmente un gruppo OH, in alcuni casi esterificato con un'unità di acido gallico a dare i catechin-gallati. I principali monomeri costituenti dei tannini condensati sono riportati in *Figura 1.2*.



R ₁	R ₃	Class
OH	H	Proanthocyanidin
OH	OH	Prodelfinidin
H	H	Profisetinidin
H	OH	Prorobinetinidin

*Figura 1.2: unità costitutive dei tannini condensati in relazione ai sostituenti R₁ e R₃*¹³

Le reazioni di condensazione tra monomeri portano tipicamente alla formazione di un legame tra gli atomi di carbonio in posizione 4 e 8, anche se in alcuni casi si può formare tra quelli in posizione 4 e 6¹³.

I tannini complessi sono formati da un'unità di galletannino (o ellagitannino) e una di catechina. Un esempio di questi tannini è l'acutissimina A (*Figura 1.3*), la cui unità fondamentale è costituita da un flavogallolo, in cui il legame gallato-flavonolo è sul C1 del flavonolo, che si lega al poliolo (derivato dal D-glucosio) attraverso tre ponti esterei.

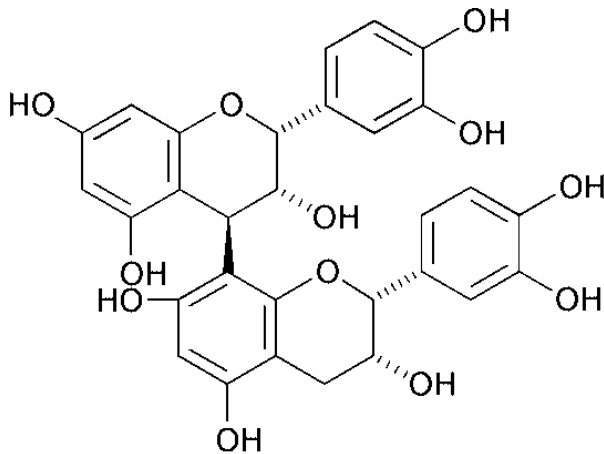


Figura 1.3: struttura dell'*acutissimina A*¹⁰

I *florotannini*, derivanti dalle alghe brune, si formano per polimerizzazione dell' 1,3,5-triidrossibenzene. Essendo stati classificati in tempi relativamente recenti, non si conoscono ancora molti dettagli di questa classe di tannini¹⁴.

Oltre a queste quattro categorie, presenti in natura, esiste una classe di *tannini sintetici*, ottenuti per condensazione di fenoli solfonati, in presenza di formaldeide¹⁵. Concepiuti inizialmente per sostituire i tannini naturali, questi tannini sono stati utilizzati insieme a quelli vegetali per accelerare il processo di concia.¹⁶ Tuttavia, in seguito alla diffusione del processo di concia al cromo, che risulta economico ed efficiente, l'impiego dei tannini sintetici è stato destinato al processo di riconcia¹⁷.

1.2.2 Interazione dei tannini con centri metallici

L'esistenza di complessi formati tra metalli e tannini è nota fin dall'antichità: un esempio è quello degli inchiostri ferro-gallici¹⁸, costituiti da un complesso di Fe(III) con acido gallico, che agisce da legante all'ossigeno¹⁹. I tannini condensati e i loro costituenti monomerici possono tuttavia formare complessi con molti centri metallici, tra cui Fe(III), Ge(IV), Al(III), Cu(II), Zn(II), Co(II), V(II), Mg(II), Ca(II)¹⁸. In alcuni casi, l'azione complessante dei tannini viene utilizzata per rimuovere metalli derivanti da processi industriali, come il germanio²⁰. In tempi recenti sono stati studiati dei sistemi di rimozione di ioni metallici, tra cui Cr(III) e Cr(VI) da soluzioni acquose attraverso l'utilizzo di tannini in forma di gel o supportati. Questi sistemi, basati sull'immobilizzazione di tannini su supporti, che possono essere a base di

collagene o sfere di silice, risultano particolarmente efficienti nella rimozione del cromo²¹.

1.2.3 UHPLC-ESI-MS per la caratterizzazione dei tannini

Un metodo molto utilizzato per analizzare i tannini è la spettrofotometria UV-Vis, in quanto i gruppi funzionali possono subire reazioni che producono specie colorate, facilmente individuabili con questa tecnica²². Il limite di questo tipo di analisi è legato alla presenza, nelle soluzioni di tannini, di una grande varietà di specie diverse, ma strutturalmente molto simili, che assorbono a lunghezze d'onda confrontabili. Il problema persiste utilizzando la tecnica HPLC-UV-DAD, con la quale si tende ad ottenere una bassa risoluzione cromatografica, in quanto un singolo segnale cromatografico può essere causato da specie diverse che assorbono alla medesima lunghezza d'onda e che presentano tempi di ritenzione molto simili. Queste circostanze rendono quindi difficile individuare tutte le specie presenti per via spettrofotometrica.

Per superare questo problema, si è diffuso negli anni l'uso della spettrometria di massa, spesso accoppiata alla cromatografia liquida ad ultra-alta prestazione (UHPLC-ESI-MS), una tecnica molto efficiente per analizzare matrici complesse (come ad esempio le soluzioni di tannini). L'UHPLC rappresenta l'evoluzione della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e permette di ottenere analisi altrettanto efficienti, in tempi minori (l'analisi può essere fino a nove volte più veloce) e con maggiore separazione dei picchi cromatografici, anche a causa delle ridotte dimensioni delle particelle della fase stazionaria rispetto a quelle utilizzate nell'HPLC. Infatti, il diametro medio delle particelle in una colonna per UHPLC può essere anche inferiore ai 2 μm , mentre nell'HPLC è generalmente di 5 μm . L'accoppiamento UHPLC-ESI-MS permette di ottenere ottimi risultati in termini di sensibilità, selettività e sicurezza sull'attribuzione dei picchi, in tempi brevi²³. Con questa tecnica, le diverse specie presenti in soluzione vengono separate nella colonna cromatografica in base al tipo di interazione che formano con la fase stazionaria e arrivano alla sorgente di ionizzazione, dove vengono ionizzate. Nel caso di sistemi formati da molecole organiche di grandi dimensioni, l'ESI (ElectroSpray Ionization) viene spesso utilizzata

come sorgente di ionizzazione, in quanto permette di ottenere una frammentazione moderata delle specie presenti in soluzione. Con la tecnica ESI, in condizioni di temperatura ambiente e pressione atmosferica, una goccia di campione viene iniettata in un capillare, soggetto ad un'alta differenza di potenziale rispetto ad un elettrodo cilindrico che lo circonda²⁴. A causa della differenza di potenziale elevata, la goccia si carica e viene dispersa in uno spray di particelle cariche, le quali passano attraverso un secondo capillare, dove subiscono desolvatazione ad opera di un flusso di gas ad alta temperatura (spesso azoto). A causa dell'evaporazione del solvente, la densità di carica aumenta fino a raggiungere il punto in cui la repulsione tra cariche supera la tensione superficiale della goccia, chiamato limite di Reyleigh, causandone l'esplosione in tante gocce più piccole. Il processo descritto si ripete fino a quando le gocce cariche raggiungono una dimensione prossima ai 10 nm, venendo poi indirizzate, attraverso una serie di lenti focalizzanti, verso lo spettrometro di massa, dove vengono separate in base al rapporto massa/carica (m/z)²². In questo progetto di Tesi l'FT-orbitrap è stato utilizzato come rivelatore. Questo dispositivo è una trappola elettrostatica all'interno della quale viene applicata una differenza di potenziale costante tra un elettrodo interno, con diametro maggiore al centro rispetto alle estremità, e uno esterno, coassiale al primo. Dato che le superfici dei due elettrodi non sono parallele, a causa della forma di quello interno, il campo elettrico presente all'interno dell'orbitrap non è uniforme, ma raggiunge un minimo al centro. Le particelle cariche, generate mediante ESI, vengono raccolte in una trappola ionica per essere focalizzate all'interno del rivelatore, dove percorrono un'orbita circolare intorno all'elettrodo centrale, con un'oscillazione assiale proporzionale al rapporto m/z . Alla fine viene generata una corrente immagine, successivamente registrata e decodificata tramite trasformata di Fourier. L'orbitrap è uno strumento molto accurato e che permette di lavorare ad alte risoluzioni²⁴, dimostrandosi quindi un ottimo rivelatore per la determinazione della massa delle singole specie presenti nelle soluzioni di tannini, che può essere accoppiato con uno spettrometro di massa tandem (MS^2) per ottenere informazioni anche sulla composizione delle singole specie²².

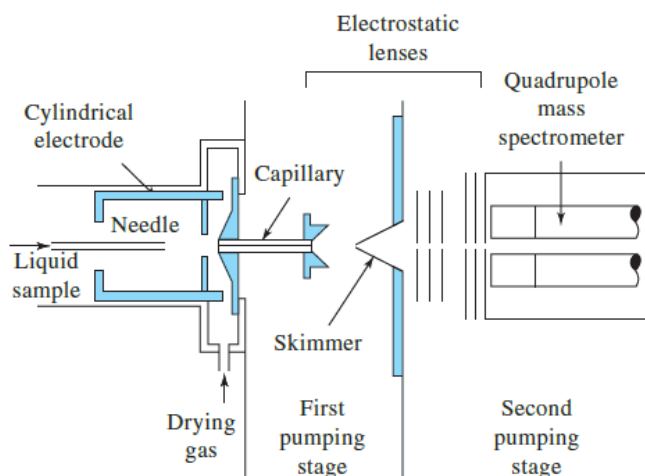


Figura 1.4: rappresentazione schematica di una sorgente ESI accoppiata a un rivelatore a quadrupolo²⁴

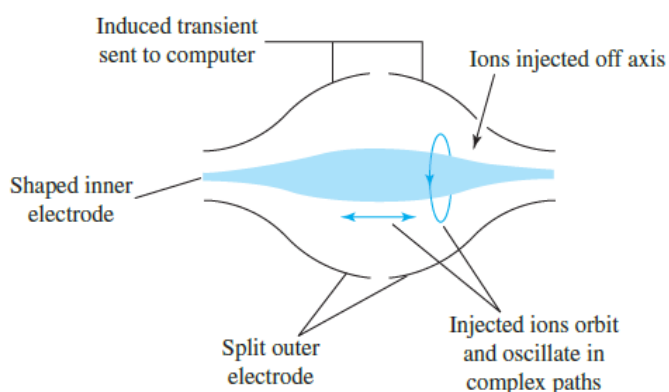


Figura 1.5: rappresentazione schematica della struttura e del funzionamento di un analizzatore FT-orbitrap²⁴

1.3 CROMO

Il cromo è un metallo della prima serie di transizione. In natura si trova sotto forma di cromite (FeCr_2O_4), uno spinello in cui il Cr(III) occupa i siti ottaedrici mentre il Fe(II) quelli tetraedrici, che può essere usato per produrre l'acciaio inossidabile tramite riduzione con carbone in una fornace²⁵. A temperatura ambiente, il cromo metallico tende ad essere chimicamente inerte, anche se può essere sciolto per attacco con acido cloridrico o acido solforico diluiti, mentre viene passivato dall'acido nitrico. Gli stati di ossidazione più comuni

per il cromo sono +2, +3 e +6, sebbene siano noti anche composti di Cr(IV) e Cr(V), tra CrO_2 ²⁶.

1.3.1 Cromo (III)

Lo stato di ossidazione +3 risulta essere quello più stabile nei composti del cromo e i suoi complessi tendono ad assumere una geometria di coordinazione ottaedrica, in cui la configurazione elettronica d^3 porta ad avere un'elevata energia di stabilizzazione del campo cristallino (CFSE). I complessi ottaedrici di Cr(III) risultano essere anche cineticamente inerti verso le reazioni di sostituzione²⁶, in quanto il passaggio dalla geometria ottaedrica a quella piramidale a base quadrata dell'intermedio causa una perdita elevata della CFSE e un conseguente aumento dell'energia di attivazione. Per questo motivo i complessi non vengono preparati a partire da sali di Cr(III) in soluzione acquosa, che richiederebbero la sostituzione delle molecole di acqua dell'acquione, quanto piuttosto per reazioni di ossidazione da sali di Cr(II) o riduzione da quelli di Cr(VI).

1.4 RESINE PER IL TRATTAMENTO DELLE ACQUE REFLUE

Un problema fondamentale nello studio della composizione delle acque reflue consiste nella grande quantità di sostanze che compongono la miscela, che rendono difficile l'identificazione di tutte le specie, soprattutto quelle presenti in concentrazione minore. Un metodo molto utilizzato è quello di pre-concentrare il campione di refluo utilizzando resine che interagiscono con la frazione organica, ritenendola²⁷.

1.4.1 Solid phase extraction

Una delle tecniche più comuni che sfrutta l'utilizzo di resine per pre-concentrare le soluzioni da analizzare è la Solid Phase Extraction (SPE). Questo metodo prevede l'impiego di una cartuccia, impaccata con una resina, attraverso cui viene eluito il campione. A seconda delle proprietà chimiche (gruppi funzionali) e morfologiche (porosità, grado di reticolazione ecc...) della resina, cambia il tipo di interazione e, di conseguenza, la frazione ritenuta²⁸.

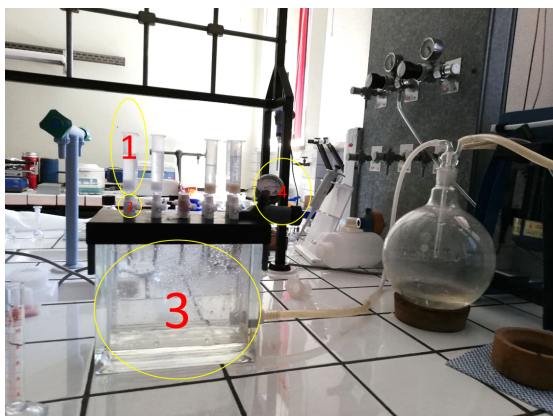


Figura 1.6: apparato per SPE. 1) cartuccia 2) rubinetto 3) camera 4) valvola per la regolazione del vuoto

1.4.2 Resine XAD

Le resine XAD, in particolare XAD-4 e XAD-8 sono largamente utilizzate per sequestrare la frazione organica da soluzioni acquose²⁹. XAD-4 è una resina apolare, macroporosa e non funzionalizzata, formata da un copolimero di stirene e divinilbenzene, mentre XAD-8 è un poliacrilato macroreticolare, che possiede un'elevata capacità di rigonfiamento. Le caratteristiche delle resine XAD-4 e XAD-8 sono riportate in *Tabella 1.2*.

Tabella 1.2: caratteristiche strutturali delle resine XAD-4 e XAD-8³⁰

	XAD-4	XAD-8
<i>Composizione</i>	polistirene/ divinilbenzene	polimetacrilati
<i>polarità</i>	non polare	mediamente polare
<i>area superficiale (m²/g)</i>	880	310
<i>diametro delle particelle (mm)</i>	0.25	0.25
<i>diametro medio dei pori (Å)</i>	50	250

La resina XAD-4, in particolare, viene considerata uno dei migliori agenti adsorbenti polimerici per rimuovere composti fenolici da soluzioni acquose^{30,31}. Molti studi riportano l'efficacia della rimozione di sostanze organiche da acque di diversa provenienza attraverso l'utilizzo in coppia di cartucce per SPE impaccate con XAD-4 e XAD-8^{29,30,32}. Il metodo sopra

descritto rappresenta una prospettiva interessante per caratterizzare le specie presenti nelle acque reflue conciarie tramite spettrometria di massa. L'uso di cartucce per SPE impaccate con resine XAD potrebbe, infatti, essere sfruttato per rimuovere la frazione organica presente nel campione, per ottenere uno spettro di massa più facilmente interpretabile, a causa della minor quantità di specie presenti.

2. SCOPO DELLA TESI

Il progetto di questo lavoro di Tesi nasce dal problema ambientale causato dall'impossibilità di recuperare completamente il cromo nel processo di trattamento delle acque reflue conciarie. Considerando le condizioni presenti all'interno delle vasche di raccolta dei reflui a valle delle concerie, dove vengono raccolte le acque reflue sia del processo di concia al cromo che di quello vegetale, e la grande quantità di specie presenti, è possibile che si formino dei complessi tra Cr(III) e tannini. Tale ipotesi potrebbe spiegare la difficoltà di recuperare completamente il cromo utilizzato nel processo di concia, in quanto l'elevata stabilità dei complessi di Cr(III) (Paragrafo 1.3.1) causerebbe la loro permanenza in soluzione e l'impossibilità di rimuoverli attraverso le tecniche normalmente utilizzate (Paragrafo 1.1.4).

Lo scopo del progetto è lo sviluppo di una tecnica analitica basata sulla cromatografia ad ultra-alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa, per separare e identificare le specie presenti all'interno delle acque reflue conciarie. Perciò sono state analizzate soluzioni di soli tannini, al fine di caratterizzare le specie presenti e che possono agire da leganti per il Cr(III), e sistemi contenenti sia tannini che sali di Cr(III), per verificare l'eventuale formazione di complessi.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA DI SOLUZIONI DI TANNINI

La resina XAD-4 è stata ampiamente studiata per isolare composti organici da soluzioni acquose^{31,33,34}. Sulla base di queste evidenze sono stati messi a punto alcuni esperimenti preliminari, allo scopo di valutare la capacità del materiale di separare le specie presenti in soluzioni acquose di tannini. Soluzioni di tre tannini diversi, quali acido tannico, mirabolano e quebracho, sono state, quindi, sottoposte ad SPE. Per ogni soluzione sono state raccolte tre frazioni: una dalla soluzione madre, una dalla soluzione eluita attraverso la cartuccia SPE e una dalla soluzione ottenuta per eluizione con NaOH 0.1 M, in controflusso, della frazione ritenuta dalla resina. Le frazioni così ottenute sono state sottoposte ad analisi ESI-MS, con iniezione diretta, in modalità negativa. Si riportano in *Figura 3.1* gli spettri di massa delle tre soluzioni madre di acido tannico, mirabolano e quebracho.

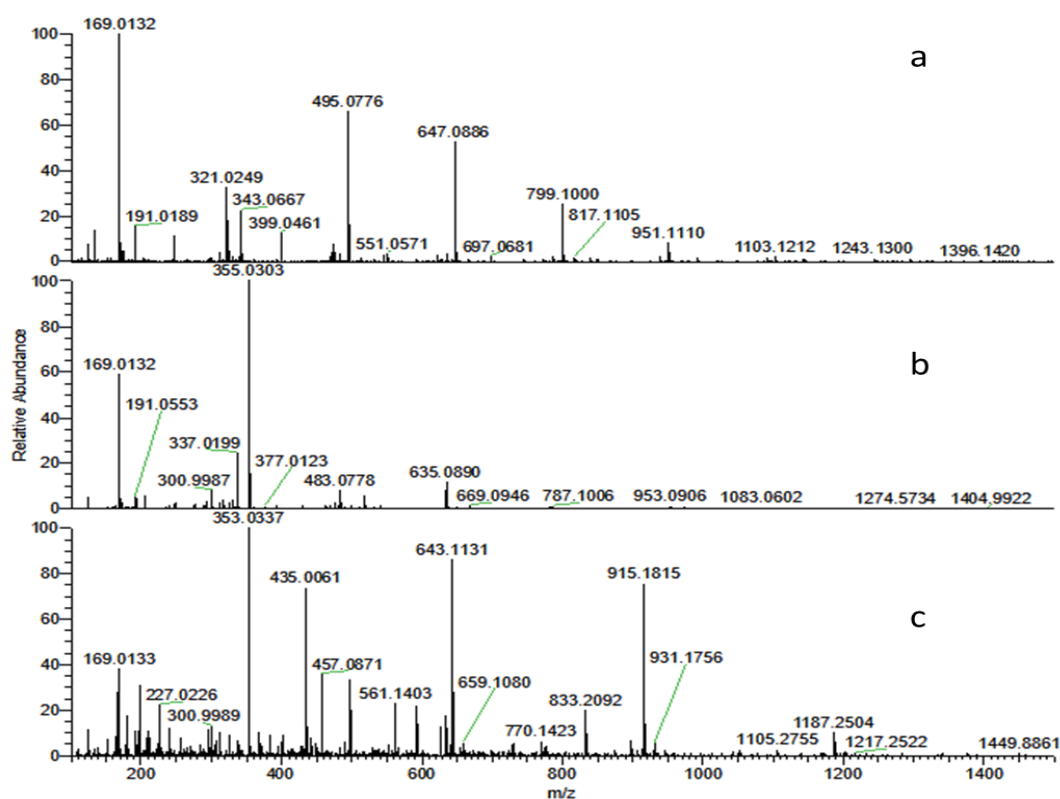


Figura 3.1: spettro MS(-) delle soluzioni madre di acido tannico (a), mirabolano (b) e quebracho (c) acquisiti in un intervallo compreso tra 100 e 1500 m/z

Dagli spettri acquisiti si può notare la grande varietà di segnali, dovuti, verosimilmente, alla copresenza in soluzione di molte specie. In particolare, per quanto riguarda il campione di acido tannico (Figura 3.1a), i picchi più intensi ($m/z=495.0776$; $m/z=647.0886$; $m/z=799.1000$) derivano dalla frammentazione di una specie formata da un'unità centrale di acido chinico ($m/z=191.0189$) esterificata con una o più unità di acido gallico ($m/z=169.0132$). Per quanto riguarda il mirabolano (Figura 3.1b) si può notare come siano presenti specie derivanti dalla frammentazione dell'acido tannico ($m/z=169.0132$; $m/z=483.0778$; $m/z=635.0890$), mentre il picco più intenso, a $m/z=355.0303$, può essere attribuito all'acido chebulico. Infine, nello spettro del quebracho (Figura 3.1c) si osservano i segnali del dimero della epicatechina, con rapporto $m/z=643.1131$, e quelli del trimero e del trimero solfonato (la solfonazione dell'epicatechina potrebbe derivare dal processo industriale di estrazione dei tannini)³⁵, rispettivamente a $m/z=833.2092$ e $m/z=915.1815$.

Successivamente sono state caratterizzate, tramite analisi ESI-MS in modalità negativa, le soluzioni ottenute per eluizione in controflusso con NaOH 0.1M. L'analisi degli spettri ha evidenziato come il trattamento con una base potrebbe aver promosso la transesterificazione delle specie presenti in soluzione, come suggerito dal picco a $m/z=183.0293$ (Figura 3.2), attribuito all'estere metilico dell'acido gallico³⁶.

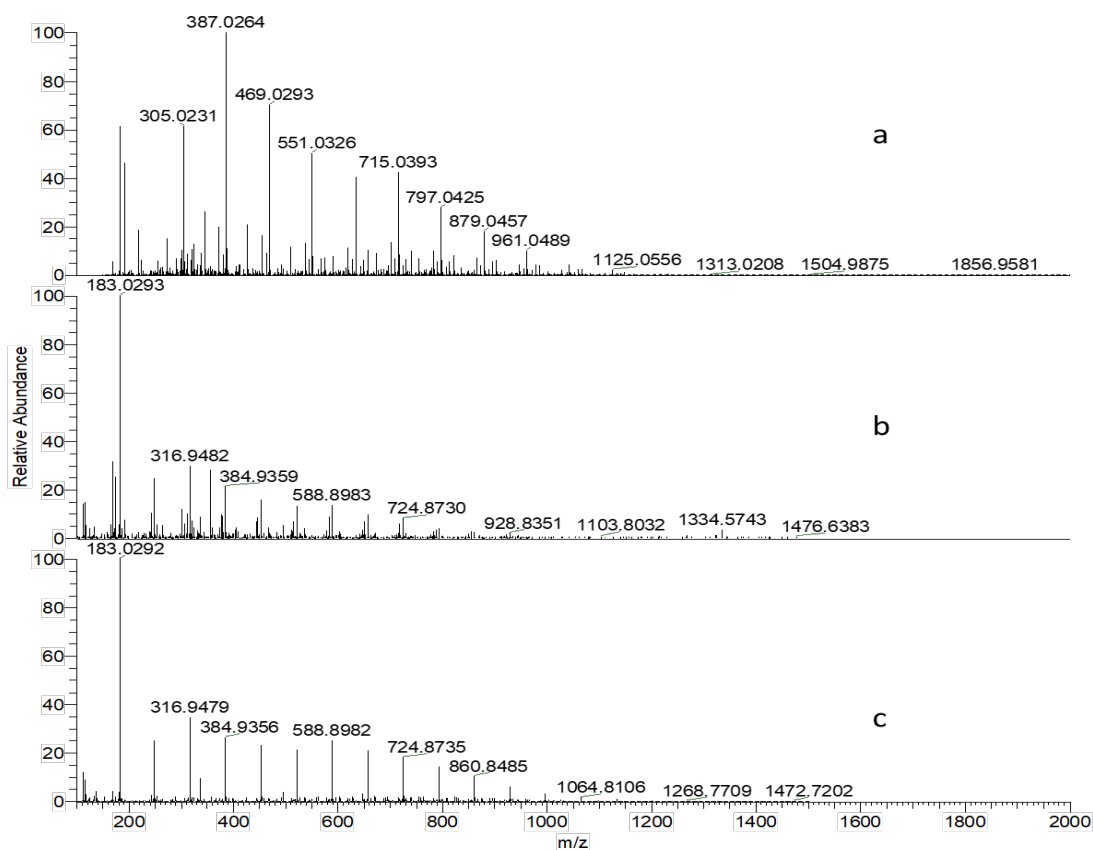


Figura 3.2: spettro MS(-) delle soluzioni eluite in controflusso con NaOH 0.1 M di acido tannico (a), mirabolano (b) e quebracho (c) acquisiti in un intervallo di m/z compreso tra 100 e 2000

Allo scopo di confermare l'ipotesi secondo cui l'ambiente basico promuove la reazione di esterificazione delle specie presenti, è stata analizzata una soluzione standard di acido tannico in H₂O milliQ, subito dopo l'aggiunta di un'aliquota di NH₃ 3% V/V. Lo studio è stato svolto osservando la variazione dell'intensità dei picchi attribuiti all'acido gallico e al metil gallato al passare del tempo (Figura 3.3) e ha evidenziato come, nel giro di pochi minuti, diminuisse l'intensità del segnale a m/z=169.0132, attribuito all'acido gallico, e aumentasse quella del picco a m/z=183.0293, attribuito al metil gallato, suggerendo come l'ambiente basico promuova effettivamente la reazione di transesterificazione delle specie presenti.

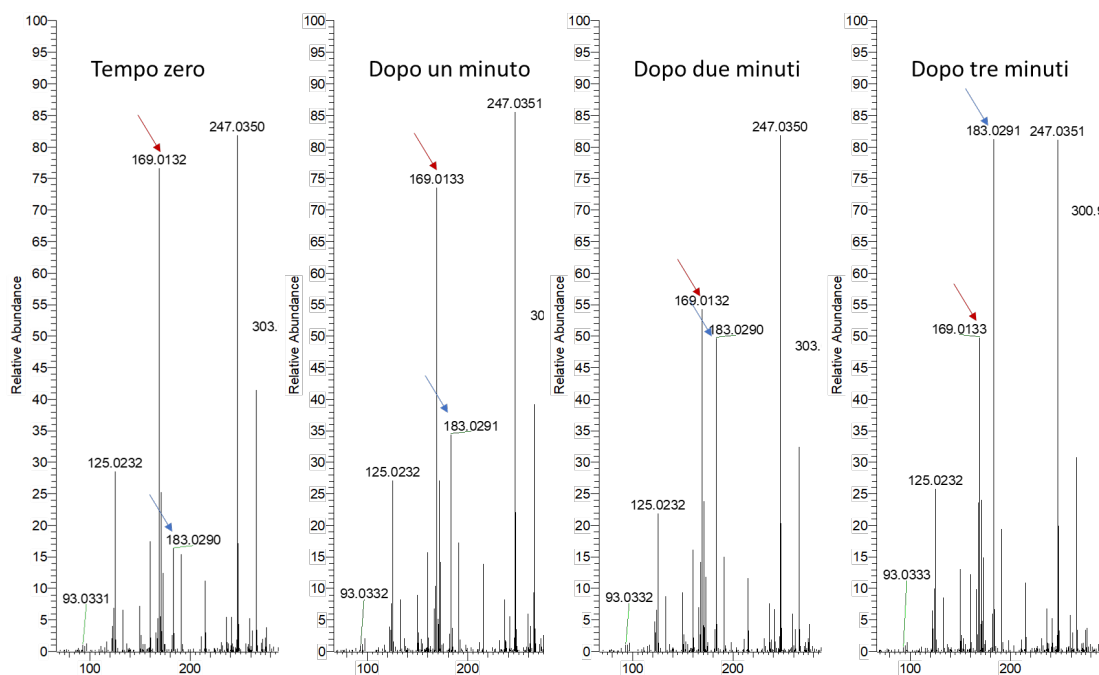


Figura 3.3: andamento nel tempo dell'intensità relativa dei segnali dell'acido gallico (freccia rossa) e del suo estere metilico (freccia blu) nel campione di acido tannico

Con lo scopo di caratterizzare la frazione ritenuta senza modificare le specie ritenute in colonna, le prove SPE sono state ripetute utilizzando acetonitrile per l'eluizione in controflusso. Le soluzioni così ottenute sono state sottoposte ad analisi ESI-MS, in modalità negativa, nelle stesse condizioni delle precedenti (Paragrafo 5.4.2). Dagli spettri di massa (*Figura 3.4*) si può notare come i segnali più intensi a $m/z=169.0134$, $m/z=321.0253$, $m/z=495.0783$, $m/z=647.0895$ e $m/z=799.1009$ (*Figura 3.4a*) coincidano con quelli della soluzione madre di acido tannico (*Figura 3.1a*). Inoltre, i picchi a $m/z=355.0335$, $m/z=483.0778$, $m/z=635.0887$ e $m/z=787.1003$ (*Figura 3.4b*) coincidono con quelli della soluzione madre di mirabolano (*Figura 3.1b*) e quelli a $m/z=353.0335$, $m/z=643.1125$ e $m/z=915.1811$ (*Figura 3.4c*) coincidono con quelli relativi alla soluzione madre di quebracho (*Figura 3.1c*). Queste circostanze indicano che l'acetonitrile permette di eluire la frazione di soluzione madre ritenuta dalla resina senza modificare le specie presenti al suo interno.

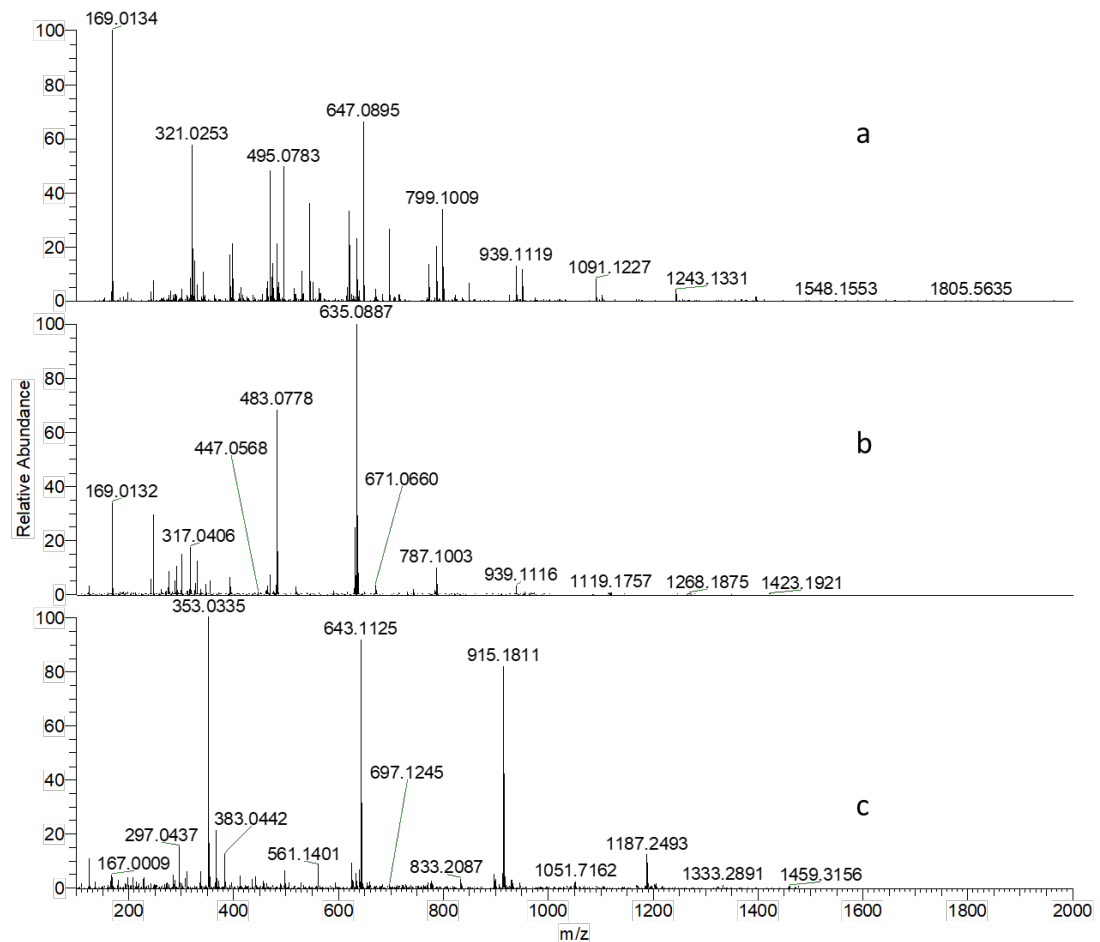


Figura 3.4: spettro MS(-) delle soluzioni eluite in controflusso con acetonitrile di acido tannico (a), mirabolano (b) e quebracho (c) acquisiti in un intervallo di m/z compreso tra 100 e 2000

3.2 CARATTERIZZAZIONE DI TANNINI

Nel tentativo di identificare le diverse specie presenti nelle soluzioni di tannini, in quanto possibili leganti per il cromo, è stata utilizzata una colonna per HPLC impaccata con la resina XAD-4. E' stato svolto, quindi, uno studio preliminare, basato sull'analisi HPLC-UV di quattro soluzioni (acido gallico, acido tannico, mirabolano e quebracho), per valutare le capacità di ritenzione della resina nei confronti dei diversi tannini e sviluppare un metodo cromatografico per la loro separazione. Successivamente, per identificare le singole specie presenti nelle diverse soluzioni e valutarne i tempi di ritenzione, è stata eseguita un'analisi HPLC-ESI-MS di undici soluzioni di tannini appartenenti alle seguenti categorie, differenti per le unità fondamentali costituenti (*Paragrafo 1.2*): tannini idrolizzabili (acido tannico,

mirabolano, tara, castagno), condensati (quebracho, mimosa, gambier) e sintetici. A quest'ultima categoria appartengono la lignina solfonata "bretax" e lignina solfonata "mix", che vengono ottenute tramite estrazione per solfonazione e sono costituite da polimeri fenolici³⁷, tannino di condensazione 1,4-diidrossi-difenilsulfone e tannino di condensazione naftalensolfonico, che si ottengono per condensazione di 1,4-diidrossi-difenilsulfone e acido naftalensolfonico.

3.2.1 Caratterizzazione HPLC-UV

Con lo scopo di verificare la capacità di ritenzione della resina XAD-4 nei confronti dei diversi tannini, è stato sviluppato un metodo cromatografico, basato sull'analisi HPLC-UV. Sono state analizzate quattro soluzioni acquose a 1000 ppm (utilizzando H₂O milliQ) contenenti acido gallico, acido tannico, mirabolano e quebracho (la procedura di preparazione dei campioni e i dettagli del metodo utilizzato sono riportati al *Paragrafo 5.4.1*). Dai cromatogrammi ottenuti (*Figura 3.5*), si può osservare come la separazione non sia netta e i tempi di ritenzione siano particolarmente dilatati.

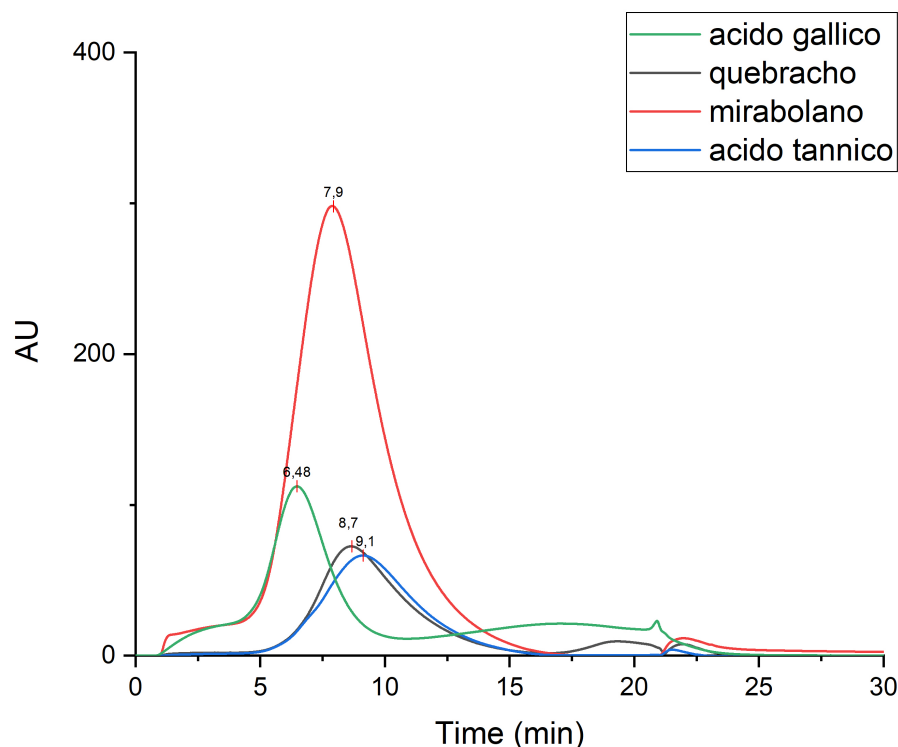


Figura 3.5: cromatogrammi delle soluzioni di acido gallico (profilo verde), acido tannico (profilo azzurro), mirabolano (profilo rosso) e quebracho (profilo nero) ottenuti per analisi HPLC-UV utilizzando resina XAD-4 come fase stazionaria

La sovrapposizione dei picchi potrebbe essere dovuta alla presenza di alcune specie in comune nelle soluzioni di diversi tannini, mentre la dilatazione dei segnali cromatografici potrebbe essere causata dalla presenza in soluzione di una grande varietà di specie che assorbono alle stesse lunghezze d'onda e sono caratterizzate da tempi di ritenzione simili.

3.2.2 Caratterizzazione UHPLC-ESI-MS

Per identificare le diverse specie presenti in soluzione e studiare il tipo di interazione tra gli analiti e la resina XAD-4, che determina i diversi tempi di ritenzione, sono state sottoposte ad analisi UHPLC-ESI-MS undici soluzioni contenenti rispettivamente: acido tannico, mirabolano, quebracho, mimosa, tara, gambier, castagno, lignina solfonata mix, lignina solfonata "bretax", tannino di condensazione 1,4-difenilsulfone e tannino di condensazione naftalensolfonico. La procedura di preparazione dei campioni ed i dettagli del

metodo utilizzato sono riportati al *Paragrafo 5.4.2*. Analizzando i cromatogrammi delle singole specie presenti in soluzione, si nota come la risoluzione cromatografica non sia ottimale (*Paragrafo 3.2.1*), con tempi di ritenzione particolarmente dilatati e picchi sovrapposti, i cui massimi differiscono principalmente in base al peso molecolare delle specie che, nella maggior parte dei casi, vengono ritenute più a lungo all'aumentare delle dimensioni (*Figura 3.6*).

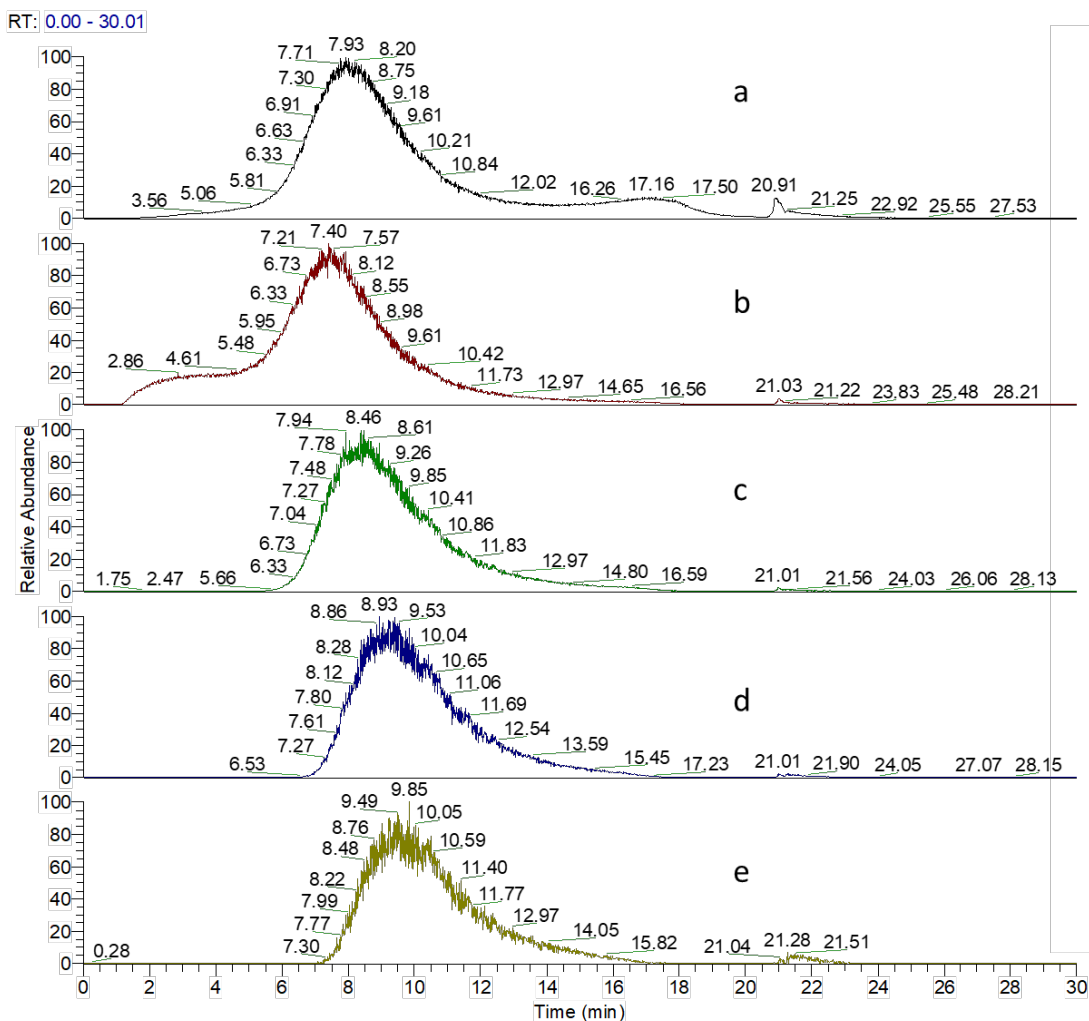


Figura 3.6: cromatogrammi relativi ai picchi derivanti dalle specie presenti nel campione di acido tannico: a) $m/z=169.0151$ attribuito all'acido gallico; b) $m/z=331.0666$ attribuito al glucosio esterificato con un'unità di acido gallico; c) $m/z=483.0774$ attribuito al glucosio esterificato con due unità di acido gallico; d) $m/z=635.0898$ attribuito al glucosio esterificato con tre unità di acido gallico; e) $m/z=787.1012$ attribuito al glucosio esterificato con quattro unità di acido gallico

Nonostante la bassa risoluzione cromatografica, indice del fatto che la resina XAD-4 non sia particolarmente efficiente nel separare le specie presenti nelle

soluzioni di tannini, l'utilizzo della spettrometria di massa ha permesso di identificare quelle più abbondanti e ricavare informazioni importanti riguardo i possibili leganti per il Cr(III). In particolare, per tannini idrolizzabili e condensati sono presenti alcune serie di segnali caratteristiche, relative alla classe di appartenenza. Per quanto riguarda i tannini idrolizzabili, in tutti i campioni sono presenti i picchi dovuti a specie formate da una molecola di glucosio esterificata con diverse unità di acido gallico (oltre al segnale dell'acido gallico stesso, a $m/z=169.0151$), a $m/z=331.0666$, $m/z=483.0835$, $m/z=635.0959$ e $m/z=787.1098$, possibili prodotti di idrolisi dell'acido tannico (*Paragrafo 3.1*). Inoltre sono sempre presenti anche i segnali attribuiti all'acido chinico ($m/z=191.0547$), anch'esso esterificato con un numero variabile di unità di acido gallico, a $m/z=343.0707$, $m/z=495.0835$, $m/z=647.0964$ e $m/z=799.1058$ (*Paragrafo 3.1*). Sulla base degli spettri di massa dei tannini idrolizzabili (*Figura 3.7*), si può notare come le differenze principali siano date dalle abbondanze relative delle varie specie presenti: in particolare, i picchi del campione di tara attribuiti ai derivati dell'acido chinico sono più intensi rispetto a quelli dei derivati del glucosio. Oltre alle serie di picchi presenti in tutti i campioni, sono rilevabili segnali caratteristici solo di alcuni tannini, come a $m/z=321.0286$ nel campione di acido tannico, attribuito all'acido digallico. Il picco a $m/z=355.0346$, presente negli spettri di tutte le soluzioni, ha un'intensità relativa molto maggiore negli spettri di mirabolano e castagno, e viene attribuito all'acido chebulico³⁶. Infine, a $m/z=633.0802$, si osserva il segnale caratteristico del campione di mirabolano, attribuito alla corilagina, e a $m/z=933.0749$, nel campione di castagno, si registra il segnale attribuito alla castalgina.

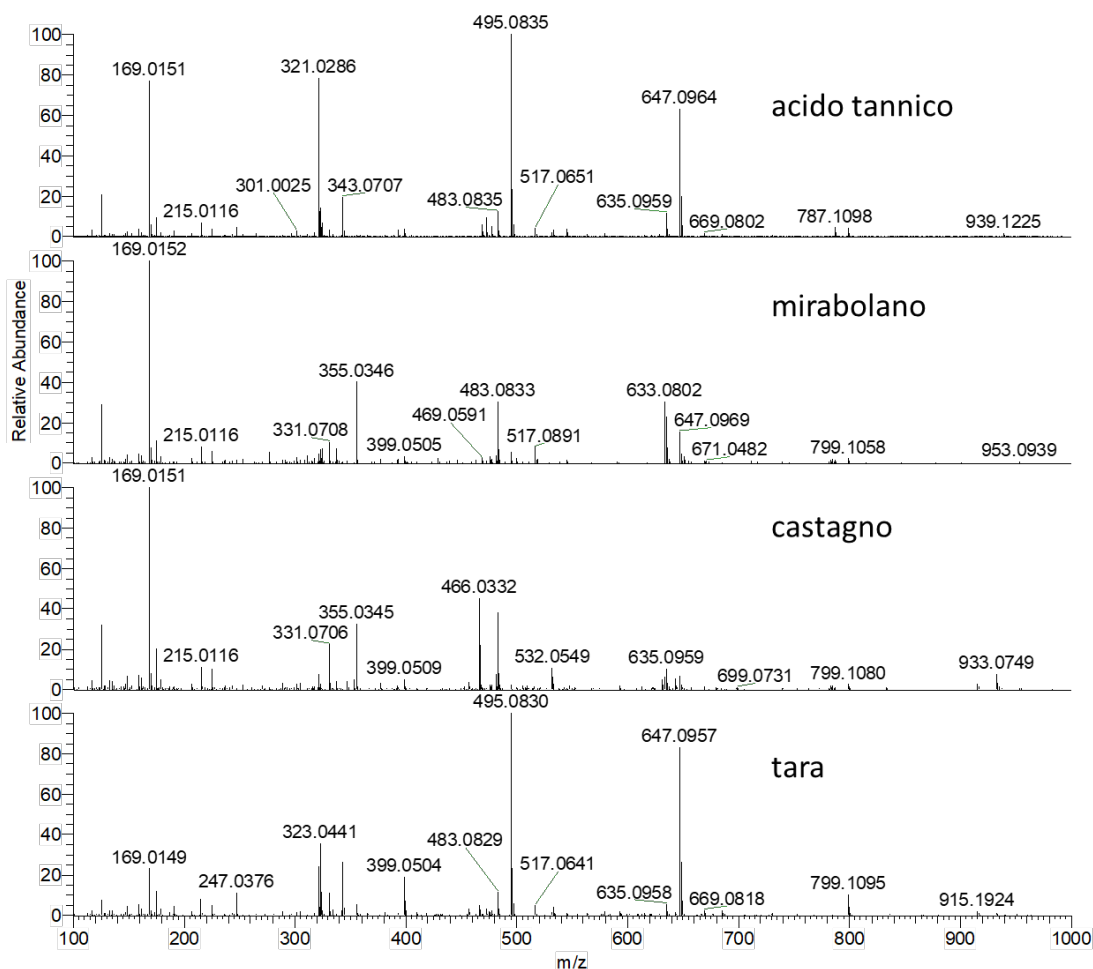


Figura 3.7: spettri di massa dei campioni di tannini idrolizzabili, acquisiti tra $m/z=100$ e $m/z=1000$

Anche nel caso dei tannini condensati, sono presenti alcune serie di segnali caratteristici di tutti campioni, la principale delle quali è quella attribuibile alla catechina (o suoi isomeri) ($m/z=289.0749$) e ai suoi oligomeri, (i segnali del dimero e del trimero cadono rispettivamente a $m/z=561.1462$ e $m/z=833.2178$). Oltre ai derivati dell'epicatechina, sono stati identificati alcuni segnali assegnati a specie presenti anche nei campioni di tannini idrolizzabili, tra cui l'acido chebulico ($m/z=355.0344$), particolarmente abbondante nel campione di quebracho, e alcuni derivati del prodotto di esterificazione, tra acido chinico e acido gallico ($m/z=647.0958$, $m/z=799.1084$). Gli spettri ottenuti per i tannini condensati presentano differenze più marcate nei picchi più intensi rispetto a quelli relativi ai tannini idrolizzabili, come si può osservare nello spettro di massa del campione di mimosa (Figura 3.8). Tale spettro è infatti caratterizzato dalla serie di segnali a $m/z=577.1410$

(attribuibile a un dimero di proantocianidina di tipo B), $m/z=593.1360$ (attribuibile a una prodelfinidina, formata una molecola di epicatechina legata a una di gallocatechina)³⁸, $m/z=849.2127$ e $m/z=865.2077$, attribuibili ai trimeri delle specie che danno origine rispettivamente i picchi a $m/z=577.1410$ e $m/z=593.1360$.

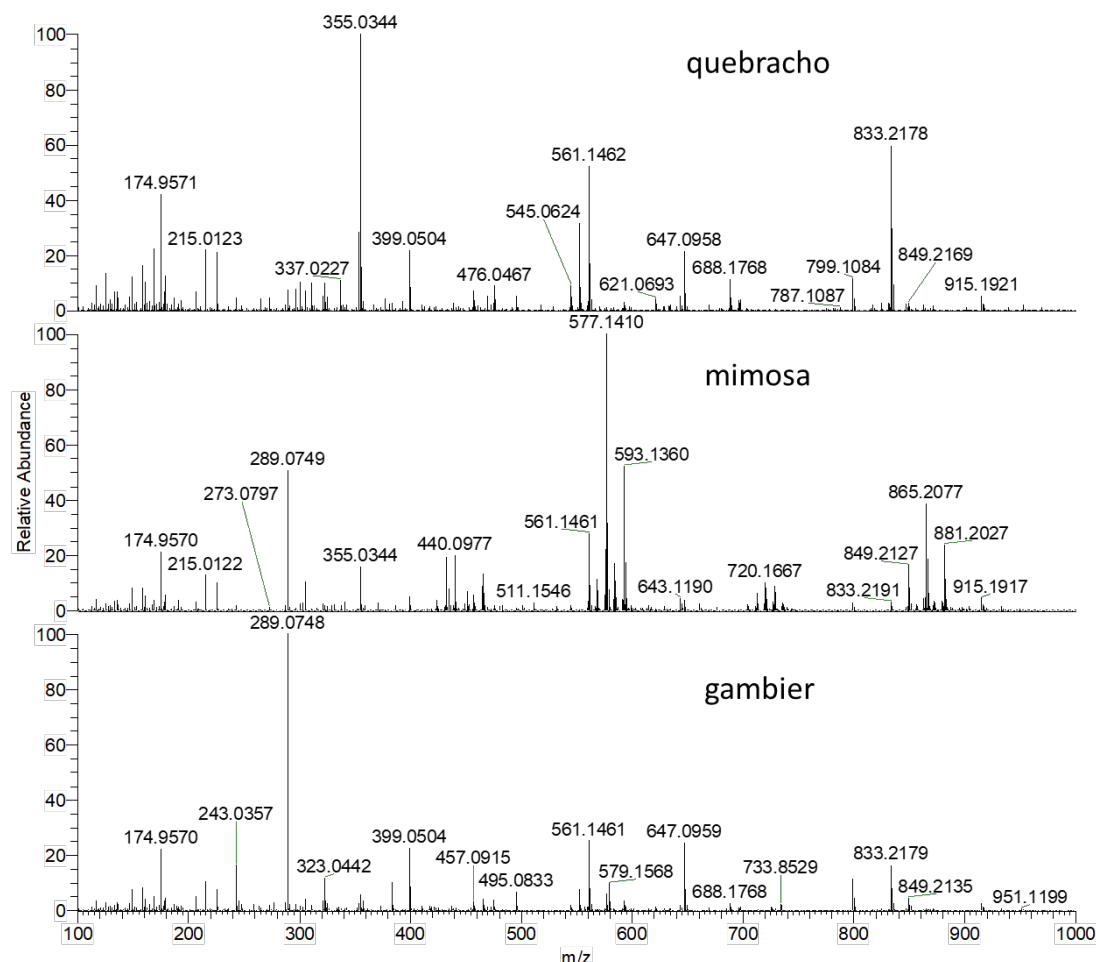


Figura 3.8: spettri di massa dei campioni di tannini condensati, acquisiti tra $m/z=100$ e $m/z=1000$

Gli ultimi tannini analizzati, appartenenti alla classe dei tannini sintetici, sono: lignina solfonata "bretax", lignina solfonata mix, tannino di condensazione naftalensulfonico e tannino di condensazione 1,4-diidrossi-difenilsulfone. Dagli spettri di massa acquisiti (*Figura 3.9*), si può notare come, anche in questo caso, siano presenti alcuni segnali riscontrabili nei tannini idrolizzabili e condensati, tra cui la serie attribuita alle specie formate da un'unità centrale di acido chinico esterificata con diverse molecole di acido gallico a

$m/z=495.0835$ (presente solo nello spettro di massa del campione di lignina solfonata mix), $m/z=647.0963$, e $m/z=799.1089$. Per quanto riguarda questa classe di tannini, ottenuti per condensazione di polifenoli solfonati (*Paragrafo 1.2.1*), si può notare come, negli spettri di massa dei tannini di condensazione naftalensulfonico e 1,4-diidrossi-difenilsulfone, le specie maggiormente abbondanti siano rispettivamente l'acido naftalensulfonico, a $m/z=207.0136$, e l'1,4-diidrossi-difenilsulfone, a $m/z=249.0251$, ovvero le unità fondamentali che costituiscono questi due tannini. Fatta eccezione per il tannino di condensazione naftalensulfonico, in cui il picco a $m/z=207.0136$ risulta nettamente più intenso degli altri, sono presenti alcuni con intensità significativa, in comune anche con i tannini sintetici, oltre a quelli precedentemente citati. In particolare si può notare come la lignina solfonata mix presenti il segnale attribuito all'1,4-diidrossi-difenilsulfone. Infine, in tutti gli spettri è presente un segnale a $m/z=174.9570$ (con abbondanza relativa maggiore nel campione di lignina solfonata "bretax"), che non è stato però identificato.

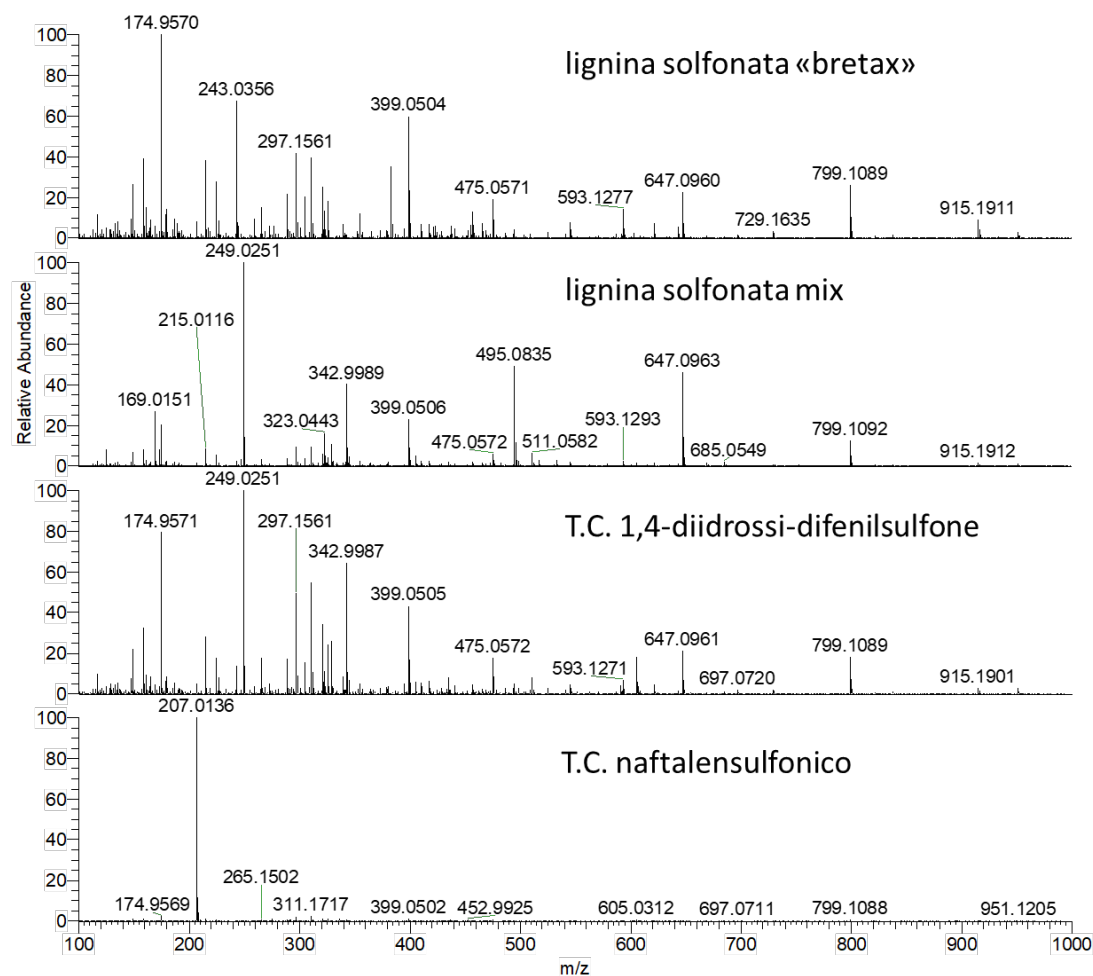


Figura 3.9: spettri di massa dei campioni di tannini condensati, acquisiti tra $m/z=100$ e $m/z=1000$ *T.C.=Tannino di condensazione

Mediante analisi UHPLC-ESI-MS è stato possibile identificare molte specie, caratteristiche sia dei singoli tannini che comuni a classi diverse. In *Tabella 3* sono riportati i segnali che è stato possibile ricondurre a composti presenti all'interno di soluzioni di tannini e i campioni in cui sono stati individuati.

Tabella 3: segnali individuati negli spettri di massa dei tannini analizzati e relative attribuzioni

PICCO (m/z)	IONE MOLECOLARE	ATTRIBUZIONE	CAMPIONI
169.0151	$C_7H_5O_5^-$	acido gallico	TA; M; Q; C; MM; T; G; LSB; LSM; TCDFS; TCNS***
321.0247	$C_{14}H_9O_9^-$	acido digallico	TA; Q; T
331.0666	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	glucogallina (TA-9GA*)	TA; M; C
483.0774	$C_{20}H_{19}O_{14}^-$	TA-8GA	TA; M; C; T

635.0898	$C_{27}H_{23}O_{18}^-$	TA-7GA	TA; M; C
787.1012	$C_{34}H_{27}O_{22}^-$	TA-6GA	TA; M
939.1125	$C_{41}H_{31}O_{26}^-$	TA-5GA	TA; M
1091.1231	$C_{48}H_{35}O_{30}^-$	TA-4GA	TA; M; C
1243.1343	$C_{55}H_{39}O_{34}^-$	TA-3GA	TA; M; C
1395.1457	$C_{62}H_{43}O_{38}^-$	TA-2GA	TA; M
1547.1563	$C_{69}H_{47}O_{42}^-$	TA-GA	TA; M
191.0547	$C_7H_{11}O_6^-$	acido chinico	TA; Q; M; T
343.0664	$C_{14}H_{15}O_{10}^-$	CA**+GA	TA; Q; M; T
495.0772	$C_{21}H_{19}O_{14}^-$	CA+2GA	TA; M; Q; T; G; LSM
647.0879	$C_{28}H_{23}O_{18}^-$	CA+3GA	TA; M; Q; C; MM; T; G; LSB; LSM; TCDFS; TCNS
799.0996	$C_{35}H_{27}O_{22}^-$	CA+4GA	TA; M; Q; C; MM; T; G; LSB; LSM; TCDFS;
951.1107	$C_{42}H_{31}O_{26}^-$	CA+5GA	TA; LSB; TCDFS; TCNS
1103.1241	$C_{49}H_{35}O_{30}^-$	CA+6GA	TA
355.0302	$C_{14}H_{11}O_{11}^-$	acido chebulico	M; Q; C; MM; T; G; TCNS
337.0197	$C_{14}H_9O_{10}^-$	acido esaidrossifenico	M
481.0617	$C_{20}H_{17}O_{14}^-$	HHDP- glucopiranosio	M
633.0727	$C_{27}H_{21}O_{18}^-$	corilagina	M; C
300.9986	$C_{14}H_5O_8^-$	acido ellagico	M
289.0716	$C_{15}H_{13}O_6^-$	epicatechina	Q; MM; G;
371.0439	$C_{15}H_{15}O_9S^-$	epicatechina monosolfonata	Q
561.1397	$C_{30}H_{25}O_{11}^-$	dimero epicatechina	Q; MM; G
643.1030	$C_{30}H_{27}O_{14}S^-$	dimero epicatechina monosolfonato	Q
833.2080	$C_{45}H_{37}O_{16}^-$	trimero epicatechina	Q; C; MM; G

915.1838	$C_{45}H_{39}O_{19}S^-$	trimero epicatechina monosolfonato	Q; C; MM; T; G; LSB; LSM; TCDFS; TCNS
1105.2785	$C_{60}H_{49}O_{21}^-$	tetramero epicatechina	Q; C; G
631.0672	$C_{27}H_{19}O_{18}^-$	castalina	C
783.0808	$C_{34}H_{23}O_{22}^-$	pedunculagina	C
785.0950	$C_{34}H_{25}O_{22}^-$	Tellimagrandin I	C
933.0774	$C_{41}H_{25}O_{26}^-$	castalgina	C; MM;
249.0251	$C_{12}H_9O_4S^-$	1,4-diidrossi- difenilsulfone	LSM; TCDFS
207.0136	$C_{10}H_7O_3S^-$	acido naftalensulfonico	TCNS

* **GA**=acido gallico

** **CA**=acido chinico

*** **TA**=acido tannico; **M**=mirabolano; **Q**=quebracho; **C**=castagno; **MM**=mimosa; **T**=tara; **G**=gambier; **LSB**=lignina solfonata "bretax"; **LSM**=lignina solfonata mix; **TCDFS**=tannino di condensazione 1,4-diidrossi-difenilsulfone; **TCNS**=tannino di condensazione naftalensulfonico

Per confermare l'attribuzione dei picchi proposta in *Tabella 3*, le specie che generano i segnali più intensi negli spettri di massa dei diversi tannini sono state sottoposte ad analisi MS². Gli spettri ottenuti dalla frammentazione delle molecole suggeriscono che l'assegnazione proposta sia plausibile, in quanto i segnali ottenuti sono riconducibili alle unità fondamentali delle diverse specie identificate studiando gli spettri di massa. A titolo di esempio, in *Figura 3.10* sono riportati gli spettri MS² di due specie con rapporti m/z pari a 483.0774 e 647.0879.

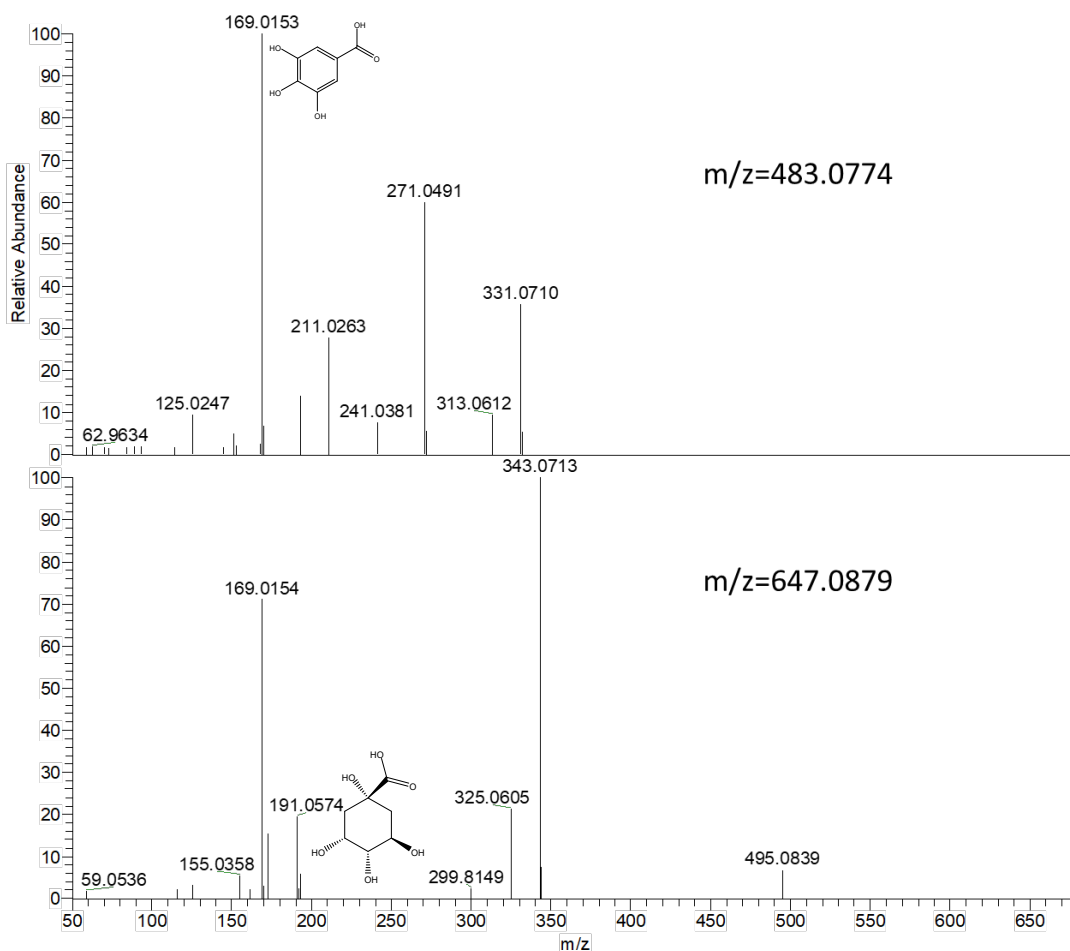


Figura 3.10: spettri MS² dei picchi attribuiti al glucosio esterificato con due molecole di acido gallico (m/z=483.0774) e all'acido chinico esterificato con tre molecole di acido gallico. a destra dei picchi a m/z=169.0153 e m/z=191.0574 sono riportate le relative formula di struttura

Lo spettro relativo al picco con m/z=483.0774 (Figura 3.10, in alto) è riconducibile alla specie costituita da un'unità di glucosio esterificata con due unità di acido gallico, la cui frammentazione restituisce i segnali attribuiti alla glucogallina (costituita da una molecola di glucosio esterificata con un'unità di acido gallico, a m/z=331.0710) e all'acido gallico (m/z=169.0151). Lo spettro MS² relativo al picco a m/z=647.0879 (Figura 3.10, in basso) è attribuito, invece, all'acido chinico esterificato con tre unità di acido gallico. In questo caso, la frammentazione restituisce quattro segnali a m/z=495.0839, m/z=343.0713, m/z=191.0574 e m/z=169.0154. I picchi ottenuti sono stati attribuiti rispettivamente a una molecola di acido chinico esterificato con due unità di acido gallico (m/z=495.0839), a una molecola di acido chinico

esterificata con un'unità di acido gallico ($m/z=343.0713$), ad una molecola di acido chinico ($m/z=191.0574$) e ad una di acido gallico ($m/z=169.0154$).

In *Figura 3.11* sono riportati gli spettri MS^2 dei picchi a $m/z=833.2080$ e $m/z=643.1030$, identificati negli spettri di massa dei tannini condensati e attribuiti rispettivamente al trimero e al dimero monosolfonato dell'epicatechina. Osservando gli spettri di frammentazione, si può notare come entrambi presentino il picco attribuito all'epicatechina ($m/z=289.0754$), oltre alla cumarina ($m/z=161.0253$) e al pirocatecolo ($m/z=109.0296$), probabilmente derivanti dalla rottura del legame C-C tra gli anelli B e C della molecola di epicatechina (*Figura 3.11*). Per quanto riguarda lo spettro di frammentazione del dimero monosolfonato, si può riconoscere anche un segnale a $m/z=79.9567$, probabilmente riconducibile al gruppo solfonico.

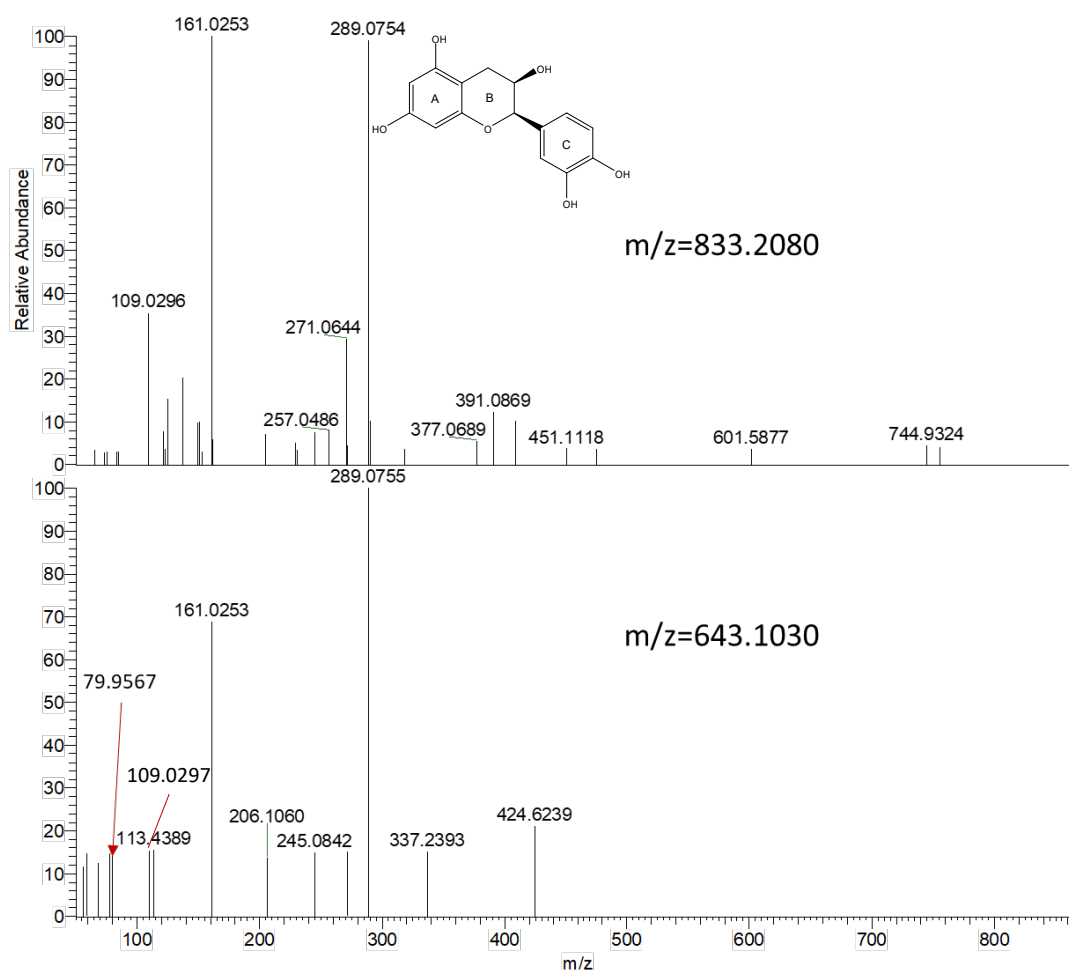


Figura 3.11: spettri MS^2 dei picchi attribuiti al trimero dell'epicatechina ($m/z=833.2080$) e al dimero monosolfonato ($m/z=643.1030$). a destra del picco attribuito all'epicatechina è riportata la relativa formula di struttura

3.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COMPLESSI DI Cr(III) CON ACIDO GALLICO E TANNINI

3.3.1 complessi di Cr(III) con acido gallico

Insieme al lavoro di classificazione delle specie presenti nelle soluzioni di tannini, sono state svolte alcune prove preliminari di sintesi di complessi tra acido gallico e sali di cromo, al fine di studiare un sistema modello, semplificato rispetto alla situazione presente all'interno delle acque reflue conciarie. Sono stati preparati due campioni, utilizzando $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ e acetato di cromo(III) come precursori di Cr(III) (*Paragrafo 5.5.1*). Le soluzioni di Cr(III) sono state sottoposte ad analisi UHPLC-ESI-MS e MS^2 , utilizzando una colonna PolymerX. Dall'analisi degli spettri di massa, sono stati individuati diversi segnali che presentano il pattern isotopico del cromo (*Figura 3.12*) in entrambi in campioni.

Cr: Cr1 pa Chrg 1

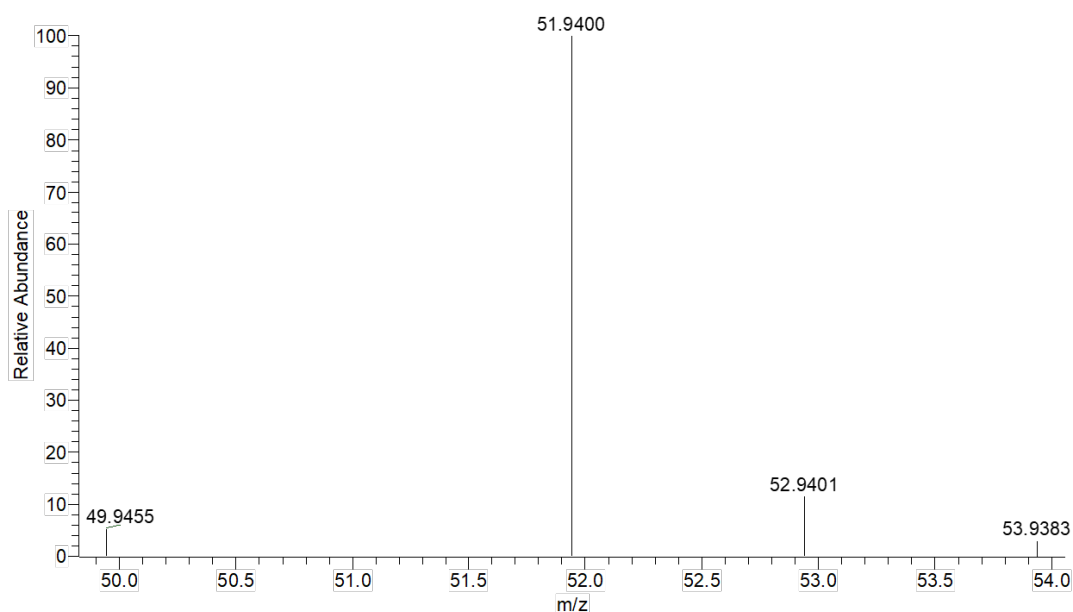


Figura 3.12: pattern isotopico del cromo

Per quanto riguarda la soluzione preparata a partire dal solfato di cromo (*Figura 3.13*), i picchi attribuiti a specie contenenti cromo sono quelli a $m/z=533.9624$, $m/z=635.8273$, $m/z=674.9056$ e $m/z=737.8592$. Tutte le specie elencate vengono eluite con un tempo di ritenzione pari a 9.23 minuti (*Figura 3.14a*).

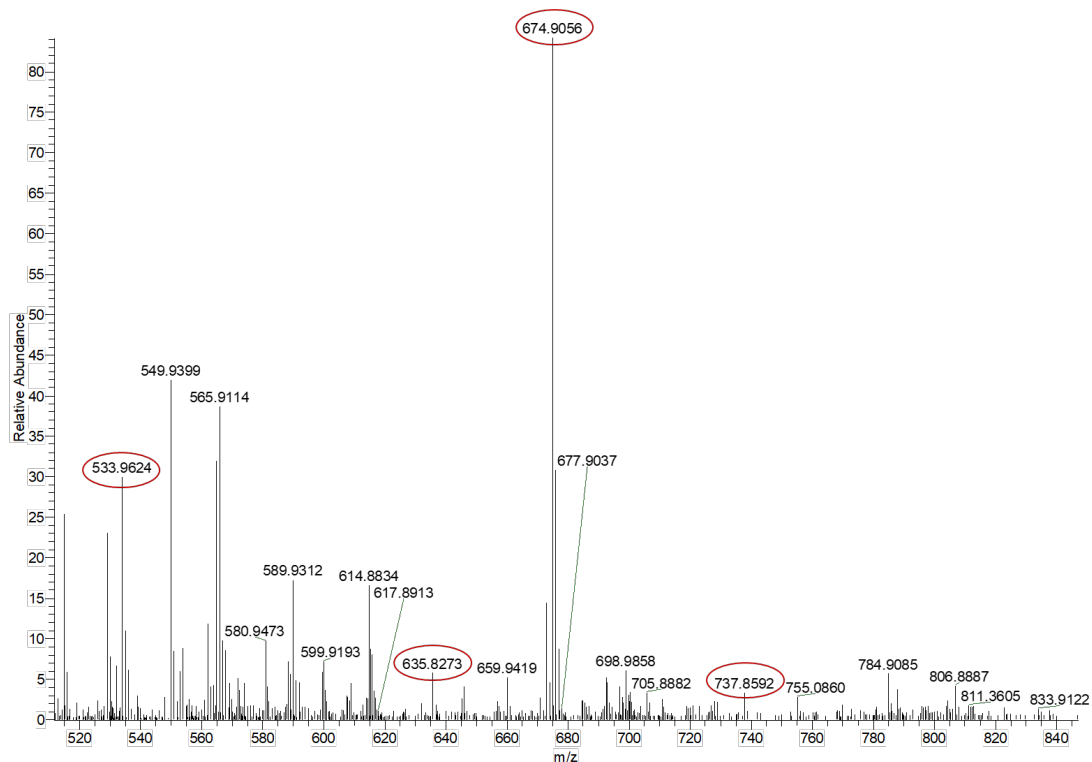


Figura 3.13: spettro di massa del campione contenente acido gallico e $KCr(SO_4)_2$ con evidenziati i picchi che presentano il pattern del cromo

Osservando il cromatogramma relativo alla soluzione di acido gallico contenente acetato di cromo(III) (*Figura 3.14b*), si notano tre segnali di specie contenenti cromo, uno con intensità massima a tempo di ritenzione di 4.91 minuti (evidenziato in blu), attribuibile all'acetato di cromo(III), e due picchi ulteriori a 2.30 e 9.32 minuti (evidenziati in rosso).

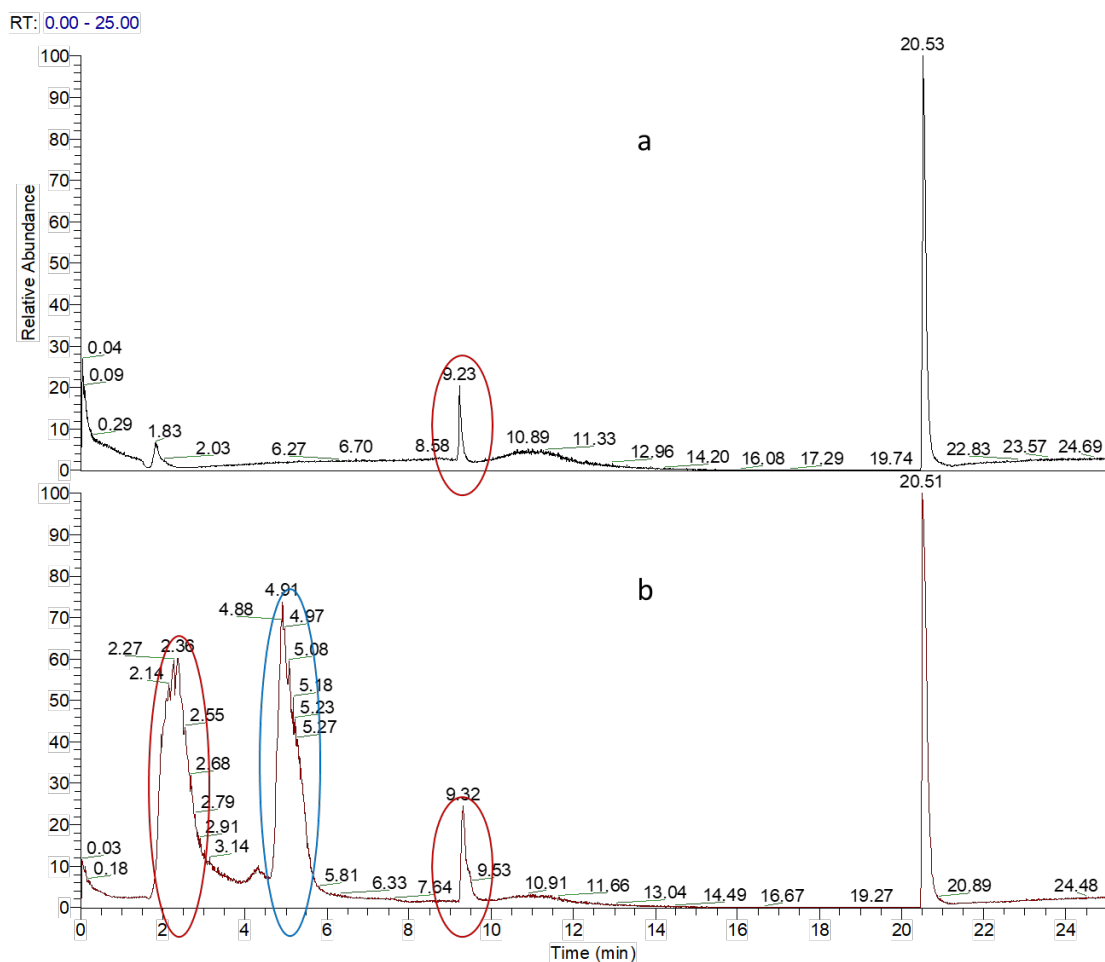


Figura 3.14: cromatogrammi delle soluzioni contenenti a) acido gallico e $KCr(SO_4)_2$ e b) acido gallico e acetato di cromo(III). In rosso sono evidenziati i picchi attribuiti a complessi tra cromo e acido gallico. In blu è evidenziato il picco dell'acetato di cromo(III) non reagito

Lo spettro di massa del picco cromatografico a 9.32 minuti (Figura 3.15) indica la presenza di specie che potrebbero contenere acido gallico nella sfera di coordinazione del Cr(III). Nello specifico, i picchi a $m/z=693.0962$, $m/z=743.8873$, $m/z=753.9299$ e $m/z=803.9098$ potrebbero essere attribuiti rispettivamente alle specie $[Cr_3O(Ac)_6(GA-2H)]^-$, $[Cr_3O(CH_3COO)_4(GA-2H)_2]$, $[Cr_3O(CH_3COO)_6(GA-2H)(CH_3COOH)]^-$ e $[Cr_3O(CH_3COO)_3(GA-2H)_2(GA-H)_2]$ (dove la sigla GA- n H indica una molecola di acido gallico privata di n protoni).

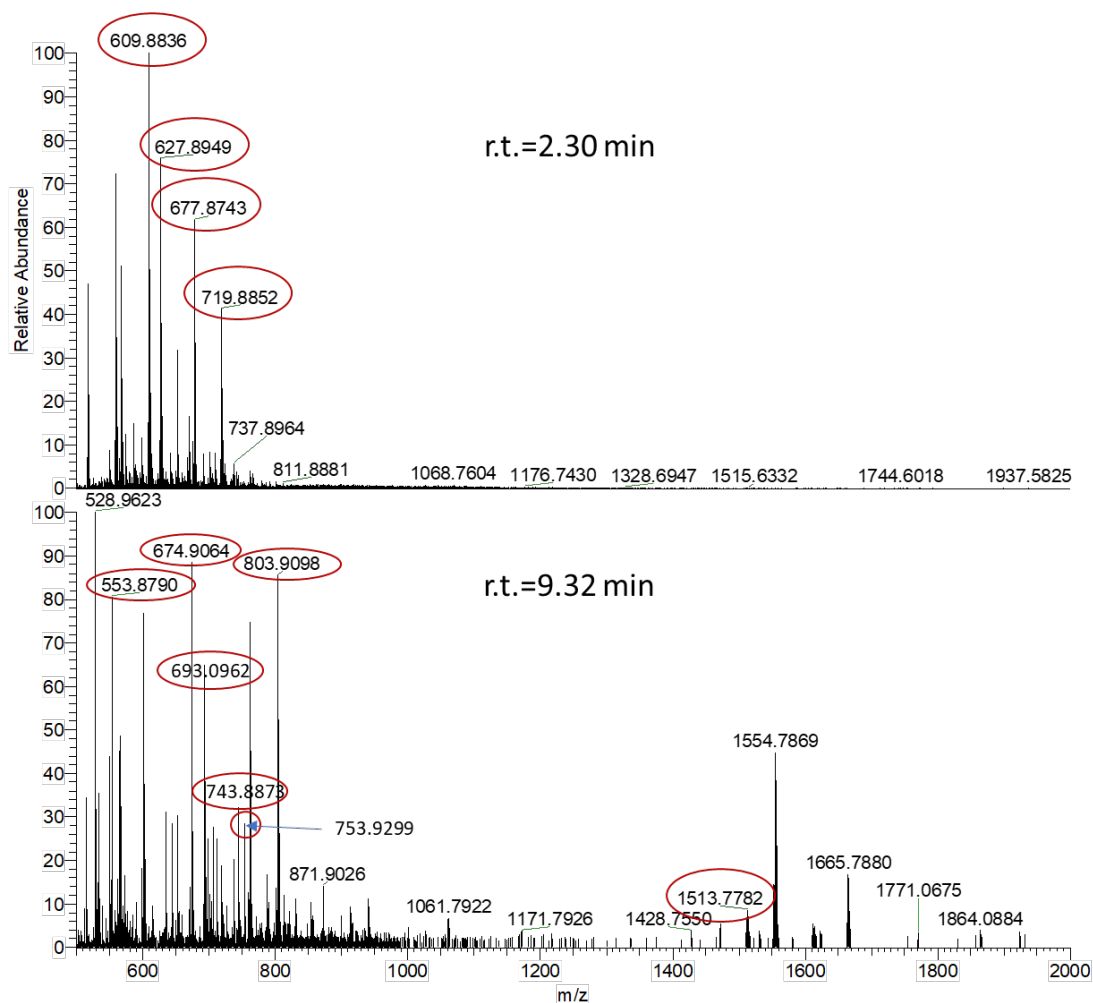


Figura 3.15: spettri di massa, relativi alle specie con tempi di ritenzione di 2.30 e 9.32 minuti, del campione contenente acido gallico e cromo acetato con evidenziati i picchi in cui è stato individuato il pattern del cromo

3.3.2 complessi di Cr(III) con tannini

Oltre allo studio della resina XAD-4 nella separazione di complessi semplici di Cr(III), tannini liberi e complessi di Cr(III) con tannini, sono state analizzate soluzioni di $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ contenenti acido tannico, mirabolano e quebracho (Paragrafo 5.5.2) per valutare l'eventuale formazione di complessi tra Cr(III) e tannini. Il $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ è stato scelto in quanto è uno dei sali utilizzati nel processo industriale di concia al cromo³⁵. Nei cromatogrammi dei tre campioni (Figura 3.16) si riconoscono due picchi, uno più stretto, con tempo di ritenzione compreso tra 1.5 e 3 minuti, dovuto alle specie contenenti cromo, e uno più allargato, compreso tra 6 e 16 minuti, causato dai tannini, in cui non si nota la presenza di segnali caratterizzati dal pattern del cromo.

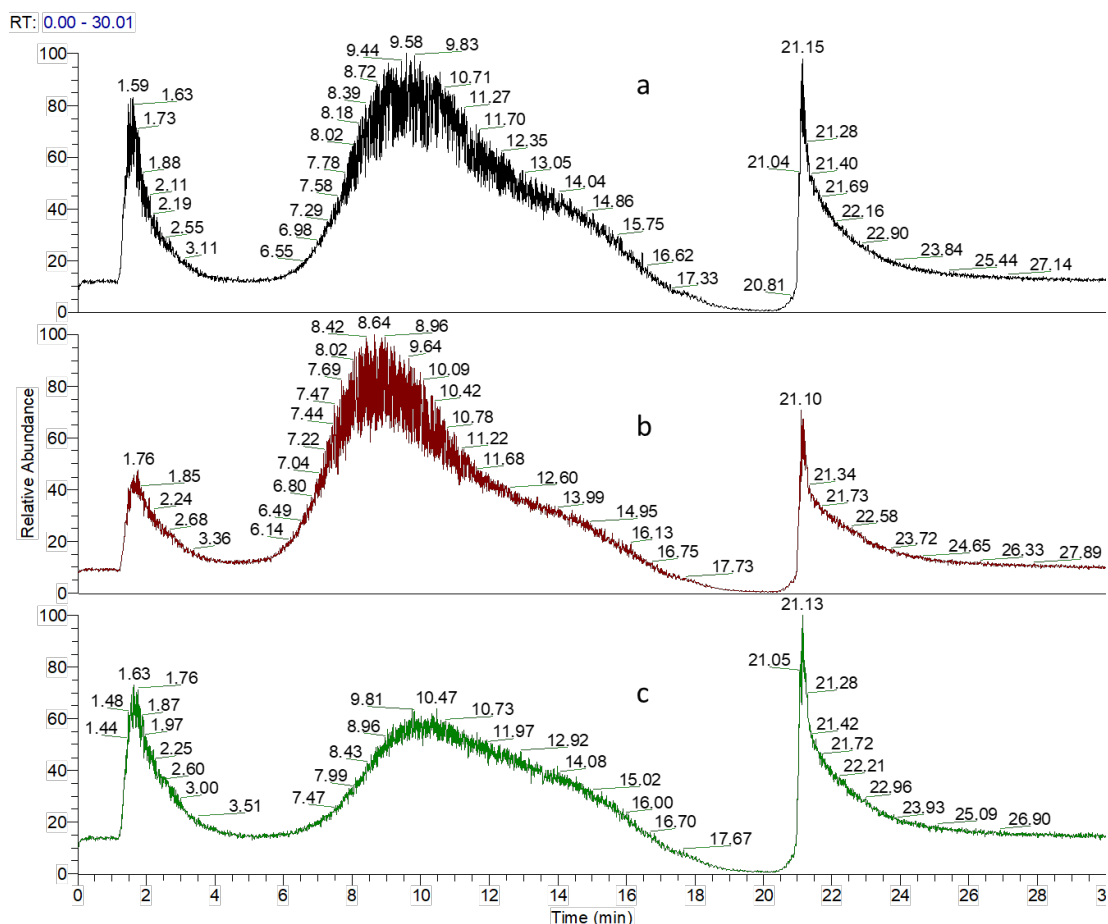


Figura 3.16: cromatogrammi relativi alle specie contenenti a) $KCr(SO_4)_2$ e acido tannico, b) $KCr(SO_4)_2$ e mirabolano, c) $KCr(SO_4)_2$ e quebracho

Negli spettri di massa relativi al picco cromatografico con tempo di ritenzione pari a 1.6 minuti, acquisiti nell'intervallo tra $m/z=100$ e $m/z=1000$ (intervallo in cui gli spettri sono analoghi per tutti i campioni) sono state individuate due specie che potrebbero essere complessi di Cr(III) con l'anione formiato (derivante dall'acido formico presente nell'eluente), rispettivamente a $m/z=187.9431$ e $m/z=231.9938$ (Figura 3.17). Gli spettri acquisiti tra $m/z=500$ e $m/z=2000$ (Figura 3.18) risultano, invece, eccessivamente rumorosi per poter identificare con certezza i picchi con il pattern del cromo.

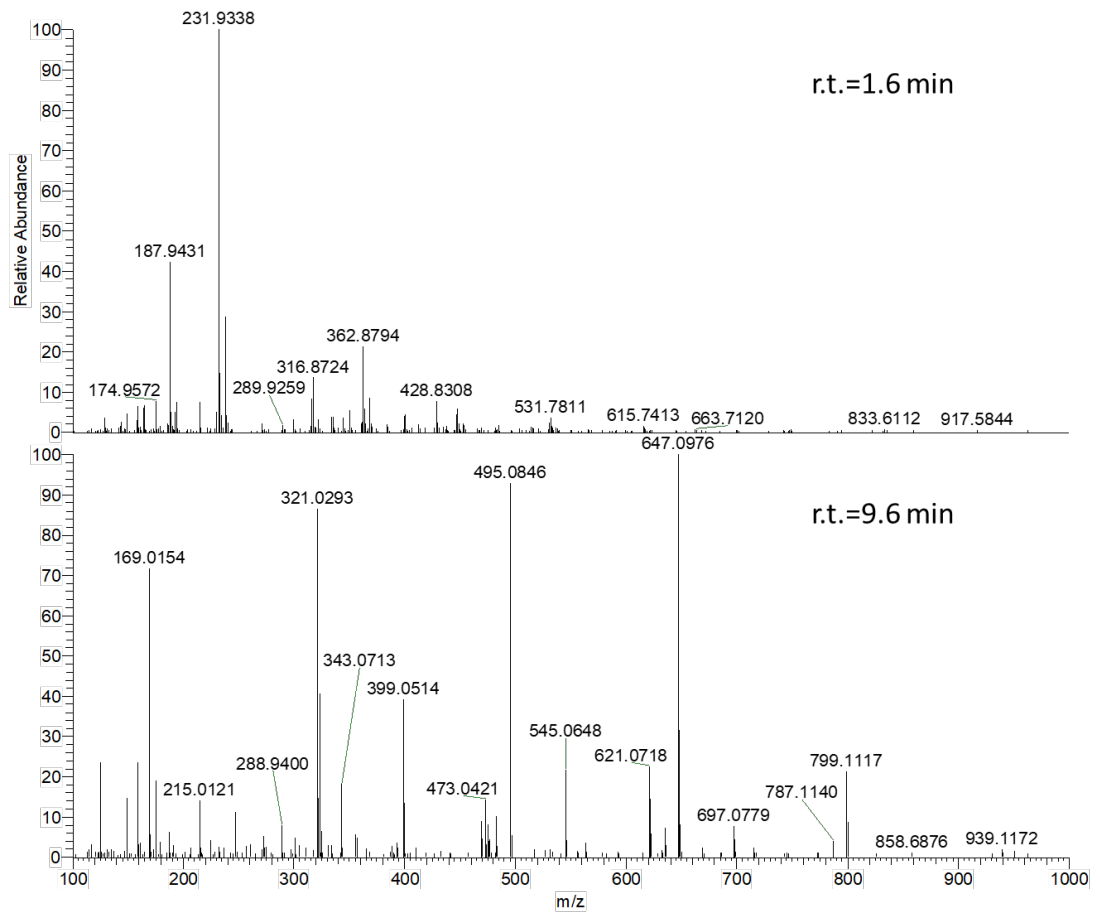


Figura 3.17: spettri di massa relativi ai picchi cromatografici delle specie presenti nella soluzione contenente $KCr(SO_4)_2$ e acido tannico, acquisiti tra $m/z=100$ e $m/z=1000$

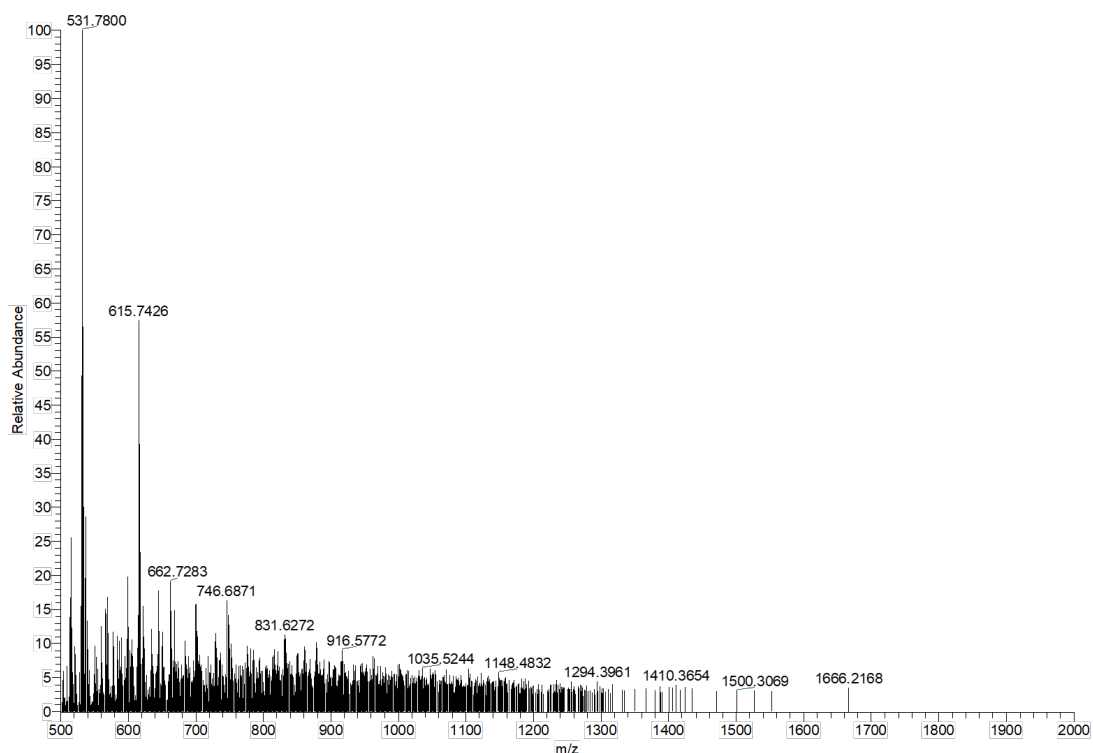


Figura 3.18: spettro di massa del campione contenente $KCr(SO_4)_2$ e acido tannico relativo al picco cromatografico con $r.t.=1.6$ min, acquisito tra $m/z=500$ e $m/z=2000$

Poiché gli spettri di massa di tutti i campioni risultano uguali e presentano picchi attribuibili a complessi di cromo(III) con l'acido formico, il picco cromatografico a 1.6 min potrebbe essere riconducibile alla frazione di cromo che non reagisce coi tannini. L'impossibilità di identificare segnali con il pattern del cromo a tempi di ritenzione maggiori, invece, potrebbe essere dovuta alla bassa concentrazione di eventuali complessi tra Cr(III) e tannini, i cui segnali verrebbero quindi coperti da quelli relativi ai tannini non coordinati.

3.4 CARATTERIZZAZIONE HPLC-UV-DAD E ICP-MS DI SOLUZIONI CONTENENTI Cr(III) E ACIDO TANNICO

Al fine di verificare la possibile presenza di specie contenenti cromo con tempi di ritenzione confrontabili a quelli dei tannini, è stato sviluppato un metodo cromatografico, basato sulla tecnica HPLC-UV-DAD, utilizzando una colonna PolymerX come fase stazionaria. Inizialmente, per determinare i

tempi di ritenzione delle singole specie, sono state analizzate tre soluzioni a pH=3 contenenti rispettivamente acido gallico, acido tannico e cromo acetato. Nei cromatogrammi (*Figura 3.17*), si possono notare quattro picchi molto intensi a tempi di ritenzione pari a circa 5, 10, 12 e 14 minuti. Il segnale a 5 minuti, presente esclusivamente nel campione di acetato di cromo(III), è stato perciò attribuito alla specie $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, che mostra una scarsa affinità per la fase stazionaria. Il picco a 10 minuti, presente nei campioni contenenti acido gallico e acido tannico, viene attribuito all'acido gallico, mentre segnale a 14 minuti, presente solo nel campione di acido tannico, è stato attribuito alle specie derivanti dall'idrolisi del tannino in soluzione acquosa. Infine, il segnale a 12 minuti, presente in tutti i campioni, è attribuito a impurezze presenti all'interno della colonna, in quanto tale picco è presente anche in cromatogrammi ottenuti iniettando in colonna aliquote di H_2O milliQ (profilo nero in *Figura 3.19*), che non dovrebbero restituire segnali.

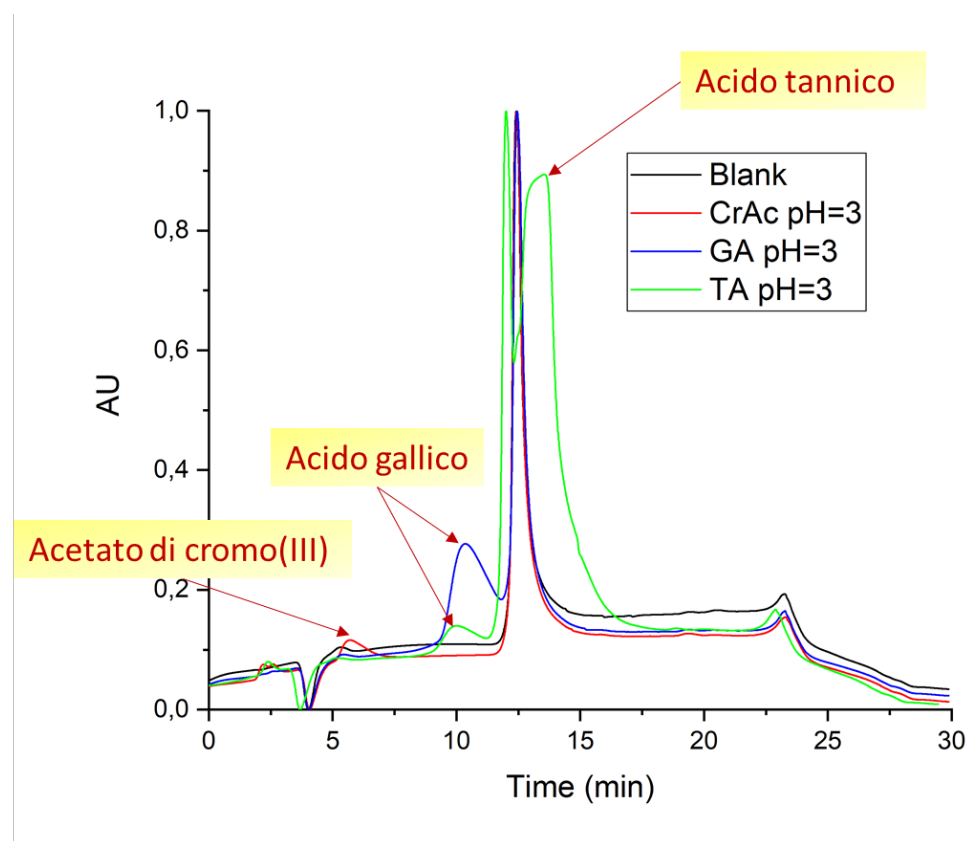


Figura 3.19: cromatogrammi relativi alle soluzioni contenenti acetato di cromo(III) (CrAc), acido gallico (GA), acido tannico (TA), H_2O milliQ (Blank). Il pH di tutti i campioni è stato fissato a 3 per aggiunta di una soluzione di acido formico 3% V/V

Oltre agli spettri delle soluzioni sopra citate, sono stati acquisiti anche quelli di una soluzione di acido tannico, a pH=8.5, dopo due ore di agitazione e dopo 4 giorni (*Figura 3.20*), per identificare eventuali cambiamenti nei picchi cromatografici dovuti all'idrolisi basica del substrato.

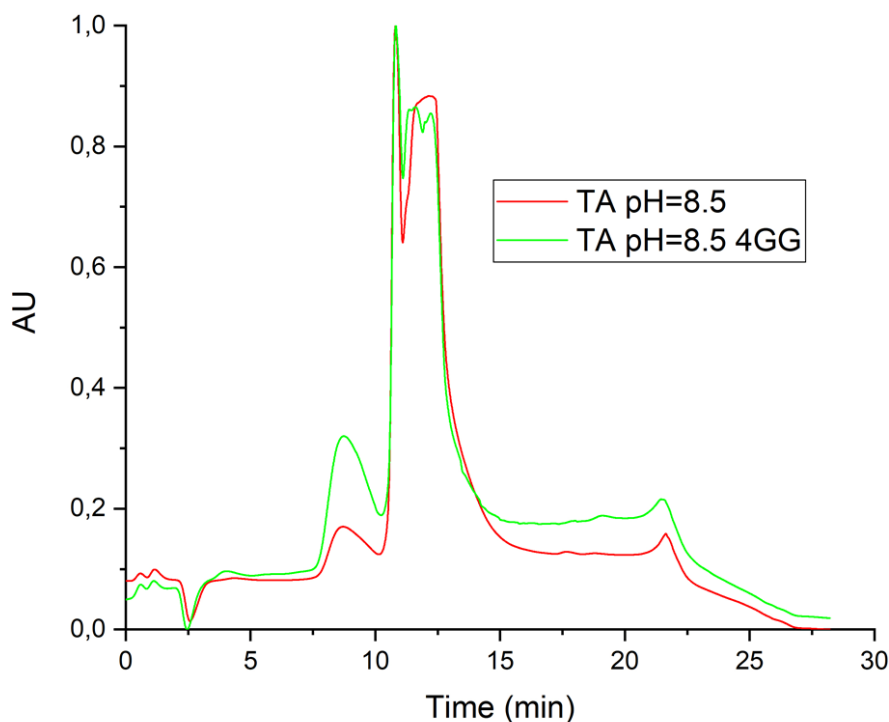


Figura 3.20: cromatogrammi relativi alle soluzioni basiche di acido tannico (pH=8.5, per aggiunta di NH_3 10% V/V), dopo due ore (TA pH=8.5) e dopo quattro giorni (TA pH=8.5 4GG) di agitazione

I cromatogrammi mostrano un evidente incremento dell'intensità del segnale attribuito all'acido gallico (a 9.5 minuti), conseguente all'idrolisi basica dell'acido tannico. Si può notare, inoltre, una differenza significativa nei tempi di ritenzione dei segnali attribuiti alle specie derivanti dall'idrolisi dell'acido tannico in soluzione acquosa tra 13 e 15 minuti. In questo intervallo di tempo, il cromatogramma relativo alla soluzione analizzata dopo quattro giorni presenta due picchi, parzialmente sovrapposti. Nel cromatogramma acquisito subito dopo la preparazione del campione, invece, è presente un unico picco allargato. Questa variazione potrebbe essere dovuta al cambiamento delle specie in soluzione, causata dall'ambiente basico: in particolare, può avvenire la transesterificazione dell'acido gallico con

formazione dell'estere metilico corrispondente. Questa ipotesi è supportata dalla presenza del segnale a $m/z=183.0291$, che si osserva anche nell'analisi ESI-MS della soluzione basica di acido tannico per aggiunta di NH_3 3% V/V (Paragrafo 3.2.2).

Infine, due soluzioni a pH=3 e a pH=8.5 contenenti cromo acetato e acido tannico, sono state analizzate mediante HPLC-UV-DAD (Figura 3.21).

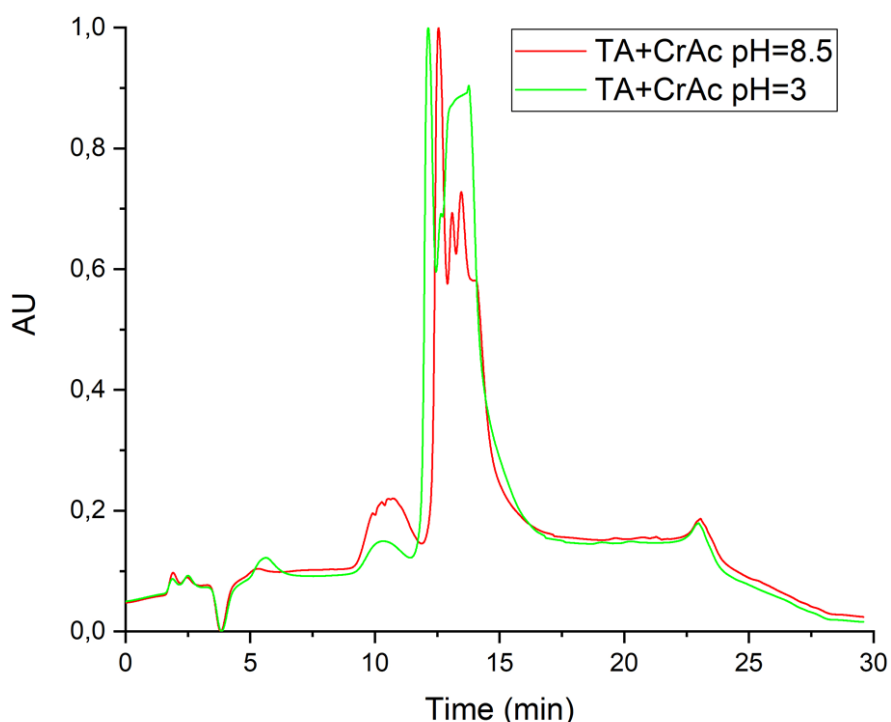


Figura 3.21: cromatogrammi relativi alle soluzioni contenenti acido tannico e acetato di cromo(III) a pH=8.5 (curva rossa) e pH=3 (curva verde)

I cromatogrammi mostrano differenze significative rispetto a quelli delle soluzioni contenenti solo acido tannico. In particolare, il cromatogramma del campione a pH=8.5 presenta una deformazione del picco relativo all'acido gallico e la comparsa di due segnali distinti a 13-15 min. Tali picchi cadono a tempi di ritenzione caratteristici delle specie derivanti dall'idrolisi dell'acido tannico, che nel campione a pH=3 sono convoluti in un unico picco. Nello spettro del campione a pH=3, invece, si nota un picco molto simile a quello attribuito in precedenza all'acetato di cromo(III) (Figura 3.19), indice del fatto che, probabilmente, una parte del complesso non si lega all'acido tannico, o ai suoi prodotti di idrolisi, e non viene ritenuto dalla fase stazionaria.

Al fine di quantificare l'eventuale contenuto di cromo (*Tabella 4*), per entrambi i campioni analizzati tramite HPLC-UV-DAD, le frazioni che restituiscono i picchi cromatografici attribuiti all'acido gallico (eluito tra 1 e 12 minuti), alle specie derivanti dall'idrolisi dell'acido tannico (eluito tra 13 e 15 minuti) e alle impurezze presenti all'interno della colonna (eluito tra 12 e 13 minuti) sono state raccolte e sottoposte ad analisi ICP-MS. Per verificare l'attribuzione del picco cromatografico con tempo di ritenzione compreso tra 12 e 13 minuti a impurezze ritenute nella colonna, la frazione corrispondente è stata raccolta anche durante la corsa cromatografica di un campione di H₂O milliQ, privo di cromo.

Tabella 4: risultati delle analisi ICP-MS relative alla concentrazione di cromo nelle diverse frazioni raccolte

CAMPIONE	CONCENTRAZIONE CROMO (ppb)
<i>impurezze contenute nel bianco (eluite tra 12 e 13 minuti)</i>	0.87
<i>impurezze contenute nel campione a pH=3 (eluite tra 12 e 13 minuti)</i>	1.01
<i>impurezze contenute nel campione a pH=8.5 (eluite tra 12 e 13 minuti)</i>	0.74
<i>frazione che restituisce il picco attribuito all'acido gallico nel campione a pH=3 (eluited tra 10 e 12 minuti)</i>	1.43
<i>frazione che restituisce il picco attribuito all'acido gallico nel campione a pH=8.5 (eluited tra 10 e 12 minuti)</i>	1.04
<i>frazione che restituisce il picco attribuito all'acido tannico nel campione a pH=3 (eluited tra 13 e 15 minuti)</i>	6.16
<i>frazione che restituisce il picco attribuito all'acido tannico nel campione a pH=8.5 (eluited tra 13 e 15 minuti)</i>	7.95

Le analisi ICP-MS indicano come nelle frazioni corrispondenti alle impurezze presenti in colonna siano presenti delle tracce di cromo, indicative di un inquinamento della colonna precedente alle misure svolte durante questo progetto; la concentrazione di cromo presente in questa frazione (0.87 ppb) è confrontabile con quella presente in quella attribuita all'acido gallico. Al contrario, le concentrazioni di cromo nelle frazioni raccolte tra 13 e 15 minuti

risultano, per quanto basse, significativamente maggiori rispetto a quelle presenti nelle frazioni relative alle impurezze (eluite tra 12 e 13 minuti) e all'acido gallico (eluito tra 10 e 12 minuti) (6.16 ppm per il campione a pH=3 e 7.95 ppm per quello pH=8.5). Questa evidenza potrebbe suggerire la possibile formazione di complessi di Cr(III) con tannini: è infatti verosimile che i tempi di ritenzione dei complessi Cr(III)-tannini siano analoghi a quelli dei tannini liberi e che, a causa della loro concentrazione molto bassa, non siano rilevabili negli spettri di massa. In questa ipotesi, per poter rilevare i complessi di Cr(III) con i tannini mediante spettrometria di massa è necessario separare cromatograficamente queste specie dai tannini liberi.

4. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto in questo progetto di Tesi ha permesso di identificare, attraverso la spettrometria di massa, molte specie derivanti dalla presenza di tannini in soluzione acquosa. Lo studio risulta importante in quanto ha permesso di classificare diversi composti e la loro abbondanza, a seconda della classe di appartenenza dei tannini. Queste informazioni, non ancora riportate in letteratura, sono utili per identificare le specie presenti nelle acque reflue conciarie che possono potenzialmente agire da leganti per il Cr(III). Le analisi preliminari condotte in ambiente basico, inoltre, hanno permesso di evidenziare la formazione di prodotti di transesterificazione, che possono formarsi anche all'interno dei reflui, caratterizzati da un pH leggermente basico.

Per verificare la possibile formazione di complessi tra cromo(III) e tannini, è stato svolto uno studio UHPLC-ESI-MS preliminare su complessi di Cr(III) con acido gallico, usato come legante modello in quanto semplice e presente in tutte le soluzioni di tannini analizzate. Le analisi hanno evidenziato la presenza di alcuni segnali che potrebbero essere imputati a complessi di Cr(III), caratterizzati da una o più unità di acido gallico nella sfera di coordinazione. I risultati ottenuti sono promettenti, in quanto hanno evidenziato la possibile formazione di complessi con acido gallico; inoltre, l'utilizzo della cromatografia si è rivelato utile, perché ha permesso di separare con successo le specie contenenti cromo che non hanno interagito coi tannini da quelle potrebbero aver formato dei complessi.

In seguito alle prove di sintesi con l'acido gallico, è stato sviluppato, in via preliminare, un protocollo di sintesi di complessi di Cr(III) con tannini, a partire da soluzioni di $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ contenenti acido tannico, mirabolano e quebracho. In questo caso, dagli spettri di massa, non è stato possibile individuare segnali attribuibili alla formazione di complessi tra Cr(III) e tannini. Tuttavia l'utilizzo della resina XAD-4 come fase stazionaria ha permesso di separare il cromo che non ha interagito coi tannini dal resto delle specie presenti in soluzione. I risultati ottenuti suggeriscono che complessi tra Cr(III) e tannini eventualmente presenti in soluzione possano presentare tempi di

ritenzione confrontabili con quelli dei tannini liberi e la loro concentrazione potrebbe essere troppo bassa, rispetto a quella delle specie non coordinate, per essere individuati.

Per confermare l'ipotesi secondo cui i complessi di cromo(III) con tannini hanno tempi di ritenzione confrontabili a quelli dei tannini non coordinati, sono state inizialmente svolte alcune analisi HPLC-UV-DAD di soluzioni contenenti acetato di cromo(III) e acido tannico. Dopo aver identificato i tre picchi cromatografici attribuiti rispettivamente ad acetato di cromo(III), acido gallico e alle altre specie derivanti dall'idrolisi dell'acido tannico, sono state raccolte le frazioni che restituiscono i segnali attribuiti ad acido gallico e acido tannico. Queste sono state sottoposte ad analisi ICP-MS, al fine di verificare la presenza di cromo al loro interno. I risultati ottenuti hanno rivelato come la maggiore quantità di cromo, seppur in tracce, è presente nella frazione che contiene le specie derivanti dall'idrolisi dell'acido tannico. Questa evidenza è molto incoraggiante, in quanto supporta l'ipotesi secondo cui i tempi di ritenzione dei complessi tra Cr(III) e tannini sono paragonabili a quelli dei tannini liberi in soluzione.

Il lavoro svolto in questo progetto di Tesi, basato su sistemi modello, è preliminare allo sviluppo di una tecnica cromatografica per separare le specie all'interno delle acque reflue conciarie. I risultati ottenuti sono incoraggianti e indicano come l'utilizzo della cromatografia ad ultra-alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa sia un ottimo metodo per identificare le specie in soluzione e studiarne il comportamento. Inoltre, Le specie presenti nelle soluzioni delle diverse tipologie di tannini, identificate per la prima volta in questo lavoro di Tesi, rappresentano una base solida per riconoscere complessi di Cr(III) con tannini, difficilmente eliminabili dalle acque reflue conciarie.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 REAGENTI

<i>Reagenti</i>	<i>Formula</i>	<i>Densità (g/mL)</i>	<i>PM (g/mol)</i>	<i>produttore</i>
Acido tannico	C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆	-	1701.23	Sigma Aldrich
Acido gallico	C ₇ H ₆ O ₅	-	188.13	Fluka
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-	302.24	Sigma Aldrich
(+)-epicatechina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-	290.27	Sigma Aldrich
(-)-epicatechina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-	290.27	Sigma Aldrich
Acido laurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	-	200.32	Sigma Aldrich
Acido fumarico	C ₄ H ₄ O ₄	-	116.07	Sigma Aldrich
Acido ossalico	C ₂ H ₂ O ₄	-	90.03	Sigma Aldrich
Acido citrico	C ₆ H ₈ O ₇	-	192.12	Sigma Aldrich
Acido p-cumarico	C ₉ H ₈ O ₃	-	164.16	Sigma Aldrich
Acido succinico	C ₄ H ₆ O ₄	-	118.09	Sigma Aldrich
Acido caffeico	C ₉ H ₈ O ₄	-	180.16	Sigma Aldrich
Acido clorogenico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	354.31	Sigma Aldrich
Acido stearico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	284.48	Sigma Aldrich
Solfato di Potassio e Cromo(III)	KCr(SO ₄) ₂ ·12 H ₂ O	-	499.99	Riedel-De-Haen
Acido acetico	CH ₃ COOH	1.05	60.05	Sigma Aldrich
Acido Formico	CHOOH	1.22	46.03	Sigma Aldrich
Idrossido di Sodio	NaOH	-	40.00	Sigma Aldrich
metanolo	CH ₃ OH	0.79	32.04	Carlo Erba
Acetato di ammonio	CH ₃ COONH ₄	-	77.08	Carlo Erba
Acetonitrile	CH ₃ CN	0.78	41.05	Sigma Aldrich
Acido nitrico	HNO ₃	1.52	63.01	Sigma Aldrich
ammoniaca	NH ₃	-	17.03	Sigma Aldrich
Estratto di mirabolano	-	-	-	-
Estratto di quebracho	-	-	-	-
Estratto di tara	-	-	-	-

Estratto di gambier	di	-	-	-	-
Tannino di condensazione naftalen solfonico	di	-	-	-	-
Estratto di mimosa		-	-	-	-
Lignina solfonata mix		-	-	-	-
Lignina solfonata "bretax"		-	-	-	-
Tannino di condensazione 1,4-diidrossifenilsulfone	di	-	-	-	-
Estratto di castagno	di	-	-	-	-
Acetato di Cromo (III)		$[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$	-	639.35	-
Acido malonico		$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$	-	104.06	Sigma Aldrich

5.2 STRUMENTAZIONE

<i>Strumento</i>	<i>Produttore e caratteristiche</i>
UV-VIS	<i>Cary 100 Bio, Varian</i>
FT-IR	<i>Tensor 27, Bruker</i>
NMR	Brucker Avance 300 MHz
UHPLC-ESI-MS	Pompa: <i>Ultimate 3000 pump</i> , Thermo scientific Termostated column compartment: <i>Ultimate 3000 column compartment</i> , Thermo scientific ESI-MS: <i>Q-Exactive</i> , Thermo scientific Colonne: <i>XAD4</i> <i>PolymerX</i>
Ment: HPLC-UV-DAD	Pompa: <i>P680 HPLC pump</i> , Dionex Termostated column compartment: Detector UV: <i>PDA-100 Photodiode Array Detector</i> , Dionex Colonne: <i>XAD4</i> <i>PolymerX 5u RP-1 100A, 150x2 mm</i>
pH-metro	<i>Basic 20, Crison</i>
liofilizzatore	Lio 5P

5.3 ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA DI SOLUZIONI DI TANNINI

5.3.1 Preparazione della resina XAD4 per l'estrazione in fase solida

Come fase stazionaria per la tecnica SPE (Solid Phase Extraction) viene utilizzata la resina XAD-4 sotto forma di sfere di 250 µm di diametro. La resina viene lavata per 24 ore con un flusso di 1 mL/min in H₂O milliQ, essiccata e posta in metanolo. Al momento dell'utilizzo la resina, conservata in metanolo, viene impaccata nelle cartucce per SPE e lavata nuovamente in continuo con H₂O milliQ (1 mL/min) per 2 ore.

5.3.2 Estrazione in fase solida di soluzioni di tannini

Si prepara una soluzione 10^{-2} M di acido tannico e due soluzioni di mirabolano e quebracho al 5% m/m in H₂O milliQ. Le soluzioni così ottenute vengono eluite attraverso una cartuccia per SPE, preparata come descritto al paragrafo N.3.1. La parte ritenuta dalla resina viene eluita in controflusso con 50 mL di NaOH 0.1 M. Si ottengono così tre soluzioni che vengono diluite 1/10 in una miscela H₂O/MeOH 1/1 V/V e sottoposte a caratterizzazione ESI-MS (per iniezione diretta):

- a) soluzione madre;
- b) soluzione ottenuta dopo il passaggio della soluzione madre attraverso la cartuccia per SPE;
- c) soluzione ottenuta attraverso eluizione in controflusso della frazione ritenuta dalla resina.

La procedura viene ripetuta utilizzando 50 mL di CH₃CN per eluire in controflusso la frazione ritenuta dalla resina. La procedura di preparazione dei campioni è riportata in *Tabella 5*.

Tabella 5: dettagli della preparazione delle soluzioni di tannini.

<i>Soluzione madre</i>	<i>Procedura di preparazione</i>
Acido tannico 10^{-2} M	Sciogliere 4.2534 g di acido tannico in 250 mL di H ₂ O milliQ e porre la soluzione sotto agitazione per 2 ore.
Mirabolano 5% m/m in H ₂ O milliQ	Sciogliere 12.5 g di mirabolano in 250 mL di H ₂ O milliQ e porre la soluzione sotto agitazione per 2 ore. La soluzione viene poi centrifugata 10 minuti a 14000 r.p.m. per rimuovere il residuo solido.
Quebracho 5% m/m in H ₂ O milliQ	Sciogliere 12.5 g di mirabolano in 250 mL di H ₂ O milliQ e porre la soluzione sotto agitazione per 2 ore.

5.4 CARATTERIZZAZIONE DI TANNINI

5.4.1 Caratterizzazione HPLC-UV

Si preparano 4 soluzioni a 1000 ppm in H₂O milliQ delle seguenti specie: acido gallico, acido tannico, mirabolano e quebracho.

Vengono sciolti 0.1 g di ogni campione in 100 mL di H₂O milliQ e la soluzione viene posta sotto agitazione magnetica per 2 ore. Il campione di mirabolano

viene successivamente centrifugato 10 minuti a 14000 r.p.m. e filtrato per rimuovere il residuo solido. Le soluzioni così ottenute vengono analizzate con HPLC-UV. Condizioni e parametri usati per la caratterizzazione sono riportati in *Tabella 6*.

Tabella 6: condizioni e parametri usati per la caratterizzazione HPLC-UV.

<i>Fase stazionaria</i>	XAD-4
<i>Temperatura colonna</i>	40 °C
<i>λ rivelatori UV</i>	213 nm 276 nm
<i>Eluenti</i>	A) H ₂ O milliQ+Acido Formico 0.1% V/V B) Acetonitrile+Acido Formico 0.1% V/V
<i>Gradiente</i>	min 0-2 A=100% min 2-17 B da 0% a 100% min 17-19 B 100% min 19-20 B da 100% a 0% min 20-30 A 100% (ricondizionamento colonna)
<i>flusso</i>	1 mL/min

5.4.2 Caratterizzazione UHPLC-ESI-MS

Si prepara una soluzione a 1000 ppm sciogliendo 0.1 g di tannino in 100 mL di H₂O milliQ e agitando magneticamente per 2 ore. La miscela viene centrifugata per 10 minuti a 14000 r.p.m., filtrata e sottoposta ad analisi HPLC-ESI-MS e HPLC-ESI-MS² in modalità negativa. I tannini caratterizzati sono: Acido tannico, Mirabolano, Quebracho, Mimosa, Tara, Gambier, castagno, lignina solfonata mix, lignina solfonata “bretax”, tannino di condensazione 1,4-difenilsulfone, tannino di condensazione naftalensolfonico.

La colonna e le caratteristiche del metodo cromatografico utilizzato sono riportati in *Tabella 7*.

Tabella 7: condizioni e parametri usati per la caratterizzazione UHPLC-ESI-MS.

Fase stazionaria	XAD-4
Temperatura colonna	40 °C
Eluenti	A) H ₂ O milliQ+Acido Formico 0.1% V/V B) Acetonitrile+Acido Formico 0.1% V/V
Gradiente	min 0-2 A=100% min 2-17 B da 0% a 100% min 17-19 B 100% min 19-20 B da 100% a 0% min 20-30 A 100% (ricondizionamento colonna)
Flusso	1 mL/min
Spray Voltage	3.3 kV
Capillary Temperature	320 °C
Sheath Gas	40 au
Auxiliary Gas	20 au
Probe Heater Temperature	350 °C
S-Lens RF Level	60

*au=arbitrary units

5.5 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COMPLESSI DI Cr(III) CON ACIDO GALLICO E TANNINI

5.5.1 complessi di Cr(III) con Acido gallico

Durante l'internato di Laurea sono state realizzate due prove di sintesi di complessi di Cr(III) con acido gallico.

Prova n°1. Si sciolgono 0.0249 g di KCr(SO₄)₂·12H₂O e 0.0023 g di CH₃COONH₄ in 50 mL di H₂O milliQ e si lascia la soluzione sotto agitazione magnetica per 24 ore. Successivamente vengono sciolti 0.0085 g di acido gallico e la soluzione viene portata a pH=8.5 per aggiunta di NH₃ 3% V/V. La soluzione così ottenuta viene posta sotto agitazione per 6 ore, diluita 1/10 in H₂O milliQ e successivamente sottoposta ad analisi UHPLC-ESI-MS e

UHPLC-ESI-MS², in modalità sia positiva che negativa. le condizioni e i parametri dell'analisi sono descritti in *Tabella 8*.

Tabella 8: condizioni e parametri usati per la caratterizzazione UHPLC-ESI-MS.

<i>Fase stazionaria</i>	PolymerX
<i>Temperatura colonna</i>	20 °C
<i>Eluenti</i>	A) H ₂ O milliQ+Acido Acetico 0.1% V/V B) Acetonitrile+Acido Acetico 0.1% V/V
<i>Gradiente</i>	min 0-5 A 100% min 5-10 B da 0% a 75% min 10-15 B da 75% a 100% min 15-18 B 100% min 18-19 B da 100% a 0% min 19-30 A 100% (ricondizionamento colonna)
<i>flusso</i>	0.2 mL/min
<i>Spray Voltage</i>	4.0 kV
<i>Capillary Temperature</i>	300 °C
<i>Sheath Gas</i>	40 au
<i>Auxiliary Gas</i>	20 au
<i>Probe Heater Temperature</i>	350 °C
<i>S-Lens RF Level</i>	55

*au=arbitrary units

Prova n°2. Vengono sciolti 0.0255 g di acido gallico e 0.032 g di acetato di Cr(III) in 50 mL di H₂O milliQ. La soluzione viene posta sotto agitazione per 2 ore, diluita 1/10 in H₂O milliQ, portata a pH=8.5 per aggiunta di NH₃ 3% V/V e sottoposta ad analisi HPLC-ESI-MS e HPLC-ESI-MS², in modalità sia positiva che negativa. Condizioni e parametri dell'analisi sono descritti in *Tabella 9*.

Tabella 9: condizioni e parametri usati per la caratterizzazione UHPLC-ESI-MS.

<i>Fase stazionaria</i>	PolymerX
<i>Temperatura colonna</i>	20 °C
<i>Eluenti</i>	A) H ₂ O milliQ+Acido Acetico 0.1% V/V B) Acetonitrile+Acido Acetico 0.1% V/V
<i>Gradiente</i>	min 0-5 A 100% min 5-10 B da 0% a 75% min 10-15 B da 75% a 100% min 15-18 B 100% min 18-19 B da 100% a 0% min 19-30 A 100% (ricondizionamento colonna)
<i>flusso</i>	0.2 mL/min
<i>Spray Voltage</i>	4.0 kV
<i>Capillary Temperature</i>	300 °C
<i>Sheath Gas</i>	40 au
<i>Auxiliary Gas</i>	20 au
<i>Probe Heater Temperature</i>	350 °C
<i>S-Lens RF Level</i>	55

*au=arbitrary units

5.5.2 complessi di Cr(III) con tannini

Sono state preparate tre soluzioni a 1000 ppm in H₂O milliQ delle seguenti specie: acido tannico, mirabolano ,quebracho. Per ogni campione, vengono sciolti 0.1 g in 100 mL di H₂O milliQ e la soluzione viene posta sotto agitazione per 2 ore. Successivamente viene preparata una soluzione a 1000 ppm sciogliendo 0.2 g di KCr(SO₄)·12H₂O in 200 mL di H₂O milliQ. Le soluzioni di tannini vengono quindi diluite 1/30 con quella contenente KCr(SO₄)·12H₂O e vengono portate a pH=3 per aggiunta di Acido Formico 10% V/V. Le soluzioni così preparate vengono scaldate in stufa a 95 °C per 24 ore e sottoposte ad analisi UHPLC-ESI-MS in modalità negativa. Come riferimento sono state utilizzate le soluzioni madre di tannini, diluite 1/30 con H₂O milliQ e riscaldate a 95 °C per 24 ore. Condizioni e parametri dell'analisi sono descritti in *Tabella 10*.

Tabella 10: condizioni e parametri usati per la caratterizzazione UHPLC-ESI-MS.

<i>Fase stazionaria</i>	XAD-4
<i>Temperatura colonna</i>	40 °C
<i>Eluenti</i>	A) H ₂ O milliQ+Acido Formico 0.1% V/V B) Acetonitrile+Acido Formico 0.1% V/V
<i>Gradiente</i>	min 0-2 A=100% min 2-17 B da 0% a 100% min 17-19 B 100% min 19-20 B da 100% a 0% min 20-30 A 100% (ricondizionamento colonna)
<i>Flusso</i>	1 mL/min
<i>Spray Voltage</i>	3.3 kV
<i>Capillary Temperature</i>	320 °C
<i>Sheath Gas</i>	40 au
<i>Auxiliary Gas</i>	20 au
<i>Probe Heater Temperature</i>	350 °C
<i>S-Lens RF Level</i>	60

*au=arbitrary units

5.6 CARATTERIZZAZIONE HPLC-UV-DAD E ICP-MS DI SOLUZIONI CONTENENTI Cr(III) E ACIDO TANNICO

Vengono sciolti 0.5104 g di Acido tannico e 0.0639 g di Acetato di cromo in 100 mL di H₂O. La soluzione viene divisa in due aliquote da 50 mL; la prima viene portata a pH=3 per aggiunta di Acido Formico 10% V/V, la seconda a pH=8.5 con NH₃ 3% V/V. Le due aliquote vengono sottoposte ad analisi HPLC-UV-DAD. Le frazioni che restituiscono il segnale attribuito all'Acido Gallico e all'Acido Tannico vengono prelevate, liofilizzate, digerite in 0.5 g di HNO₃ per 1 ora, diluite in 9.5 mL di H₂O milliQ e sottoposte ad analisi ICP-MS. I parametri utilizzati per l'analisi HPLC-UV-DAD sono riportati in *Tabella 11*.

Tabella 11: condizioni e parametri usati per la caratterizzazione HPLC-UV-DAD.

<i>Fase stazionaria</i>	PolymerX
<i>Temperatura colonna</i>	20 °C
<i>λ lampade UV</i>	213 nm 276 nm
<i>λ DAD</i>	Da 200 nm a 800 nm
<i>Eluenti</i>	A) H ₂ O milliQ+Acido Acetico 0.1% V/V B) Acetonitrile+Acido Acetico 0.1% V/V
<i>Gradiente</i>	min 0-5 A 100% min 5-10 B da 0% a 75% min 10-15 B da 75% a 100% min 15-18 B 100% min 18-19 B da 100% a 0% min 19-30 A 100% (ricondizionamento colonna)
<i>Flusso</i>	0.2 mL/min

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Reich, G.; Leather. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2000**; p 621-659.
- (2) Leafe, M. K. *Leather Technologists Pocket Book*; Society of Leather Technologists and Chemists, **1999**.
- (3) Covington, A. D. *Tanning Chemistry: The Science of Leather*; Royal Society of Chemistry, **2009**.
- (4) Lofrano, G.; Meriç, S.; Zengin, G. E.; Orhon, D. Chemical and Biological Treatment Technologies for Leather Tannery Chemicals and Wastewaters: A Review. *Sci. Total Environ.* **2013**, 461–462, 265–281.
- (5) Durai, G.; Rajasimman, M. Biological Treatment of Tannery Wastewater - a Review. *J. Environ. Sci. Technol.* **2011**, 4 (1), 1–17.
- (6) Owlad, M.; Aroua, M. K.; Daud, W. A. W.; Baroutian, S. Removal of Hexavalent Chromium-Contaminated Water and Wastewater: A Review. *Water. Air. Soil Pollut.* **2009**, 200 (1–4), 59–77.
- (7) Tang, Y.; Zhao, J.; Zhou, J.; Zeng, Y.; Zhang, W.; Shi, B. Highly Efficient Removal of Cr(III)-Poly(Acrylic Acid) Complex by Coprecipitation with Polyvalent Metal Ions: Performance, Mechanism, and Validation. *Water Res.* **2020**, 178, 115807.
- (8) Serrano J.; Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects; *Molecular Nutrition Food Research*; **2009**; 53, 310-329.
- (9) Haslam, E. *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*; CUP Archive; **1989**; 1-223.
- (10) Khanbabaee, K.; Ree, T. van. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18 (6), 641–649.
- (11) Mueller-Harvey, I. Analysis of Hydrolysable Tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2001**, 91 (1–2), 3–20.
- (12) Haslam, E. Vegetable Tannins – Lessons of a Phytochemical Lifetime. *Phytochemistry* **2007**, 68 (22–24), 2713–2721.

- (13) Schofield, P.; Mbugua, D. M.; Pell, A. N. Analysis of Condensed Tannins: A Review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2001**, *91* (1–2), 21–40.
- (14) Shibata, T.; Kawaguchi, S.; Hama, Y.; Inagaki, M.; Yamaguchi, K.; Nakamura, T. Local and Chemical Distribution of Phlorotannins in Brown Algae. *J. Appl. Phycol.* **2004**, *16* (4), 291–296.
- (15) Vinklerek, Z.; Druska, M. V.; Kupec, J.; heterogeneous interaction between sulpho-syntans and collagen. part I: qualitative approach. *Journal of the society of leather technologists and chemists*; **1987**, *72*, 177-182.
- (16) Ammenn, J.; Huebsche, C.; Schilling, E.; Dannheim, B. Chemistry of Syntans and Their Influence on Leather Quality. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2015**, *110* (11), 349–354.
- (17) Lidong Y., Xihuai Q., Lu C., Bo C., Xinke W., Xiaohui W.; Preparation of a syntan containing active chlorine groups for chrome-free tanned leather. *Journal of cleaner production.* **2020**, *270*, 122351
- (18) Slabbert, N. Complexation of Condensed Tannins with Metal Ions. In *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*; Hemingway, R. W., Laks, P. E., Eds.; Basic Life Sciences; Springer US: Boston, MA, **1992**; pp 421–436.
- (19) .Ponce, A.; Brostoff, L. B.; Gibbons, S. K.; Zavallij, P.; Viragh, C.; Hooper, J.; Alnemrat, S.; Gaskell, K. J.; Eichhorn, B. Elucidation of the Fe(III) Gallate Structure in Historical Iron Gall Ink. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (10), 5152–5158.
- (20) .Liang, D.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, F.; Jiang, J. Behavior of Tannins in Germanium Recovery by Tannin Process. *Hydrometallurgy*, **2008**, *93* (3), 140–142.
- (21) Bacelo, H. A. M.; Santos, S. C. R.; Botelho, C. M. S. Tannin-Based Biosorbents for Environmental Applications – A Review. *Chem. Eng. J.* **2016**, *303*, 575-587.
- (22) Engström, M.; Understanding the Bioactivity of Plant Tannins: Developments in Analysis Methods and Structure-Activity Studies. **2016**.
- (23) Davy G.;Julie S.;Serge R.;Jean-Luc V.; Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry, *TrAC trends in analytical chemistry*, **2010**, *29*, 15-27
- (24) Skoog D. A.; Principles of Instrumental Analysis, 7th Edition. Cengage Learning, **2018**.

- (25) Cotton A. F.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th Edition. John Wiley & sons, **1999**.
- (26) Housecroft E. C.; *Inorganic Chemistry*, 5th Edition. Pearson, **2018**.
- (27) Rho, H.; Chon, K.; Park, J.; Cho, J. Rapid and Effective Isolation of Dissolved Organic Matter Using Solid-Phase Extraction Cartridges Packed with Amberlite XAD 8/4 Resins. *Water* **2019**, *11* (1), 67.
- (28) *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*; Simpson, N. J. K., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2000.
- (29) Maurice, P. A.; Pullin, M. J.; Cabaniss, S. E.; Zhou, Q.; Namjesnik-Dejanovic, K.; Aiken, G. R. A Comparison of Surface Water Natural Organic Matter in Raw Filtered Water Samples, XAD, and Reverse Osmosis Isolates. *Water Res.* **2002**, *36* (9), 2357–2371.
- (30) Wang, Y.-H.; Lin, S.-H. A Comparison of the Adsorption of Phenolic Compounds from Water in Column Systems Containing XAD Resins and Modified Clay. *Adsorpt. Sci. Technol.* **2003**, *21* (9), 849–861.
- (31) Bilgili, M. S. Adsorption of 4-Chlorophenol from Aqueous Solutions by Xad-4 Resin: Isotherm, Kinetic, and Thermodynamic Analysis. *J. Hazard. Mater.* **2006**, *137* (1), 157–164.
- (32) Tomás-Barberán, F. A.; Blázquez, M. A.; Garcia-Viguera, C.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. A Comparative Study of Different Amberlite XAD Resins in Flavonoid Analysis. *Phytochem. Anal.* **1992**, *3* (4), 178–181. (33) Green, N. W.; Perdue, E. M.; Aiken, G. R.; Butler, K. D.; Chen, H.; Dittmar, T.; Niggemann, J.; Stubbins, A. An Intercomparison of Three Methods for the Large-Scale Isolation of Oceanic Dissolved Organic Matter. *Mar. Chem.* **2014**, *161*, 14–19.
- (34) Dittmar, T.; Koch, B.; Hertkorn, N.; Kattner, G. A Simple and Efficient Method for the Solid-Phase Extraction of Dissolved Organic Matter (SPE-DOM) from Seawater: SPE-DOM from Seawater. *Limnol. Oceanogr. Methods* **2008**, *6* (6), 230–235.
- (35) Kardel, M.; Taube, F.; Schulz, H.; Schütze, W.; Gierus, M. Different Approaches to Evaluate Tannin Content and Structure of Selected Plant Extracts - Review and New Aspects. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2013**, *86*, 154–166.

(36) . Yang, B.; Kortesiemi, M.; Liu, P.; Karonen, M.; Salminen, J.-P. Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus Emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (35), 8672–8683.

(37) Ralph J., Lapierre C., Boerian W.; Lignin structure and its engineering. Current opinion on biotechnology, **2019**, *56*, 204-249.

(38) Klausen, K.; Mortensen, A. G.; Laursen, B.; Haselmann, K. F.; Jespersen, B. M.; Fomsgaard, I. S. Phenolic Compounds in Different Barley Varieties: Identification by Tandem Mass Spectrometry (QStar) and NMR; Quantification by Liquid Chromatography Triple Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry (Q-Trap). *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5* (3), 407-414