

*“Non è ammissibile che studiosi e scienziati,
anziché elaborare e confrontare nuove teorie
perdano le proprie ore come schiavi nelle fatiche del calcolo,
che potrebbe essere affidato a chiunque
se si potessero usare delle macchine...”*

G. W. Leibniz 1646 - 1716

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Le alghe <i>Sargassum muticum</i> e <i>Undaria pinnatifida</i>	1
1.2. Lo iodio nelle alghe	3
1.3. Strumentazione ICP-MS	5
1.3.1. Il nebulizzatore	6
1.3.2. La torcia al plasma	7
1.3.3. L'interfaccia	9
1.3.4. Il sistema di focalizzazione degli ioni	9
1.3.5. La cella di collisione	9
1.3.6. Il quadrupolo	10
1.3.7. Il detector	10
1.4. Il reattore a microonde	11
1.5. L'analisi elementare	12
1.6. Gli strumenti statistici	12
1.6.1. L'analisi della varianza	13
1.6.2. F-test	13
1.6.3. L. d. R. e L. d. Q.	13
1.6.4. Coefficiente di variazione percentuale	13
1.6.5. Analisi delle componenti principali	14
2. Scopo della tesi	15

Indice

3. Parte sperimentale	17
3.1. I reagenti	17
3.2. Descrizione delle zone di campionamento	17
3.3. Descrizione delle procedure di calibrazione	19
3.4. Descrizione delle procedure di trattamento dei campioni	19
3.5. Descrizione delle procedure sperimentali per il metodo di determinazione dello iodio totale	20
3.6. Procedura di digestione con microonde	21
3.7. Parametri operativi di ICP-MS e studio dell'effetto memoria dello iodio in ICP-MS	23
4. Metodo di analisi dello iodio totale	25
4.1. Effetto della digestione in reattore a microonde sui sali di iodio	27
4.2. Standardizzazione e confronto delle sensibilità di risposta dei sali di iodio alla misura ICP-MS	29
4.3. Studio dell'effetto del complessante dello iodio sulla misura ICP-MS	32
4.4. Confronto di metodi di digestione per la determinazione dello iodio in campioni algali	35
4.5. Analisi dei recuperi dello iodio sulla simil-alga e dell'effetto dell'aggiunta di AgNO ₃	37
5. Metodo di analisi degli elementi nelle acque e nelle alghe	41
5.1. Analisi degli elementi nelle acque lagunari	43
5.2. Analisi degli elementi nelle alghe lagunari	50
6. Conclusioni	61
Bibliografia	63

1. Introduzione

1.1. Le alghe *Sargassum muticum* e *Undaria pinnatifida*

Negli ultimi 20 anni è stata documentata la presenza di alghe brune delle specie *Sargassum muticum* (SM) e *Undaria pinnatifida* (UP), nella laguna di Venezia tra le circa 250 specie presenti.^{1,2} La laguna veneziana è un sistema chiuso di coste sabbiose, connesso al Mar Adriatico, attraversato da canali naturali e artificiali. La salinità è compresa tra 18.5 ‰ e 35.9 ‰,³ intervallo piuttosto ampio caratteristico delle zone lagunari; questo ambiente è risultato favorevole all'insediamento delle specie algali alloctone prese in esame in questa tesi, tanto da diventare invasive per le specie autoctone presenti nella laguna.²

Undaria pinnatifida è un'alga bruna originaria dei mari di Cina, Corea e Giappone, paesi nei quali viene coltivata per fini alimentari in migliaia di tonnellate di peso umido all'anno.² In Europa è stata documentata già a partire dagli anni '80, dal gruppo di Pérez *et al.* in Francia, per poi essere segnalata nel 1992 a Chioggia, successivamente nel Canale della Giudecca e in altre zone lagunari.^{2,4} Il tallo di UP è costituito da una parte basale che raggiunge un diametro di 10 cm con cui aderisce al substrato solido, dallo stipite, dalla fronda che è attraversata longitudinalmente da quella che appare come una spessa nervatura centrale.² Gli sporofiti possono essere di grandezza diversa in base al grado di sviluppo, alla loro esposizione alla corrente e alla densità di popolamento del substrato sul quale aderiscono, possono variare da 30–40 cm a 2 m.²

Sargassum muticum è anch'essa un'alga bruna proveniente dai mari di Cina, Giappone, Corea e Russia. Si sviluppa in un'isola della Gran Bretagna all'inizio degli anni '70 per poi essere segnalata a Chioggia nel 1992, come UP.² Dall'anno 2000 si è osservato un rapido sviluppo della specie SM in tutta la laguna veneziana.² SM è composta da un tallo ramificato sul quale si trovano piccole vescicole per il galleggiamento suddivise su numerose ramificazioni; generalmente raggiunge una lunghezza di 2–3 m ma può arrivare a misurare 7–8 m se si trova in una zona scarsamente popolata.²

Introduzione

Il fatto che siano stati rilevati i primi talli nella zona di Chioggia, in cui sono situati diversi allevamenti di molluschi, suggerisce che la loro importazione dai mari di Cina e Giappone, in particolare dell'ostrica giapponese della specie *Crassostrea gigas*, può aver contribuito in larga parte alla radicazione di queste specie algali,^{2,5,6} I talli sono poi stati segnalati nel Canale della Giudecca, zona di passaggio marittimo molto trafficata, questo avvalorata la tesi che l'importazione e lo sviluppo possono essere avvenute proprio attraverso le imbarcazioni che fungono da substrato temporaneo per gli sporofiti.²

Le alghe prese in esame vengono indicate per molti usi, tra questi, quello alimentare e farmaceutico, esse infatti sono ricche in polisaccaridi, minerali e vitamine, lipidi e polifenoli con proprietà antibatteriche, antivirali e antifungine.^{7,8} Recentemente sono stati fatti studi su un carotenoide estratto principalmente da UP, la fucoxantina,⁸ che ha evidenziato attività interessanti come quella di protezione del fegato, dei vasi sanguigni del cervello, ossa, pelle, occhi e attività di anti-obesità.⁹ Le alghe brune vengono anche prese in considerazione per l'estrazione di alginati utilizzati nell'industria farmaceutica per produrre gel, strati sottili e stabilizzanti.

Queste specie algali, negli ultimi anni, sono anche state utilizzate come fertilizzanti (dal Decreto Legge 217 dell'Aprile 2009).²

Studi hanno dimostrato che le alghe, come altri organismi acquatici, hanno la capacità di concentrare nel tallo gli elementi presenti nell'acqua in cui vivono;^{10,11} essi descrivono infatti, come i metalli riescano ad attraversare la membrana cellulare e quella plasmatica per poi diffondersi all'interno della cellula: i metalli, per fare ciò, vengono complessati da specie legate a proteine selettive nei confronti del doppio strato lipidico e rilasciate come complessi piuttosto labili all'interno del citosol.¹¹ Altri studi invece, considerano l'ingresso degli ioni metallici attraverso canali proteici disposti trasversalmente alle membrane lipidiche, si ha quindi l'interazione tra il metallo e la superficie idrofilica che riveste i pori.¹¹ La concentrazione di metalli all'interno delle alghe può arrivare anche fino a centinaia di volte quella in acqua. Per questo motivo, la capacità delle alghe di concentrare metalli può essere sfruttata per studiare i siti nei quali esse vivono e utilizzarle come bioindicatori delle acque marine, lagunari e dolci.¹² Anche *Undaria pinnatifida* ha dimostrato negli ultimi anni buone capacità di accumulo di metalli, metalloidi¹ e inquinanti organici contaminanti la Laguna. Non ci sono invece ancora informazioni approfondite sul

comportamento della specie *Sargassum muticum* che si trova esposta maggiormente in superficie, studi ne riportano l'affinità per gli inquinanti organici e altre specie disciolte.¹³

1.2. Lo iodio nelle alghe

Lo iodio è un elemento che si trova in piccole quantità nel corpo umano, circa 10 – 15 mg,¹⁴ ma svolge un'attività di massima importanza per lo sviluppo e la vita dell'essere umano e animale in genere.¹⁵ Esso si trova per il 79-90% concentrato nella tiroide, ghiandola endocrina posta alla base del collo che produce ormoni quali la tiroxina e la triiodotironina, contenenti iodio.¹⁴ Questi ormoni fanno parte di molti processi metabolici delle cellule e svolgono ruoli di importanza primaria per quanto riguarda la crescita e lo sviluppo di interi organi.¹⁵ La deficienza di iodio si esplica in patologie importanti quali l'ipotiroidismo, comunemente chiamato gozzo, nel quale v'è un ingrossamento evidente della tiroide per supplire alla mancanza di iodio indispensabile per la produzione degli ormoni tiroidei; carenze più gravi possono portare a disturbi irreversibili, tra questi, danni al sistema nervoso centrale.¹⁵ Le carenze di iodio devono essere evidenziate anche in gravidanza, in quanto possono provocare malformazioni congenite al nascituro soprattutto a carico del sistema nervoso centrale.¹⁶ Anche l'assunzione in quantità elevate di iodio provoca, in determinati soggetti, disfunzioni a livello tiroideo, quali l'ipotiroidismo e l'ipertiroidismo.¹⁶ Le patologie tiroidee sono di grande impatto sulla salute della popolazione tanto da far istituire al Ministero Superiore di Sanità, un Osservatorio Nazionale per il Monitoraggio della Iodoprofilassi in Italia con la legge n. 55 del 21 Marzo 2005: " Disposizioni finalizzate alla prevenzione del gozzo endemico e di altre patologie da carenza iodica", che prevede la messa in atto di una serie di misure atte a favorire il consumo di sale iodato tra la popolazione e il controllo delle patologie strettamente legate a problemi tiroidei.¹⁷

Lo iodio viene introdotto nel corpo con l'alimentazione, in particolare con pesce e crostacei (a partire da 2 ppb) ma anche con la carne (50 ppb), il latte (circa 30 ppb) e le uova (93 ppb).¹⁸ In media una persona adulta dovrebbe assumere circa 150 µg di iodio al giorno,¹⁶ studi hanno dimostrato che la popolazione in media non raggiunge questa soglia ma,¹⁵ in altri casi, con l'assunzione di integratori, soprattutto

a base di alghe, la quantità ingerita potrebbe essere addirittura eccessiva, tanto da aggravare patologie esistenti in individui già affetti da disturbi tiroidei.

Anche per questo si è studiato un metodo che possa analizzare la quantità di iodio all'interno di campioni organici, per evidenziarne la carenza o l'eccesso.

Studi hanno riportato che, al di là di quanto comunemente si credeva, la quantità di iodio nelle specie d'alga presenti nei mari di tutto il mondo è profondamente diversa. Xhialin Hou *et al.* hanno evidenziato infatti differenti concentrazioni di iodio totale in vari campioni d'alga ad esempio, su peso secco, in *Sargassum vachellianum* ne sono stati riscontrati 5939 ppm, in *Laminaria japonica* 340 ppm, in *Ulva pertusa* al contrario 1.67 ppm.^{19,20} Tra le specie di alghe, le brune sono quelle che presentano la maggior concentrazione in iodio, decrescendo si trovano le alghe rosse e successivamente quelle verdi, delle quali fa parte *Ulva pertusa*.¹⁹ Nelle alghe, lo iodio presente è come ioduro in percentuali che vanno dal 65% al 92% in base alla specie, come iodato per percentuali comprese nell'intervallo 1.4% - 4.5% e infine come iodio in forma organica legato ad amminoacidi quali mono-iodo-tirosina (MIT) e di-iodo-tirosina (DIT) dal 5 al 37%.²⁰

Molte sono le tecniche analitiche utilizzate per determinare lo iodio totale nei diversi tipi di campioni, in particolare quelli organici come ad esempio: voltammetria di stripping catodico con limite di determinazione di 0.1 ppb;²¹ la spettrometria di fluorescenza ai raggi X,²² con cui si è determinato lo iodio totale nell'ordine dei ppm in matrici organiche; analisi radiochimica di attivazione neutronica (RNAA),²³ con la quale si è determinato lo iodio totale in tracce in campioni non organici. Altri metodi utilizzati sono: spettrometria di assorbimento molecolare ad alta risoluzione in sorgente continua, analisi di ioduro di bario in fornello di grafite, che mostra un L.d.Q di 60 ppb;²⁴ spettrometria di emissione atomica accoppiata induttivamente ad una sorgente al plasma (ICP-AES). Altri metodi permettono invece la speciazione dello iodio, tra questi si ricordano la cromatografia ionica (IC) collegata ad un ICP-MS²⁵ e l'elettroforesi capillare²⁶ che permettono di quantificare ioduri e iodati; la gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), dopo derivatizzazione per rendere gli analiti sufficientemente volatili²⁷. Rispetto a tutte le tecniche citate, l'ICP-MS risulta essere la miglior scelta in quanto ad ampiezza dell'intervallo di linearità e bassi limiti di quantificazione; essa permette inoltre la risoluzione tra le specie isotopiche.²⁸

Per la determinazione dello iodio nei campioni, oltre alla scelta della tecnica da utilizzare vi è anche quella del metodo di digestione in quanto in letteratura si trovano diversi protocolli e la loro scelta influisce sul risultato della procedura analitica.²⁹⁻³³

1.3. La strumentazione ICP-MS

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) si sviluppa a partire dagli anni '80 per subire quindi una rapida diffusione negli ultimi trent'anni, basti pensare che al 2003 erano presenti circa 5000 ICP-MS installati in tutto il mondo.³⁴ Questa tecnica viene utilizzata per analisi in diversi campi quali, quello geologico, biologico, bio-medico, medico, chimico e in quello forense, per i suoi numerosi vantaggi: la velocità d'analisi, bassi limiti di rivelabilità, elevata selettività, buona precisione e accuratezza,³⁵ capacità di distinguere isotopi dello stesso elemento. Si basa sull'atomizzazione e la ionizzazione del campione nella torcia al plasma e la successiva separazione degli ioni operata da uno spettrometro di massa, un quadrupolo.

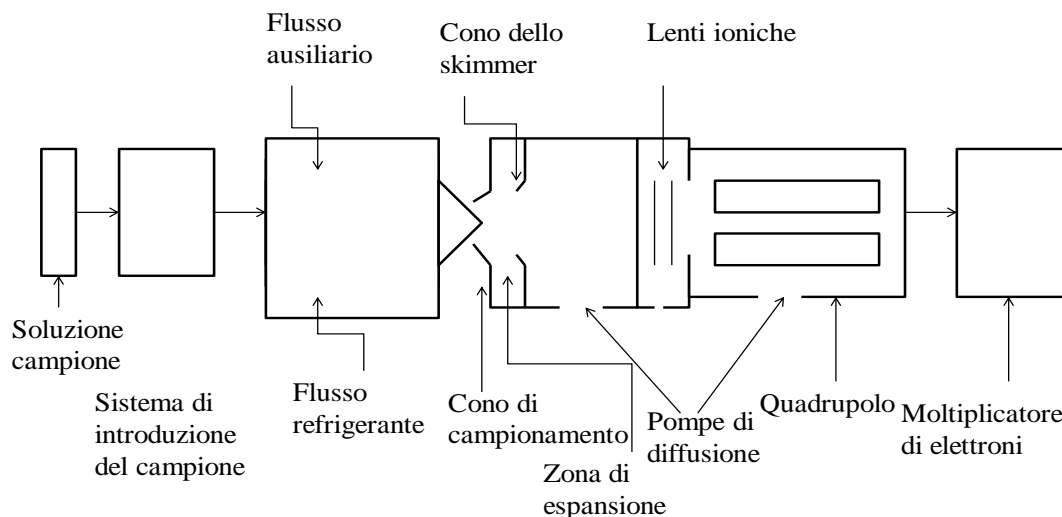


Figura 1. Schema riassuntivo di uno strumento ICP-MS.

In Figura 1 è riportato lo schema riassuntivo di uno strumento ICP-MS. Il campione viene introdotto nello strumento tramite un apposito sistema che permette di ottenere un aerosol da miscelare al gas scelto. Il flusso prodotto esce dal condotto per entrare

Introduzione

nella torcia al plasma;³⁴ qui il campione subisce atomizzazione e ionizzazione. Gli ioni prodotti vengono confluiti in un cono di campionamento di nichel ad aspirazione differenziale, che presenta al centro di esso un piccolo orificio di diametro inferiore ad 1.0 mm. Il plasma, quindi, si raffredda, a causa della repentina diminuzione della pressione: da quella atmosferica presente nella torcia al plasma a quella della zona di espansione di circa 1 torr, mantenuta tale da una pompa meccanica posta dopo il cono di campionamento; il campione quindi raggiunge il cono dello skimmer in una zona provvista di pompa turbomolecolare a 10^{-6} Torr.³⁴ Il cono, che funge da scrematore, provvede a separare i cationi dalle altre specie che si sono formate nel plasma applicando un potenziale negativo, questi vengono focalizzati sull'orificio d'ingresso al quadrupolo da lenti ioniche magnetiche.³⁵ L'accoppiamento tra la torcia e il quadrupolo, soprattutto a causa della diversa pressione di lavoro, risulta la parte più complessa e delicata dello strumento ICP-MS.³⁵ Il quadrupolo funge da analizzatore di massa ed è collegato infine ad un moltiplicatore di elettroni che amplifica il segnale da trasmettere ad un personal computer.

1.3.1. Il nebulizzatore

L'introduzione del campione all'interno dello strumento si presenta come uno dei punti critici del processo d'analisi. Durante questa fase il campione subisce due trattamenti: la generazione dell'aerosol utilizzando un nebulizzatore e la selezione delle gocce mediante l'attraversamento di una camera di nebulizzazione.³⁵

Inizialmente il campione viene aspirato dalla falcon in cui è stato preparato, con una piccola pompa peristaltica, essa garantisce indipendentemente dalle differenze di viscosità tra il campione, gli standard e il bianco, un flusso costante di liquido.³⁴ Il campione viene quindi fatto entrare nel nebulizzatore che provvede a rompere le gocce iniziali in piccole goccioline utilizzando l'azione pneumatica di un flusso di gas di circa 1 L/min, tanto da formare un aerosol.³⁴

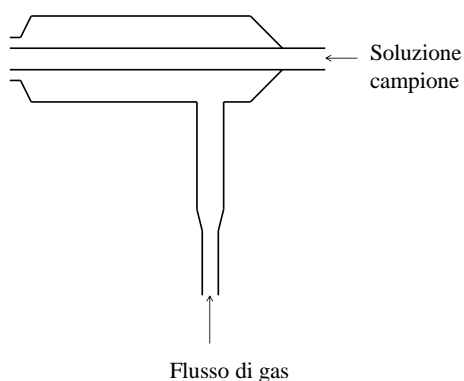


Figura 2. *Rappresentazione schematica di un nebulizzatore concentrico*

L'aerosol prodotto viene quindi inviato in camera di nebulizzazione che seleziona le goccioline della dimensione adatta ad essere inviate nella torcia, generalmente con diametro inferiore a $10\ \mu\text{m}$, le altre per gravità cadono nel tubo di drenaggio.³⁴

1.3.2. La torcia al plasma

La torcia è una componente fondamentale della strumentazione ICP-MS, ne è la sorgente, si trova tra il nebulizzatore e il cono campionatore come è possibile vedere nello schema in Figura 3. Con plasma si identifica una miscela gassosa conduttrice di elettricità che contiene in sé quantità rilevanti di cationi ed elettroni tanto da formare carica netta vicina allo zero. Viene ora riportata una rappresentazione schematica della torcia presente in ICP-MS.

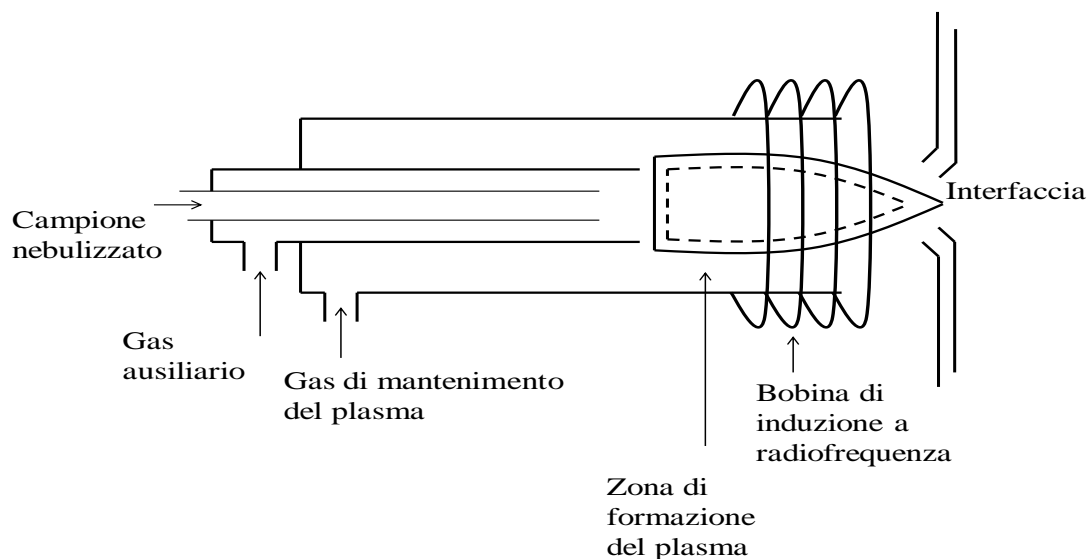


Figura 3. Rappresentazione schematica di una torcia al plasma ICP-MS.

La torcia, come si può vedere in Figura 3, è composta da tre tubi concentrici di quarzo.³⁴ Nel fascio di tubi passa un flusso di Ar di 12-17 L/min; nel condotto centrale scorre l'aerosol proveniente dal nebulizzatore.³⁴ All'estremità della torcia, dal lato del cono campionatore, avvolta attorno al tubo più esterno si trova una bobina di induzione raffreddata ad acqua ed alimentata da un generatore di radiofrequenze che, per gli strumenti commerciali, lavora a 40.68 MHz, frequenza alla quale si ottiene la migliore efficienza di accoppiamento tra la bobina e il plasma.³⁵ La ionizzazione del flusso di gas, grazie alla quale si ottiene il plasma desiderato, avviene in seguito alla produzione di una scintilla da una bobina Tesla (dispositivo adatto a produrre correnti elettriche a tensioni e frequenze molto elevate); che interagendo con il gas presente subisce un riscaldamento ohmico. Il plasma ottenuto è in grado quindi di ionizzare la maggior parte degli elementi presenti in natura. Il tubo esterno di quarzo è isolato termicamente da un flusso di Ar tangenziale che permette anche di centrare il plasma oltre a mantenere temperatura sufficientemente alta.³⁵

1.3.3. L'interfaccia

L'interfaccia che si trova tra il plasma prodotto dalla torcia e la cella di collisione, deve favorire un efficiente trasporto degli ioni che, dal plasma a pressione atmosferica, arrivano allo spettrometro di massa lavorante ad una pressione dell'ordine di 10^{-6} Torr.³⁴

L'interfaccia è composta da due coni di nichel o di altro materiale inerte alle elevate temperature e all'ambiente acido; il primo che viene raggiunto dal campione proveniente dalla torcia è chiamato cono di campionamento, il secondo è il cono dello skimmer, questa zona è mantenuta alla pressione di circa 1 Torr.

1.3.4. Il sistema di focalizzazione degli ioni

Il sistema di focalizzazione degli ioni ha due scopi: il primo è quello di focalizzare gli ioni nella cella di collisione mantenendoli il più possibile coerenti con quelli formati nel plasma, il secondo è l'eliminazione delle particelle neutre e dei fotoni che arrivano dal plasma e che hanno attraversato i coni.³⁴ Il sistema è a carico di cilindri, barre o piatti metallici carichi, è fondamentale in quanto screma ciò che arriverà successivamente al rivelatore. Questa zona dello strumento è pressurizzata da una pompa turbomolecolare per ottenere pressione interna di 10^{-3} Torr.

1.3.5. La cella di collisione

La cella di collisione è costituita da un ottupolo. Essa ha la principale funzione di eliminare le interferenze dovute alla presenza di ioni poliatomici formati nel plasma all'incontro con l'argon, come ad esempio $^{40}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{ArH}^+$ che interferiscono rispettivamente con $^{40}\text{Ca}^+$ e $^{39}\text{K}^+$.³⁴ L'ottupolo lavora in radiofrequenze che servono a focalizzare il fascio di ioni anziché selezionarli solamente in base alla massa.

1.3.6. Il quadrupolo

Lo strumento *Agilent ICP-MS 7700x* utilizzato in questo studio, è dotato di un quadrupolo iperbolico come analizzatore di massa; in esso arrivano gli ioni uscenti dalla cella di collisione.

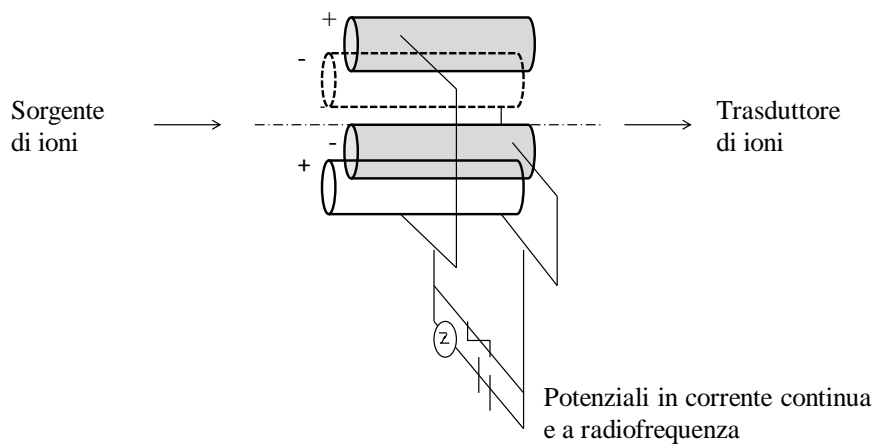


Figura 4. Rappresentazione schematica di un quadrupolo.

Il quadrupolo, è composto da quattro barre cilindriche disposte parallelamente, oppure iperbolicamente, che hanno la funzione di elettrodi.³⁵ Esse sono collegate elettricamente fra loro a coppie opposte, una delle due in corrente continua al polo positivo e l'altra al polo negativo; entrambe le coppie di barre sono collegate anche in corrente alternata con potenziale variabile a radiofrequenza. Questa sovrapposizione di campi che si viene a formare tra le barre, permette di selezionare gli ioni, in base al rapporto m/z , che riusciranno ad attraversarle e arrivare al trasduttore, gli altri si scaricheranno sulle barre.³⁵

1.3.7. Il detector

Il detector presente nello strumento è un moltiplicatore di elettroni a dinodi separati, è utilizzato per la raccolta e la conversione degli ioni positivi in segnale elettrico. Il moltiplicatore di elettroni è provvisto di un catodo e di molti dinodi

aventi superfici di Cu/Be dai quali vengono emessi elettroni a valanga successivamente la collisione con essi di ioni ad alta energia. Gli elettroni prodotti vengono quindi attratti dal dinodo successivo che si trova a potenziale più elevato e la sua superficie, colpita da gli elettroni prodotti emetterà a sua volta elettroni a valanga. In uscita dal moltiplicatore di elettroni la corrente può essere ampliata fino a 10^6 volte.³⁵

1.4. Il reattore a microonde

Il mineralizzatore CEM è uno strumento di ultima generazione per quanto riguarda i reattori a microonde. Può processare un gran numero di campioni di diversa natura.

Il mineralizzatore è composto da:

- Campionatore automatico da 48 posizioni.
- Cavità di introduzione delle fiale portacampioni dotata di un generatore di campo magnetico a microonde.
- Sistema di irraggiamento e raffreddamento POWERMax™ brevettato CEM.
- Sistema di controllo della temperatura non invasivo.
- Controllo di pressione ActiVent™.
- Agitazione elettromagnetica a velocità variabile
- Vials di Pyrex e camicia protettiva in polimero estraibile.

Il campionatore automatico è un modulo robotizzato che permette di spostare le fiale contenenti i materiali da trattare dal portacampioni alla cavità microonde e viceversa. Le fiale in uso possono essere di Pyrex o quarzo, le prime sono dotate di guaina in polimero estraibile da utilizzare nel momento in cui si voglia evitare l'inquinamento del campione da parte della fiala stessa o in caso di utilizzo di acido fluoridrico; possono essere di diversa grandezza da 10 ml a 35 ml. La cavità in cui viene introdotta la fiala con il campione ha una forma ottimale per ospitare il campo magnetico prodotto da un generatore di potenza 300 W.

Il riscaldamento a microonde sfrutta la capacità di alcuni composti di trasformare l'energia elettromagnetica in calore.³⁶ La propagazione dell'energia è prodotta dalla perdita dielettrica a differenza del riscaldamento convenzionale che avviene per conduzione o convezione.³⁶ Per quanto riguarda il riscaldamento dovuto alle

microonde, la quantità di calore prodotto dipende dalle proprietà dielettriche delle molecole, cosa che non avviene per il riscaldamento convenzionale. L'irradiazione con le microonde è rapida e volumetrica e riscalda il campione nel suo complesso simultaneamente a differenza del riscaldamento tradizionale in cui si viene a formare un gradiente di temperatura.³⁶ Si è utilizzato un reattore chiuso, a pressione controllata, per ottenere riscaldamento più efficiente. Il calore causa un aumento della pressione dovuto all'evaporazione dell'acido utilizzato per la digestione, il gas evapora durante la decomposizione della matrice organica, ciò provoca un aumento del punto di ebollizione dei reagenti favorendo il processo di digestione.³⁷ La pressione è controllata per evitare la rottura della fiala contenente i campioni, infatti sono previsti degli sfiati durante il trattamento.³⁷

La digestione di campioni organici in reattore al microonde è una delle tecniche più utilizzate per ottenere un'efficiente decomposizione della matrice e la solubilizzazione degli analiti.³⁷

1.5. L'analisi elementare

L'analisi di carbonio, idrogeno, zolfo e azoto viene effettuata per combustione. Si basa sulla "combustione dinamica a flash", tecnica che prevede l'introduzione del campione in un condotto riscaldato a circa 1000 °C con flusso di elio arricchito di ossigeno. Viene innescata la combustione grazie alla fusione del contenitore nel quale è il campione. La miscela di gas prodotti dalla combustione viene poi fatta passare attraverso un catalizzatore che rende il processo di ossidazione quantitativo. Infine l'anidride carbonica, l'azoto elementare, l'anidride solforosa e l'acqua vengono separati in una colonna cromatografica e poi determinati.³⁸

1.6. Strumenti statistici

1.6.1. Analisi della varianza

L'analisi della varianza (Analysis of variance – ANOVA) è una tecnica statistica che permette di separare la variabilità totale trovata in due componenti: il

fattore casuale e quello sistematico. Il primo non ha influenza sul set di dati a differenza del secondo. L'analisi della varianza quindi definisce se i fattori identificati contribuiscono stasticamente alla variabilità dei dati.

1.6.2. F-test

Un test d'ipotesi è uno strumento statistico utilizzato per verificare un'ipotesi, ossia un'affermazione riguardante fenomeni reali, che si presta ad essere smentita o confermata. È necessario per questo definire, oltre all'ipotesi, un livello di significatività, ossia la percentuale di incertezza accettabile nella valutazione della veridicità dell'ipotesi, e la statistica del test, che permette di calcolare il criterio di decisione secondo il quale determinare se accettare o no l'ipotesi di partenza.

L'F-test è un test d'ipotesi che si basa sulla distribuzione F di Fisher-Snedecor utile a verificare l'ipotesi che due popolazioni, entrambe distribuite normalmente, abbiano la stessa varianza.

1.6.3. L.d.R. e L.d.Q

L.d.R è l'acronimo di Limite di Rivelabilità, ossia è la concentrazione minima di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco.

L.d.Q. è utilizzato per Limite di Quantificazione, ossia la concentrazione minima di analita che può essere quantificata con quel determinato metodo d'analisi.

Questi sono determinati con il metodo di Hubaux-Vos.³⁹

1.6.4. Coefficiente di variazione percentuale

Il coefficiente di variazione percentuale (CV%) è determinato con:

$$CV\% = \frac{s}{media} 100 \qquad \text{Eq. 1}$$

s = deviazione standard calcolata sulla media delle misure effettuate

media = concentrazione media dell'elemento analizzato

1.6.5. Analisi delle componenti principali

L'analisi delle componenti principali (Principal Component Analysis - PCA) viene utilizzata per rappresentare i dati quando questi sono in quantità elevate.⁴⁰ Essa si pone infatti con uno strumento per trasformare l'agglomerato delle osservazioni in una struttura più semplice ma informativa quasi quanto quella di partenza. Per ottenere ciò, si ricorre all'individuazione delle Componenti Principali (PC) ossia "le combinazioni lineari, tra loro indipendenti, delle variabili la cui varianza complessiva eguagli quella osservata".⁴⁰ Le PC di un insieme di dati identificano in sequenza, la combinazione lineare delle variabili osservate che estrae il massimo di variabilità dalla matrice di varianze originali. La prima componente principale è dunque la combinazione che estrae il massimo di variabilità; la seconda è la combinazione, non correlata con la prima, che estrae il massimo della variabilità residua e così successivamente tutte le altre.⁴⁰

2. Scopo della tesi

In questo lavoro di tesi affrontiamo lo studio della composizione di specie algali alloctone campionate nella laguna di Venezia. L'insediamento negli ultimi anni delle alghe *Sargassum muticum* e di *Undaria pinnatifida* ha prodotto un cambiamento significativo dell'ecosistema della Laguna, catalizzando l'attenzione sul possibile utilizzo di queste alghe come biomassa, come fertilizzanti e nell'ambito alimentare e farmaceutico.

Per poter valutare il potenziale utilizzo di queste alghe è stato necessario conoscere alcuni aspetti analitici riguardanti la loro composizione sia in termini di metalli potenzialmente tossici sia in termini di non metalli come lo iodio che assume un ruolo fondamentale nella dieta alimentare. L'analisi completa del contenuto di elementi nelle alghe può essere sfruttata anche per studiare i siti nei quali esse vivono e utilizzarle come bioindicatori delle acque marine, lagunari e dolci. L'interpretazione chimica-biologica della composizione algale sarà affidata al lavoro del gruppo di biologia dell'Università di Padova con il quale abbiamo stretto una collaborazione scientifica.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quindi finalizzato alla messa a punto di una procedura analitica per la determinazione dello iodio totale e di una ulteriore procedura per riuscire a determinare il maggior numero di elementi con recuperi compresi tra il 90% e il 110%. A fianco all'ottimizzazione delle procedure analitiche, si useranno alcuni strumenti statistici come l'analisi delle componenti principali per semplificare la rappresentazione di 60 campioni di alghe brune da uno spazio a 54 variabili (concentrazioni degli elementi) a uno a due variabili (la prima e la seconda componente principale). Inoltre la composizione algale sarà confrontata con quella determinata nell'acqua campionata nelle stesse zone per poter comprendere se esistono delle potenziali correlazioni.

3. Parte sperimentale

3.1. I reagenti

I reagenti utilizzati sono acido nitrico 69 %p/p, “ARISTAR” for trace analysis (codice prodotto 450042N, batch K43187145 206); acqua milli Q; acido cloridrico ≥ 37 %p/p, “ALDRICH”.

Standard multielemento:

CLPP-CAL-1, “INORGANIC VENTURES”, che contiene gli elementi: Ca, K, Mg, Na in concentrazione 5000 $\mu\text{g/ml}$, Al, Ba, in 2000 $\mu\text{g/ml}$, Fe in 1000 $\mu\text{g/ml}$, Co, Mn, Ni, V, Zn in 500 $\mu\text{g/ml}$, Ag, Cu a 250 $\mu\text{g/ml}$, Cr^{3+} a 200 $\mu\text{g/ml}$, Be a 50 $\mu\text{g/ml}$, numero lotto E2-MEB399058, (identificato con CLPP) in matrice di acido nitrico 5%; CCS-5, “INORGANIC VENTURES”, che contiene gli elementi: B, Ge, Hf, Mo, Nb, P, Re, S, Sb, Si, Sn, Ta, Ti, W, Zr in concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$ numero lotto E2-MEB348076, in matrice di HF 1.2 % (v/v) e HNO_3 7.43 % (v/v) (identificato con CCS); IV-ICPMS-71A, “INORGANIC VENTURES”, Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr₃, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ho, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Ni, P, Pb, Pr, Rb, S, Se, Sm, Sr, Th, Tl, Tm, U, V, Yb, Zn in concentrazione 10 $\mu\text{g/ml}$, numero lotto F2-MEB419012; soluzione standard multielemento (identificato con IV);

KIO_3 iodato di potassio 99.995% trace metalsbasis “ALDRICH”; KI ioduro di potassio ≥ 99.5 % “FLUKA”; 3-iodo-L-tirosina (MIT), impurità 5% di tirosina; “ALDRICH” ; 3,5-diiodo-L-tirosina (DIT) “ALDRICH”, KBr potassio bromuro 99.5% “Carlo Erba”; KBrO_3 bromato di potassio ≥ 99.8 % “ALDRICH”.

3.2. Descrizione delle zone di campionamento

I campioni sono stati prelevati da punti diversi della laguna di Venezia, evidenziati in Figura 5. Le zone sono state scelte in base al tipo di popolamento presente; si è utilizzato uno studio condotto nel 2009 sulla distribuzione degli sporofiti di alga *U. pinnatifida* e *S. muticum*.²

Parte sperimentale

Nelle sei zone sono stati raccolti cinque campioni di ogni specie e sono stati prelevati due campioni d'acqua lagunare.

Le zone identificate sono:

Zona A: darsena Sacca della Misericordia. Si trova a nord-est del Sestriere Cannaregio rivolta verso l'isola di Murano. Funge da porto per diversi tipi di imbarcazione. Consiste in un'insenatura artificiale.

Zona B: Arsenale di Venezia. È un'insenatura, a sud vi è l'isola di San Pietro. Fino all'inizio del secolo scorso veniva utilizzata come porto e sede della Marina Militare. Attualmente è di proprietà del comune di Venezia che ha avviato operazioni di riqualificazione.

Zona C: a sud dell'isola di Sant'Elena su Canale San Marco. Vi è intenso traffico di navi.

Zona D: situata a lato di Sacca della Fisola più precisamente sul lato di Calle Scuola.

Zona E: ad ovest del Sestriere Cannaregio compresa tra Canale di San Secondo e Canale Colombuola, si trova dalla parte di via Libertà, ponte che collega Venezia alla terraferma.

Zona F: sul Canale delle Fondamenta Nuove si trova adiacente all'Ospedale Civile.

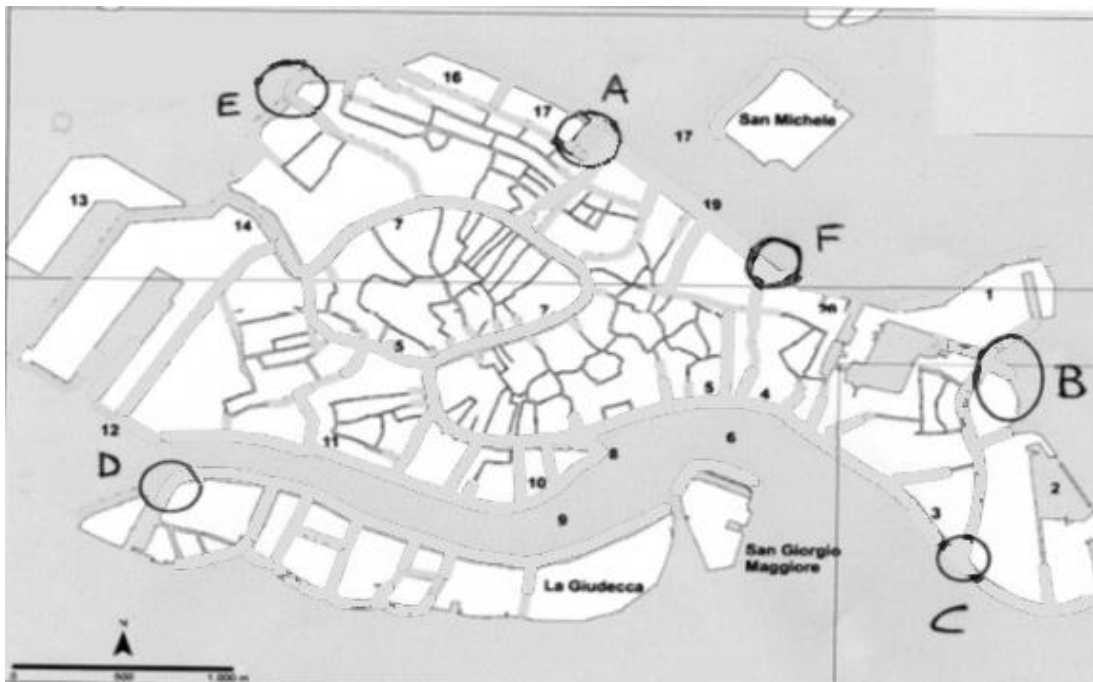


Figura 5. Mappa schematica della laguna di Venezia, evidenziate vi sono le zone di prelievo dei campioni.

3.3. Descrizione delle procedure di calibrazione

Per la determinazione delle percentuali di recupero sull'analisi di tutti gli elementi presenti nelle soluzioni multistandard utilizzate (CCS, CLPP, IV) sono state preparate soluzioni contenenti gli standard multielemento in diverse concentrazioni e altri con circa 0.1 g d'alga e quantità note di standard. Questi sono stati digeriti in acido nitrico, utilizzando il programma applicato ai campioni d'alga.

Per la calibrazione dei sali di potassio e lo studio dell'effetto della matrice acida sulla misura ICP-MS, si sono preparate soluzioni standard per le rette da 10 punti di calibrazione da 1ppb a 1 ppm di KI, KIO₃, KIO₄, e di I₂ in tre matrici differenti: acqua milliQ, HNO₃ 1 %p/p, HNO₃ 5 %p/p. Si è preparata la retta di calibrazione del K con la soluzione multistandard IV nello stesso intervallo in HNO₃ al 5 %p/p.

Successivamente sono state preparate le soluzioni standard per I₂ in soluzione di KSCN 0.1 M, KSCN 0.1 M all'1 %p/p in acido nitrico e KSCN 0.1 M al 5 %p/p in acido nitrico. Ogni retta di calibrazione è stata preparata di 6 punti con intervallo di concentrazione tra 1 ppb e 1 ppm in I e K.

Per lo studio dell'effetto dei complessanti sulla misura ICP-MS, sono state poi preparate le rette di calibrazione per la soluzione multielemento standard IV, KI, KIO₃, I₂, in ambiente acquoso, NaCl 0.1 M, KSCN 0.1 M in HNO₃ 1 %p/p, NH₄SCN 0.1 M in HNO₃ 1 %p/p, nell'intervallo 1 ppb – 1ppm in iodio per i sali e in potassio per lo standard multielemento. Per lo iodio molecolare sono state fatte le soluzioni solo in acqua acida. Ogni retta di calibrazione è composta da 6 standard.

3.4. Descrizione delle procedure di trattamento dei campioni

I campioni d'alga sono stati lavati 5 volte con acqua milliQ, sono stati liofilizzati per due giorni a temperatura ambiente e bassa pressione, pestati in mortaio di ceramica per ottenerne una polvere più fine ed omogenea possibile; se n'è prelevata di ognuno una piccola quantità, circa 20 – 30 mg e posta in fiala di Pyrex da 10 ml dotata di ancoretta magnetica, addizionati di 5 g di HNO₃ al 69 %p/p e inseriti nel reattore a microonde Discover SP CEM con il metodo *Algae*. Sono stati quindi diluiti 1:100 per ottenere le soluzioni da analizzare in ICP-MS.

I campioni d'acqua sono stati diluiti 1:10 con HNO₃ al 5 %p/p.

3.5. Descrizione delle procedure sperimentali per il metodo di determinazione dello iodio totale

Si sono trattati in reattore a microonde CEM EXPLORER SP-D PLUS 0.030 g di KI, KIO₃, KIO₄, I₂, MIT e DIT con 5 g di HNO₃ al 69 % p/p con metodo *Algae* riportato in Tabella 1 e Tabella 2.

Per lo studio del trattamento di digestione sono stati trattati 0.1 g di KI, I₂, KIO₃, KIO₄, MIT e DIT con le procedure descritte in seguito:

procedura 1: 5 g di HNO₃ al 69 % p/p;

procedura 2: 2.5 g di HNO₃ al 69 % p/p + 2.5 g di acqua milliQ;

procedura 3: 5 g di HNO₃ al 69 % p/p + AgNO₃ con Ag⁺ 50 volte superiore alla quantità di I prevista;

procedura 4 : 3 g di HNO₃ al 69 % p/p + 1 g di H₂O₂ 33%v/v;

procedura 5: 5 g di H₂O₂ 33%v/v ;

procedura 5: 5 g di acqua regia (HCl 37 %p/p - HNO₃ 67 %p/p 3:1 in volumi).

Per la valutazione del metodo su campioni campioni prova, vengono preparate delle soluzioni solide di KI, KIO₃, amminoacidi iodati in allumina a concentrazioni simili quelle previste per le alghe da analizzare , circa 400 ppm di I. Si è preparata una soluzione solida miscelando le soluzioni solide preparate con ogni sale per ottenere un composto che potesse essere paragonabile alle alghe campione (denominato *Simil-Alga*), in 33% di KI, 33% KIO₃, 33% DIT in soluzione solida. Successivamente le soluzioni solide sono state trattate in Digestore CEM con il programma *Algae* con tre diversi ambienti di digestione: HNO₃ al 69 % p/p, acqua regia, HNO₃ al 69 % p/p con AgNO₃ in concentrazione almeno 50 volte superiore a quella di I presente nella soluzione solida. Le digestioni ottenute sono state diluite infino ad ottenere concentrazione di I di circa 500 ppb in NH₄SCN 0.1 M in HNO₃ 1 %p/p.

3.6. Procedura di digestione con microonde

Il reattore a microonde è stato utilizzato applicando per tutti i campioni il metodo di trattamento chiamato *Algae*. La temperatura massima è di 200 °C raggiunta in 4 min e mantenuta tale per 2 min, la pressione massima è di 400 psi e la potenza di 300 W. Durante il processo il campione viene mescolato con ancoretta magnetica, la provetta viene fatta sfiatare per 5 volte. I parametri di utilizzo del reattore a microonde sono descritti in Tabella 1 e Tabella 2.

Metodo	Temperatura Max (°C)	Tempo rampa (min)	Tempo sosta (min)
Algae	200	04:00	02:00
pressione max (psi)	Potenza (W)	Velocità mescolamento	n sfiati
400	300	medio	5

Tabella 1. Parametri di utilizzo del mineralizzatore a microonde CEM EXPLORER SP-D PLUS

Intervalli	Pressione (PSI) degli sfiati	Numero massimo di sfiati
1	225	2
2	250	2
3	275	2
4	300	2
5	350	127

Tabella 2. Programma di pressione e sfiati per il metodo *Algae* utilizzato da mineralizzatore a microonde CEM EXPLORER SP-D PLUS

Vengono di seguito, riportati i profili di pressione (psi), temperatura (°C) e potenza (W) rispetto al tempo, dei campioni.

Parte sperimentale

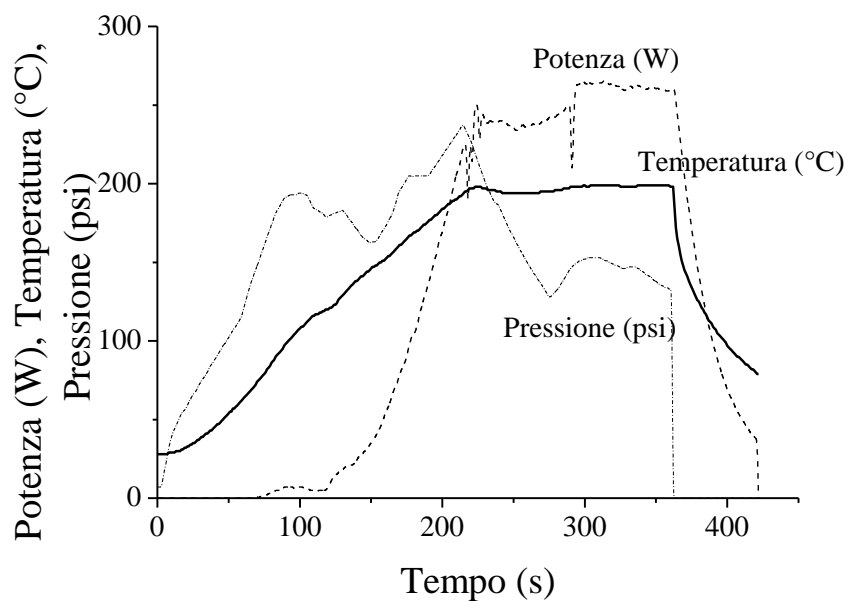


Figura 6. Profili di Temperatura (°C), pressione (psi) e potenza (W) nel tempo di una digestione a microonde di un campione di 30 mg dei sali in 5 ml di HNO_3 concentrato in una fiala da 10 ml.

3.7. Parametri operativi di ICP-MS e studio dell'effetto memoria dello iodio in ICP-MS

I parametri con cui sono state fatte le misure con ICP-MS Agilent 7700x sono riportati in Tabella 3.

Strumento	Agilent 7700x ICP-MS
Potenza radiofrequenza	1550 W
RF matching	1.8 V
Flusso del gas al plasma	15 l min ⁻¹ Ar
Flusso del gas ausiliario	1.0 l min ⁻¹ Ar
Carrier gas flow rate	1.05 l min ⁻¹ Ar
Flusso gas He	4.3 ml/min
CeO ⁺ /Ce ⁺	0.90%
Rapporto ioni doppia carica 70/140	0.94%
Nebulizzatore	Microflow PFA nebuliser
Camera spray	Scott double-pass type at 2 °C
Torcia	Torcia al quarzo
Velocità d'introduzione del campione	0.1 ml min ⁻¹
Cono campionatore di nichel	1.0 mm diametro interno
Cono di skimmer	0.5 mm diametro interno
Profondità di campionamento	8.5 mm
Modalità detector	Dual (conteggio analogico e digitale)
Dwell time/mass	100 ms

Tabella 3. Parametri di utilizzo Agilent Technologies 7700x ICP-MS system.

Per valutare l'effetto memoria che grava sulla misura dello iodio, si sono fatte alcune misure dei bianchi delle rette di calibrazione successivamente agli standard di I più concentrati (1 ppm).

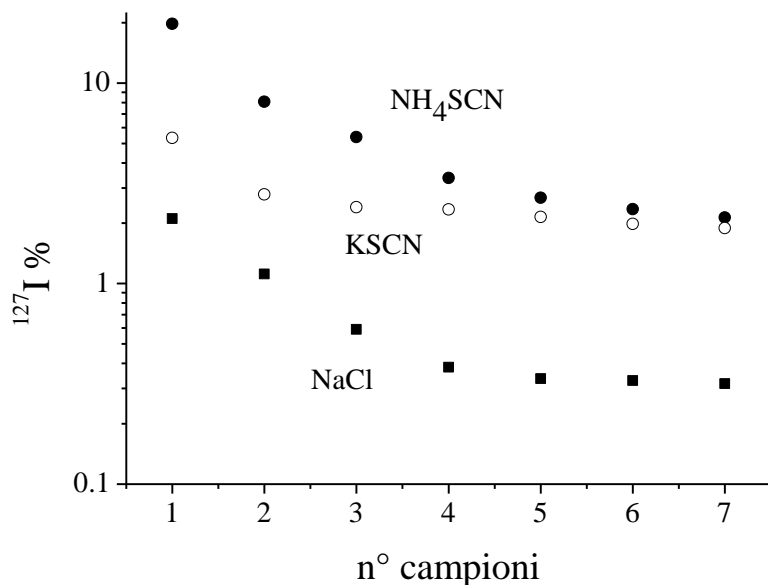


Figura 7. Percentuale di I misurato nei bianchi di NaCl (■), NH₄SCN (●), KSC (○) 0.1 M in HNO₃ 1 %p/p in misure successive ai campioni di I 1ppm.

In Figura 7 sono riportate le percentuali di iodio rilevate nelle misure successive ad un campione con 1 ppm di I, in NaCl, NH₄SCN, KSC 0.1 M in HNO₃ 1 %p/p . Le misure di I in NH₄SCN 0.1 M, mostrano percentuali più alte dell'elemento rispetto agli altri ambienti, l'effetto memoria è molto elevato, decresce raggiungendo valori costanti dopo 6-7 misure, di circa 7%. KSCN dimostra comportamento intermedio. La soluzione più utile per abbattere, almeno in parte, l'effetto memoria nella misura dello iodio è quella di NaCl 0.1 M in soluzione acida. In essa, infatti, si registra già una bassa percentuale di iodio alla prima misura dopo la soluzione concentrata , che diminuisce aumentando il numero di prove arrivando allo 0.2 %.

Proprio per questo si è scelto di utilizzare una soluzione acida di NaCl 0.1 M per il lavaggio tra una misura e l'altra.

4. Metodo di analisi dello iodio totale

Com'è noto, nelle alghe lo iodio è presente in diverse forme: come iodio inorganico, I^- e IO_3^- e come iodio organico all'interno di amminoacidi quali MIT e DIT.²⁰ La procedura di analisi prevede la digestione acida in reattore a microonde del campione algale. Un primo aspetto, di importanza analitica, riguarda l'effetto della digestione sulle differenti specie di iodio presenti nell'alga. È nota la capacità ossidante dell' HNO_3 concentrato a caldo nei confronti di campioni di origine organica. Come suggerito da alcuni studi presenti in letteratura lo iodio contenuto nelle alghe sotto la forma di amminoacido e di I^- si ossida alla forma di IO_3^- .¹⁶ Questa considerazione porta come conseguenza a preparare una calibrazione dello iodio in ICP-MS con un sale iodato. Come si potrà vedere in seguito, prove di recupero percentuale dello iodio su simil-alga, a concentrazione nota dell'alogeno, non superano mai il 50% se le digestioni sono realizzate in HNO_3 concentrato, evidenziando un comportamento più complesso di quello previsto, in fase digestiva del campione.

In questo lavoro di tesi abbiamo verificato che il comportamento della digestione a microonde dei sali di iodio non è quello atteso. Aliquote note di KI, KIO_3 , KIO_4 , I_2 , MIT e DIT sono state digerite in HNO_3 concentrato con un opportuno programma descritto nella parte sperimentale. Tutti i composti digeriti in HNO_3 compresi KIO_3 e KIO_4 hanno evidenziato chiaramente la formazione di I_2 solido dopo la digestione, è evidente dal precipitato nero lucente di Figura 8.

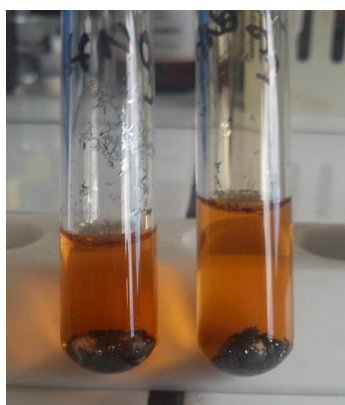


Figura 8. Campioni di KI e MIT dopo la digestione in HNO_3 al 69 % p/p in reattore a microonde con il programma *Algae*.

La verifica che il precipitato contenga solo iodio è stata fatta pesando il solido rimasto dopo la digestione e determinando la quantità di iodio presente con l'ICP-MS dopo averlo portato in soluzione complessato con tiocianato (complesso formato I_2SCN^-).

La conclusione di questa osservazione sperimentale è notevole poiché sotto certe condizioni di digestione l' HNO_3 concentrato può comportarsi sia come agente ossidante che riducente. Se in soluzione dopo la digestione sono presenti differenti specie contenenti iodio, si presenta all'analitico il problema della scelta dello standard per calibrare l'analita. È infatti noto che la sensibilità di calibrazione all'ICP-MS dello iodio nei suoi diversi stati di ossidazione è differente rendendo così la sua determinazione apparentemente impossibile.

Si è perciò deciso di ottimizzare la procedura analitica per la determinazione dello iodio totale cercando di trovare delle condizioni sperimentali per le quali le risposte all'ICP-MS delle varie specie di iodio fossero più simili possibile.

Secondo l'ipotesi conservativa che tutte le specie di iodio possano essere potenzialmente presenti si è inizialmente verificata la sensibilità di calibrazione di KI , KIO_3 , KIO_4 e I_2 previa la determinazione della purezza dei sali sfruttando la calibrazione rispetto al K . Inoltre le soluzioni di KI , KIO_3 , KIO_4 , sono state preparate in tre ambienti differenti: acqua, HNO_3 1% p/p, HNO_3 5% p/p; mentre lo iodio molecolare, data la sua scarsa solubilità in acqua (0.03 g/100 ml 25 °C),⁴¹ è stato tenuto in soluzione come complesso con il tiocianato (I_2SCN^-). La sensibilità di calibrazione dello iodio nelle sue forme si è dimostrata significativamente differente al variare della acidità della matrice. Si sono quindi confrontate le rette di calibrazione dei sali di iodio in soluzione a concentrazioni di acido nitrico diverse. In soluzione acquosa si ottengono sensibilità di calibrazione simili ma risposte scarsamente riproducibili. Si è visto che all'aumentare dell'acido cala la sensibilità della calibrazione, questo a causa dell'aumento della viscosità della soluzione da analizzare che modifica le condizioni operative soprattutto nella nebulizzatore della soluzione all'interno della "spray chamber". È evidente dalle misure sperimentali che l'aumento dell'acido in soluzione porta ad un notevole calo di sensibilità per la specie ioduro, a causa della lenta ossidazione dello stesso a iodio molecolare che poi

viene perso nella fase di nebulizzazione. Si è quindi scelto come compromesso di lavorare con soluzioni di acido nitrico all'1 %p/p.

Per ovviare al problema di perdita di I₂ nella "spray chamber" la soluzione di digestione viene trattata con alcuni complessanti quali Cl⁻ e SCN⁻ in acido nitrico al 1 %p/p. I risultati migliori si sono ottenuti con l'uso di NH₄SCN. L'utilizzo di NaCl o KSCN ha mostrato un effetto di soppressione ionica del segnale a causa delle quantità di ioni Na⁺ e K⁺ generate nel plasma.

In questo lavoro di tesi vengono presi in considerazione differenti approcci di digestione con HNO₃ concentrato, HNO₃ diluito, HNO₃ concentrato con H₂O₂,²⁹ H₂O₂, acqua regia, si anche è provato un metodo di estrazione dello iodio con tetrametilammonio idrossido (TMAH) suggerito da differenti lavori di letteratura.^{16,30,33}

4.1. Effetto della digestione in reattore a microonde sui sali di iodio

I sali di iodio KI, KIO₃, KIO₄, lo iodio molecolare e gli amminoacidi iodati MIT e DIT, sono stati digeriti in HNO₃ concentrato con Digestore CEM applicando il metodo *Algae*. Si è osservato che: KI, MIT e DIT prima della digestione, con la sola aggiunta di acido, formano precipitato marrone scuro e la soluzione è bruna. Dopo il trattamento in reattore si forma del precipitato grigio argento e la soluzione è arancio-bruna trasparente. KIO₃ e KIO₄ disciolgono completamente in HNO₃. Dopo la digestione si forma del precipitato grigio argenteo al pari di KI e degli amminoacidi iodati. Il precipitato che si forma è giustificato dagli equilibri descritti in seguito.

Stern S. A. *et al.* riportano la presenza di diossido d'azoto nei vapori di acido nitrico concentrato secondo la seguente reazione:⁴²



L'NO₂ partecipa al seguente equilibrio:⁴²

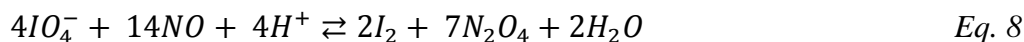
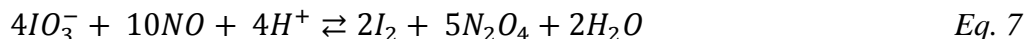


formando l'ossido di azoto che ha caratteristiche riducenti nei confronti degli ioni iodato e periodato.

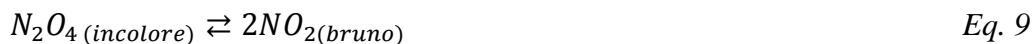
Si possono infatti confrontare i potenziali redox (NHE):^{43,44}



Le reazioni complessive per lo iodato e per il periodato sono rispettivamente:



Per quanto riguarda la colorazione bruna della soluzione è giustificata dal seguente equilibrio:⁴⁵

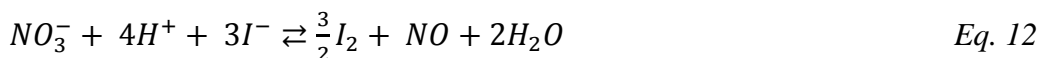


Il precipitato di iodio molecolare ottenuto dalle mineralizzazioni di KI, MIT e DIT si giustifica con le proprietà ossidanti dell'acido nitrico concentrato.

Le semireazioni di riduzione sono:



Complessivamente:



Al termine del processo di digestione possono quindi essere presenti diverse specie contenenti iodio. È quindi necessario verificare se esse danno la stessa risposta in ICP, poiché solo in caso affermativo si può usare un'unica calibrazione per determinare lo iodio totale. In caso contrario saranno invece necessarie delle accortezze per evitare che la diversa speciazione dello iodio tra campioni e standard vada a falsare il risultato dell'analisi.

4.2. Standardizzazione e confronto delle sensibilità di risposta dei sali di iodio alla misura ICP-MS

La calibrazione rispetto al potassio ha lo scopo primario di standardizzare i sali usati e nel contempo di correggere eventuali errori occorsi durante la preparazione permettendo di ottenere informazioni più sicure sul comportamento dello iodio all'interno delle differenti specie usate.

Vengono di seguito confrontati i parametri delle rette di calibrazione del potassio ottenute per i sali KI, KIO₃, KIO₄ e la retta con il multistandard IV utilizzando come matrice una soluzione al 5 % p/p in HNO₃. A questo punto, tenendo conto del fatto che la risposta del potassio in ICP è non dipende dal diverso controione (I⁻, IO₃⁻, IO₄⁻), è stato possibile calcolarne la purezza a partire dalla differenza di pendenza rispetto alla soluzione standard.

campione	a(K) (CPS)	s _a (CPS)	b(K) (CPS/ppb)	s _b (CPS/ppb)	b'(K) (CPS/ppb)	%
IV 5%	184358	7915	1117	14		100
KI 5%	184267	2791	1116	14	1117	100
KIO ₃ 5%	182615	4167	1071	21	1117	96
KIO ₄ 5%	192705	7938	912	35	1117	82

Tabella 4. Parametri delle rette di taratura del potassio di IV, KI, KIO₃, KIO₄. Intercetta a(K) in CPS e pendenza b(K) in CPS/ppb con relative incertezze (s) calcolate dalla regressione lineare con 10 punti di calibrazione tra 1 ppb e 1 ppm.

Pendenza corretta $b'(K)$ per la purezza dei sali (%) di potassio ottenuta con retta di calibrazione del multistandard. $R^2 \geq 0.999$ per tutte le rette.

In Tabella 4 sono riportati i parametri di regressione con le loro incertezze di K ottenuti dallo standard IV e dai sali di K contenenti lo iodio in differenti stati di ossidazione: KI, KIO₃, KIO₄. Le percentuali di correzione valutate sono pari a 100%, 96% e 82% per KI, KIO₃ e KIO₄ rispettivamente. La bassa percentuale ottenuta per KIO₄ è dovuta al fatto che è un sale molto igroscopico. L'intercetta ottenuta per i sali di K è di circa di 187000 CPS (conteggi per secondo) quantità significativamente maggiore di zero dato il basso errore di 2500 CPS. Il valore elevato è dovuto alla specie poliatomiche interferente ArH⁺ non eliminabile completamente nemmeno mediante l'uso della cella di collisione.

Calcolate le purezze dei sali, è possibile, fare un confronto tra i segnali delle diverse specie di iodio quali KI, KIO₃, KIO₄ e iodio molecolare. Quest'ultimo, a causa della sua bassa solubilità in acqua e da analisi preliminari che ne evidenziano la bassissima sensibilità dello strumento ICP-MS a causa della volatilizzazione in spray chamber,⁴⁶⁻⁴⁸ è stato complessato con KSCN 0.1 M.

Si riportano ora i parametri delle rette di segnali di iodio, corrette per la purezza ottenuta in precedenza, per KI, KIO₃, KIO₄ e I₂-SCN⁻ preparate in acqua milliQ, HNO₃ 1 %p/p e HNO₃ 5 %p/p con le relative incertezze. Per tutti si è ottenuto un $R^2 \geq 0.999$.

campione	ambiente	a(I) (CPS)	s _a (I) (CPS)	b(I) (CPS/ppb)	s _b (I) (CPS/ppb)
	KSCN 0.1 M	60951	44101	4482	64
I ₂	KSCN 0.1 M HNO ₃ 1% p/p	161944	60496	4290	119
	KSCN 0.1 M HNO ₃ 5% p/p	-140169	76808	4210	114
	milliQ	-16655	19962	4374	32
KI	HNO ₃ 1% p/p	-60680	80184	3782	126
	HNO ₃ 5% p/p	88492	34046	3099	78
KIO ₃	milliQ	23838	22453	4785	35
	HNO ₃ 1% p/p	30266	19060	4723	30

campione	ambiente	a(I)	s _a (I)	b(I)	s _b (I)
		(CPS)	(CPS)	(CPS/ppb)	(CPS/ppb)
KIO ₄	HNO ₃ 5% p/p	34095	46187	4586	72
	milliQ	21747	35303	4667	51
	HNO ₃ 1% p/p	-9230	15461	4661	23
	HNO ₃ 5% p/p	-4509	15713	4443	23

Tabella 5 Parametri delle rette di taratura dello iodio di KI, KIO₃, KIO₄. Intercetta a(I) in CPS e pendenza b'(I) in CPS/ppb corretta per la purezza dei sali, con relative incertezze calcolate dalla regressione lineare con 10 punti di calibrazione tra 1ppb e 1ppm. R² ≥ 0.999 per tutte le rette ottenute.

I dati ottenuti posso essere meglio visualizzati in Figura 9

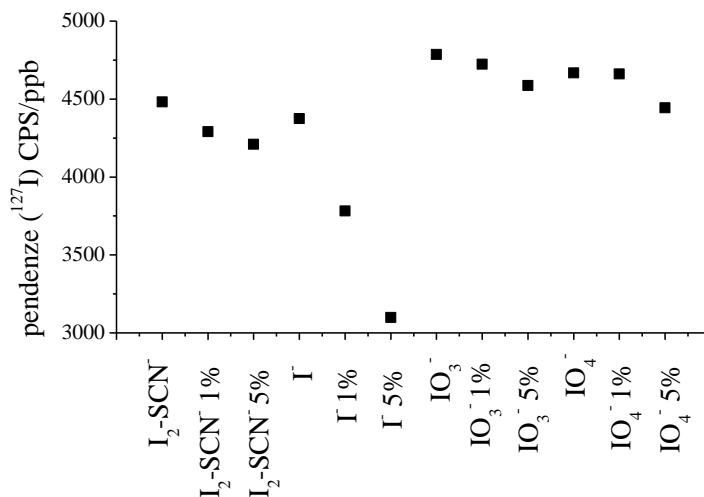


Figura 9. Pendence delle rette di calibrazione di I₂, in KSCN 0.1 M in acqua, HNO₃ al 1% p/p e HNO₃ al 5% p/p KI, KIO₃ e KIO₄ in acqua, HNO₃ al 1% p/p e HNO₃ al 5% p/p.

Dai dati ottenuti si possono osservare le differenti sensibilità ottenute per le diverse specie di iodio. In acido nitrico 5 %p/p ad esempio la retta di calibrazione ha una pendenza di 3099 CPS/ppb per I⁻, di 4586 CPS/ppb per IO₃⁻ e di 4443 CPS/ppb per IO₄⁻.

Come è possibile vedere, all'aumentare dell'acidità della matrice la sensibilità della calibrazione diminuisce; questo può essere causato dalla variazione della viscosità della soluzione che entra nella spray chamber e ciò va ad influire sulla resa di nebulizzazione. In particolare la variazione più significativa è per la specie I⁻. Questo

fatto può essere spiegato tenendo conto che, oltre alla variazione delle caratteristiche fisiche del sistema, lo ioduro in ambiente fortemente acido potrebbe formare la specie HI che volatilizza nella spray chamber ⁴⁹ stessa o venire direttamente ossidato a iodio molecolare dall'HNO₃.

Il comportamento evidenziato, dimostra come non sia possibile determinare lo iodio totale accontentandosi di utilizzare una retta di calibrazione realizzata con una sola delle specie di iodio in una matrice priva di complessante per lo iodio molecolare.

Si è scelto quindi di studiare alcuni tipi di complessanti per lo iodio che possano mantenerlo in soluzione, ma che contemporaneamente non vadano ad influire sulla misura. Tra gli ambienti acidi utilizzati in precedenza, si nota che è l'acqua milliQ tal quale che differenzia in maniera minore le diverse specie di iodio, ma non è la scelta migliore in quanto l'assenza di acidi in grado di stabilizzare in soluzione gli ioni metallici presenti non garantisce misure riproducibili all'analisi ICP-MS di campioni reali. L'ambiente acquoso all'1 %p/p di HNO₃ è quello in cui iodio con complessante, ioduri, iodati e periodati differenziano in maniera minore il loro segnale.

4.3. Studio dell'effetto del complessante dello iodio nella misura ICP-MS

Per stabilizzare lo iodio, I₂, in soluzione sono stati testati differenti sali quali NaCl, KSCN e NH₄SCN. È noto infatti che i cloruri e i tiocianati sono dei buoni complessanti per I₂ con costanti di formazione pari a 0.2 per il complesso I₂Cl⁻ e 1.9 per I₂SCN⁻.⁵⁰ Si sono quindi eseguite delle calibrazioni con KI, KIO₃ e I₂ in differenti soluzioni acquose acide (1 %p/p in HNO₃ concentrato) caratterizzate da concentrazioni 0.1 M di NaCl, KSCN e NH₄SCN. In Tabella 6 sono riportati i parametri di regressione (intercetta "a", pendenza "b" e R²) delle rette di calibrazione di I⁻, IO₃⁻ e I₂X⁻ nelle differenti soluzioni contenenti NaCl, KSCN e NH₄SCN.

Metodo di analisi dello iodio totale

Specie	complessante	a(I) (CPS)	s _a (I) (CPS)	b(I) (CPS/ppb)	s _b (I) (CPS/ppb)	R ²
KI	milliQ	-56055	28267	6438	41	0.9999
KIO ₃		98673	57220	6665	88	0.9995
KI	NaCl	-5606	22863	5574	36	0.9999
KIO ₃		83466	39070	6253	61	0.9997
I ₂		-17606	38118	4502	50	0.9996
KI	NH ₄ SCN	171775	58583	6781	90	0.9994
KIO ₃		159067	12344	6474	20	1
I ₂		201000	30631	6063	43	0.9998
KI	KSCN	-307551	148281	8231	240	0.9968
KIO ₃		-51923	59872	8661	97	0.9995
I ₂		42252	70947	9957	113	0.9995

Tabella 6. Parametri delle rette di taratura dello iodio preparate a partire da KI, KIO₃, I₂ in NaCl, NH₄SCN, KSCN 0.1 M IN HNO₃ 1% p/p. Intercetta a(I) in CPS e pendenza b(I) in CPS/ppb, con relative incertezze calcolate dalla regressione lineare con 5 punti di calibrazione tra 1 ppb a 1 ppm.

In Figura 10 riassumiamo l'andamento delle sensibilità di calibrazione per I⁻, IO₃⁻ e I₂ al variare del tipo soluzione:

- Soluzione 1 HNO₃ al 1%p/p
- Soluzione 2 HNO₃ al 1%p/p + 0.1M NaCl
- Soluzione 3 HNO₃ al 1%p/p + 0.1M KSCN
- Soluzione 4 HNO₃ al 1%p/p + 0.1M NH₄SCN

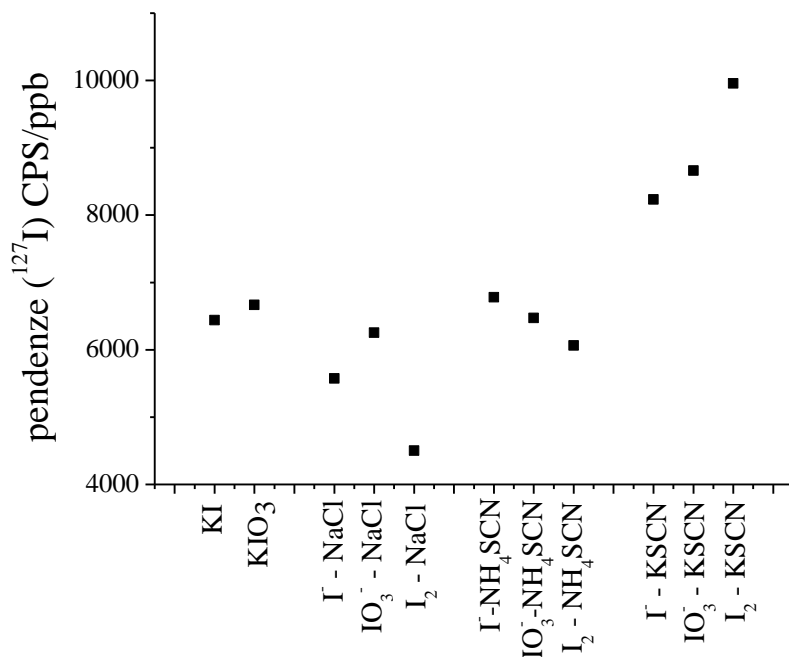


Figura 10. Pendenze delle rette di calibrazione di I in KI, KIO₃, I₂ in soluzioni di acqua milliQ, NaCl 0.1 M, NH₄SCN 0.1 M, KSCN 0.1 M tutte in HNO₃ 1 %p/p.

Si osserva che nella Soluzione 1, le pendenze di I⁻ (6438 CPS/ppb) e IO₃⁻ (6665 CPS/ppb) sono confrontabili, I₂ non è presente in quanto non solubile. La Soluzione 2 e la 3 hanno comportamenti differenti rispetto alla Soluzione 1 e le diversità tra lo iodio in differenti stati di ossidazione sono significative. La Soluzione 4 sembra essere la situazione migliore poiché le pendenze sono pressoché simili fra loro e vicine a quelle di Soluzione 1.

L'effetto dell'aggiunta di 0.1 moli/L di Na⁺ e 0.1 moli/L di K⁺ delle Soluzioni 3 e 4 è evidente dall'analisi dei CPS prodotti dallo standard interno Rh. In Figura 11 si riportano i conteggi per secondo di Rh, utilizzato come standard interno, per tutte le misure fatte nelle diverse soluzioni: acqua milliQ, NaCl 0.1 M, NH₄SCN 0.1 M, KSCN 0.1 M tutte in HNO₃ 1 %p/p.

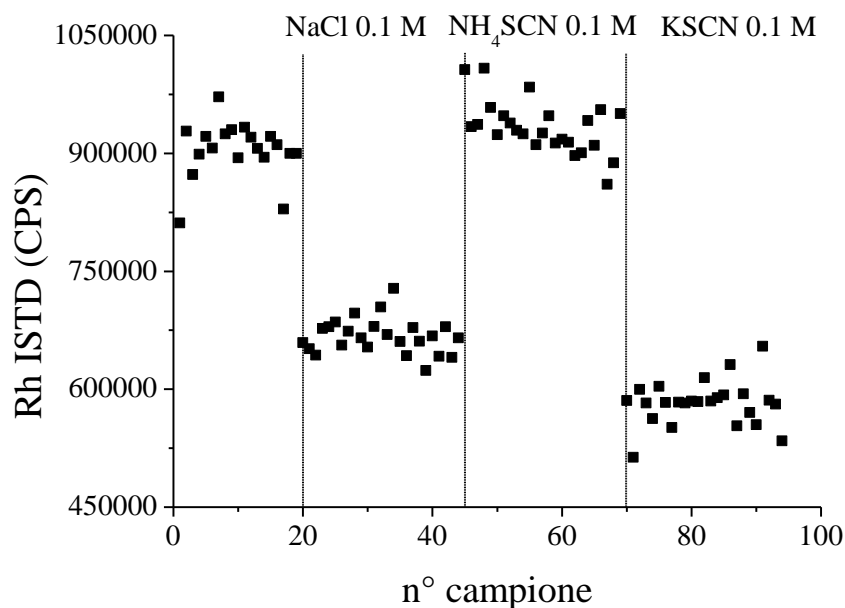


Figura 11. Segnale di Rh (CPS) come standard interno di ogni soluzione standard. Primo gruppo soluzioni standard in acqua, secondo NaCl 0.1 M, terzo NH₄SCN 0.1 M, quarto KSCN 0.1 M tutti in HNO₃ 1 %p/p.

L'andamento in Figura 11 è comune a tutti gli standard interni usati. Si può notare come in presenza di NaCl e KSCN il segnale dello standard interno venga abbassato notevolmente a causa della soppressione ionica dell'analita operata dalla formazione di quantità importanti di K⁺ e Na⁺ nel plasma. NH₄SCN invece, non influisce sull'intensità del segnale dell'analita poiché in plasma non rimane nella forma di ione ammonio. Per determinare lo iodio totale quindi, è bene utilizzare come complessante NH₄SCN in HNO₃ 1 %p/p in quanto evita la perdita dello iodio molecolare, e l'ambiente acido all'1% p/p non discrimina fortemente i segnali delle diverse specie di iodio da analizzare.

4.4. Confronto di metodi di digestione per la determinazione dello iodio in campioni algali

Definito il metodo di misura dello iodio totale, si studiano i trattamenti di digestione del campione organico. Si sono presi in considerazione differenti modalità di attacco acido presenti in letteratura e altre proposte per la prima volta in questo studio. La Tabella 7 riporta le percentuali di recupero ottenute per i diversi procedimenti utilizzati su campioni di KI, KIO₃, KIO₄, MIT e DIT, I₂. Il recupero di

K, nei campioni in cui è presente, è compreso tra 96 e 104 %. La ripetibilità su tre digestioni è del 10 % (CV%) per lo iodio e del 3 % (CV%) per il potassio.

Campione	HNO ₃ 69%	HNO ₃ 34.5%	HNO ₃ +H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 30 %	Acqua regia	TMAH
I ₂	41	81	30	37	84	18
I ⁻	32	85	31	92	81	98
IO ₃ ⁻	39	92	42	85	85	66
IO ₄ ⁻	42	96	46	85	88	69
MIT	67	37	39	24	85	64
DIT	47	33	32	45	83	47

Tabella 7. Percentuali di recupero di I₂, KI, KIO₃, KIO₄, MIT e DIT al variare della procedura di digestione adottata. Le etichette delle procedure adottate si riferiscono alle condizioni sperimentali descritte al capitolo 3.5. Le soluzioni digerite sono state diluite in una soluzione di NH₄SCN 0.1 M in HNO₃ al 1 %p/p. Le diluizioni sono eseguite per avere una soluzione finale teorica presunta di 1 ppm. Il recupero di K per KI, KIO₃ e KIO₄ è sempre compreso tra 96 e 104 %. La ripetibilità su tre digestioni è del 10% per lo I e 3% per il K. Retta di calibrazione usata per le soluzioni provenienti dalla digestione è basata su I₂-SCN mentre la retta di calibrazione per TMAH è basata su KI.

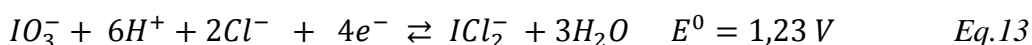
Dai dati mostrati in Tabella 7 è possibile vedere che, per quanto riguarda la digestione in acido nitrico concentrato, i recuperi di iodio si attestano attorno al 50%. Come evidenziato in precedenza, da IO₃⁻ e IO₄⁻ si ottiene un precipitato grigio argenteo di iodio molecolare per tutti i campioni, per gli amminoacidi e I⁻ si ottiene invece iodio molecolare per la nota azione ossidante dell'acido nitrico. Il recupero ottenuto con questa tipologia di attacco è sempre basso e si ritiene possa essere causato dalla perdita di I₂ nella fase gassosa durante la digestione.

La digestione in HNO₃ diluito è meno aggressiva rispetto a quella in HNO₃ concentrato. Anche in queste soluzioni si ha la formazione di I₂ solido ma in quantità notevolmente inferiori a quelle registrate in HNO₃ concentrato anche per la maggior solubilità di I₂ in acido diluito. I recuperi in HNO₃ diluito sono buoni per quanto riguarda i sali inorganici ma il trattamento non è sufficiente per digerire specie organiche come MIT e DIT che mostrano recuperi bassi intorno al 40%.

L'attacco con $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ porta a risultati simili a quelli ottenuti per l' HNO_3 concentrato.

La digestione in solo H_2O_2 non è efficace per la mineralizzazione dei campioni organici ma si ottengono recuperi elevati sui sali inorganici solubili perché non vengono trasformati in I_2 . La perdita in I_2 durante la digestione è molto alta come si nota dal basso recupero ottenuto sia per la digestione di MIT e DIT che di I_2 .

La digestione in acqua regia (AR) è la soluzione che è stata adottata infine in questo lavoro poiché abbina le capacità ossidanti dell' HNO_3 con le capacità complessanti dei cloruri nei confronti di I_2 prodotto durante la digestione. Tutte le soluzioni digerite con AR danno recuperi superiori all'80% e sono risultate prive di I_2 precipitato con soluzioni limpide di colore giallo. Il meccanismo possibile in acqua regia può essere razionalizzato dalle semi-reazioni seguenti:



Dopo la digestione le specie potenzialmente presenti possono essere I_2Cl^- , ICl_2^- e IO_3^- , la successiva diluizione in HNO_3 all'1% e NH_4SCN 0.1 M comporta la formazione di I_2SCN^- e IO_3^- (dismutazione di ICl_2^-). La calibrazione utilizzata è basata sulla specie I_2SCN^- che si pensa possa essere la specie dominante.

L'estrazione con TMAH produce risultati buoni solo per I^- ma non è altrettanto efficace con le altre specie utilizzate.

4.5. Analisi dei recuperi dello iodio sulla simil-alga ed effetto dell'aggiunta di AgNO_3

In questa sessione sono stati preparate delle soluzioni solide con allumina (inerte) di KI, KIO_3 e DIT mescolati in percentuali in peso simili a quelle delle alghe analizzate. Alle soluzioni solide così preparate sono applicati i trattamenti (T1, T2, T3) di digestione seguenti:

- T1: HNO_3 concentrato 69%,
- T2: HNO_3 concentrato con AgNO_3 in quantità 50 volte superiore a quella di iodio introdotta,
- T3: AR (Acqua Regia).

La scelta di usare l' AgNO_3 nel trattamento T2 ha lo scopo di impedire la formazione di I_2 in soluzione per la probabile formazione di AgI e AgIO_3 allo stato colloidale. In Tabella 8 sono riportate le percentuali di recupero di iodio totale quando vengono digerite quantità note di KI, KIO_3 , DIT e Simil-alga e successivamente diluite in una soluzione di NH_4SCN 0.1 M in HNO_3 1 %p/p per le misure in ICP-MS.

Le calibrazioni usate sono KI, KIO_3 , KIO_4 in NH_4SCN 0.1 M in HNO_3 1 %p/p.

SPECIE	% con T1	% con T2	% con T3
KI	87	75	98
KIO_3	86	78	99
DIT	88	92	95
SIMIL-ALGA	71	90	84

Tabella 8. Percentuali di recupero dello iodio nelle soluzioni solide di KI, KIO_3 , DIT e Simil-Alga (33% di KI, 33% di KIO_3 , 33% di DIT) in allumina, dopo le digestioni con acqua regia (AR), HNO_3 69 %p/p, HNO_3 69 %p/p e AgNO_3 . Utilizzate le calibrazioni di I (1ppb – 1 ppm) con KI, KIO_3 , I_2 in NH_4SCN 0.1 M all'1% HNO_3 . Rette con incertezza < 5%.

Come è possibile osservare la digestione in acqua regia mostra recuperi intorno all'86% per tutte le specie, maggiori di quelli ottenuti in acido nitrico concentrato per le specie ioduro e iodato. L'ultima colonna mostra i recuperi in presenza di Ag^+ nella soluzione di digestione, il recupero è pressoché del 100%. La presenza di Ag^+ ,

Metodo di analisi dello iodio totale

probabilmente causa la precipitazione di AgI dovuto sia alla specie I⁻ libera, che a quella formata dall'ossidazione dell'amminoacido; potrebbe precipitare anche AgIO₃ dovuto alla specie IO₃⁻ libera. La formazione del precipitato anticipa quella di I₂ in soluzione di conseguenza previene la possibilità di una sua perdita in fase gassosa durante la procedura di digestione. Le specie insolubili contenenti lo iodio vengono liberate in soluzione dall'azione complessante di SCN⁻.

5. Metodo di analisi degli elementi nelle alghe e nelle acque

La Tabella 9 riporta i parametri di calibrazione (intercetta e pendenza) ottenuti per i differenti elementi indagati. I valori ottenuti per il coefficiente di determinazione R^2 sono sempre molto alti, meno che per Na a causa di un aumento della variabilità associata all'inquinamento ambientale a bassi valori di concentrazione.

	pendenza (CPS/ppb)	intercetta (CPS)	R^2		pendenza (CPS/ppb)	intercetta (CPS)	R^2
7 Li	41.99	182.6	1	95 Mo	10510.2	4060.51	1
9 Be	88.78	60568.9	0.99	107 Ag	32354.8	364.94	1
11 B	41.2	285.41	1	111 Cd	5539.16	-27.54	1
23 Na	1560.81	1086659	0.97	118 Sn	12338.3	1004.98	1
24 Mg	1001.37	14927.4	1	121 Sb	16778.1	287.49	1
27 Al	484.7	3568.16	1	127 I	4759.61	57046.9	0.99
31 P	36.21	913.29	1	133 Cs	37516.6	90	1
34 S	2.23	9949.7	0.99	137 Ba	5078.82	10154.3	1
39 K	1308.4	204894	1	139 La	75375.5	52.11	1
44 Ca	5293.39	58152.1	1	140 Ce	88500.3	-277.96	1
47 Ti	481.42	95.81	1	141 Pr	86114.4	236.4	1
51 V	15698.9	715.88	1	146 Nd	15720.4	8.07	1
52 Cr	18865.6	8323.73	1	147 Sm	13836.4	-159.86	1
55 Mn	11315.5	2326.78	1	153 Eu	13887.6	-181.14	1
56 Fe	14312.7	243328	1	157 Gd	20137.9	-31.37	1
59 Co	29275.9	144.14	1	163 Dy	26413.3	36.94	1
60 Ni	7813.34	3627.92	1	165 Ho	10991.9	-717.17	1
63 Cu	7782.71	3763.46	1	166 Er	37486.6	-339.39	1
66 Zn	6949.9	29611.5	1	169 Tm	116601	0.48	1
69 Ga	237923	2000.29	0.98	172 Yb	26509.7	-113.5	1
75 As	3064.41	624.16	1	178 Hf	30211.3	-235.03	1
78 Se	270.23	864	1	181 Ta	120948	118.48	1
79 Br	468.73	32107.7	0.99	185 Re	39325.7	184.62	1
85 Rb	12920.9	1441.1	1	205 Tl	68693.5	-298.36	1
88 Sr	15428	104903	1	208 Pb	101105	23080.2	1

	pendenza (CPS/ppb)	intercetta (CPS)	R^2		pendenza (CPS/ppb)	intercetta (CPS)	R^2
90 Zr	25131.6	-45.78	1	232 Th	93437.5	-1011.5	1
93 Nb	51738.5	91512.1	1	238 U	93844.8	784.7	1

Tabella 9. Parametri delle rette di calibrazione scelte tra quelle ottenute con le soluzioni multistandard CCS, CLPP, IV . La regressione lineare è su 5 punti tra 1 e 1000 ppb.

5.1. Analisi degli elementi nelle acque lagunari

Al momento del campionamento delle acque lagunari sono stati misurate le medie di tre parametri caratteristici delle acque riportati in Tabella 10: salinità, temperatura e percentuale di ossigeno disciolto.

T (°C)	Salinità (‰)	% O ₂
16.4	26.5	89

Tabella 10. Temperatura (°C), salinità (‰) e percentuale di O₂ disciolto medie misurate acque campionate nella laguna di Venezia.

In Tabella 10 è riportata la temperatura media misurata nelle zone di prelievo delle acque. Essa è in linea con dati presentati per il mese di Aprile dell'anno 2008 dal Magistrato delle Acque.⁵¹ La temperatura dell'acqua è un parametro rilevante nelle acque della Laguna per monitorare l'inquinamento termico da attribuire alla zona industriale di Marghera. Variazioni anomale della temperatura possono alterare temporaneamente la popolazione fitoplanctonica lagunare e il suo sviluppo.

Il valore di salinità riportato è inferiore di qualche unità (PSU) rispetto a quelli misurati per il 2008.⁵¹ Questo può essere dato dal maggior apporto di acqua dolce dai canali del bacino scolante o maggiori precipitazioni atmosferiche o dal momento di marea. Il controllo della salinità risulta indicativo, oltre che delle precipitazioni atmosferiche, dell'influsso marino legato ai cicli di marea, anche della diffusione dei contaminanti in Laguna.⁵¹

La percentuale di ossigeno disciolto misurata nell'Aprile 2013 è in linea con quelle riportate per lo stesso mese del 2008.⁵¹ La misura di questo parametro permette di valutare i processi biologici, in atto oltre che quelli fisici dovuti alla temperatura e alla salinità. Processi di fotosintesi delle diverse specie presenti possono dare luogo ad importanti variazioni dei valori di %O₂.⁵¹

Nella Tabella 11 sono riportati dalla quinta alla decima colonna le concentrazioni medie in ppb degli elementi analizzati nelle acque lagunari delle diverse zone che hanno dato segnali maggiori del limite di quantificazione. L'ultima colonna riporta il valore della statistica F ottenuta dall'analisi della varianza a singolo fattore (fattore

Metodo di analisi degli elementi nelle alghe e nelle acque

zona) che permette di valutare se la variabilità nella concentrazione di ogni singolo elemento è dovuta alla zona di campionamento o alla procedura di analisi.

ppb	EPA	imperativo	guida	A	B	C	D	E	F	ANOVA
7 Li				163.7	190.2	183.1	171	95	92.6	23.5
11 B			1500-4500	5000	6700	5800	5700	3200	8400	1.0
23 Na				1.0E+07	1.5E+07	1.2E+07	1.2E+07	7.0E+06	1.1E+07	2.3
24 Mg				1.2E+06	1.5E+06	1.5E+06	1.4E+06	9.5E+05	1.0E+06	396.0
27 Al		5	1	105	72	68	40	122	19	12.5
31 P				116	96	101	130	105	68	2.1
34 S				1.2E+06	1.4E+06	1.4E+06	1.4E+06	9.3E+05	1.0E+06	311.4
39 K				3.8E+05	4.6E+05	4.7E+05	4.5E+05	3.0E+05	3.3E+05	318.1
44 Ca				4.6E+05	5.5E+05	5.5E+05	5.3E+05	3.7E+05	3.9E+05	295.7
47 Ti				5.2	3.8	1.8	2.3	3.2	1.4	21.2
51 V				4.7	5.7	6.3	6.4	5.8	5.7	14.8
52 Cr	50	0.7	0.2	3.6	3.7	4.8	3.6	3.0	3.5	1.2
55 Mn		8	0.2	7.3	2.4	6.3	5.4	28.9	4.5	43.8
56 Fe		8	0.2	85.9	57.1	118.0	68.7	306.0	48.6	40.4
59 Co		0.1	0.02	0.7	0.4	0.4	0.4	0.5	0.2	3.7
60 Ni	8.2	1.5	0.3	2.6	2.2	3.8	2.8	2.9	2.1	1.0
63 Cu	3.1	1.5	0.3	5.3	4.2	6.3	6.3	6.7	5.2	5.2
66 Zn	81	1.5	0.6	23.1	12.2	6.0	4.9	0.6	0.1	474.3
75 As	36	1.6	1.2	2.7	1.8	1.6	1.5	2.7	1.5	5.4
78 Se	71			2.6	3.3	2.6	2.5	1.6	1.7	16.8
79 Br				30230	37100	38110	37980	29450	31700	117.1
85 Rb				96.5	113.7	116.4	112.0	77.2	82.7	358.3
88 Sr				6550	7742	7905	7707	5269	5701	462.3
90 Zr				3.9	4.0	2.8	2.9	1.6	2.0	38.2
95 Mo				9.7	11.6	12.1	12.4	8.8	10.0	50.7
107 Ag	71	0.003	0.0003	1.8	1.5	1.4	1.4	1.1	1.2	1.2
121 Sb		0.6	0.2	0.8	0.7	0.6	0.6	0.4	0.4	12.5
127 I				91.6	91.2	88.0	84.2	75.8	70.5	10.4
133 Cs				0.8	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	2.5
137 Ba				53.3	47.4	45.1	48.0	51.7	43.6	86.2
140 Ce				<L.d.Q	<L.d.Q	<L.d.Q	<L.d.Q	0.4	0.1	42.5
185 Re				0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.8	4.4
208 Pb	8.1	0.15	0.03	45.6	27.9	8.4	8.4	3.4	1.6	59.1
238 U				3.0	3.2	3.2	3.1	2.4	2.4	167.7

Tabella 11. Nella seconda colonna si trovano le concentrazioni limite degli elementi nelle acque marine previsti da Clean Water Act (CWA) ($\mu\text{g/l}$) per gli Stati Uniti d'America;^{52,53} nella terza e quarta colonna si trovano rispettivamente i valori limite imperativi e guida di concentrazione ($\mu\text{g/l}$) degli elementi analizzati normati

con il DM del 23/04/98 per la laguna di Venezia,⁵⁴ dalla quinta alla decima colonna si trovano i valori di concentrazione (ppb) ottenuti come medie di zona per gli elementi analizzati; nell'ultima colonna sono riportati i valori del test ANOVA a singolo fattore con $\alpha = 0.05$, in grassetto sono evidenziati quelli che superano $F_{critico} = 4.39$.

Valori della statistica F superiori a 4.39, evidenziati in grassetto, indicano la presenza di un comportamento significativo dovuto alla zona mentre tale effetto risulta non presente per B, Na, P, Cr, Co, Ni, Ag e Cs. La seconda colonna riporta i valori limite di concentrazione per le acque marine definiti dalla legge americana;^{52,53} per i quali soltanto il Cu supera i valori limite. Nella terza e quarta colonna sono descritti i valori limite, e guida rispettivamente, di concentrazione degli elementi previsti dal Magistrato delle Acque per la laguna di Venezia.⁵⁴ Soltanto Sb e Mn nelle zone E ed F rientrano nei valori imposti dalla legge italiana; al contrario Al, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Ag, Sb e Pb sono, alcuni di molto, sopra i limiti di legge, da notare che tra di essi, Cr, Ni, Zn, As, Ag superano i valori della legge italiana ma rientrano in quella americana.

L'insieme di tutte le 12 misure ottenute sull'acqua della Laguna di Venezia possono essere riassunte sul piano delle prime due componenti principali. Nella rappresentazione delle componenti principali la percentuale di varianza spiegata dalla prima e dalla seconda componente è del 69.86%, la terza componente (9.1%) è risultata significativa. Il grafico mostra la formazione di quattro insiemi di oggetti costituiti dalle zone A, F, E e un gruppo che contiene le zone B,C e D. La zona F risulta la meno inquinata di metalli mentre la zona E ha contenuti significativi in Fe e Mn. La zona A contiene maggiori quantità di Pb, Ti, Co, Al, Ba e Cs mentre il gruppo delle zone B,C, D è più ricco in Na, K, Br, I, Mg, Ca, Sr, S, Rb. Gli elementi Ni, Cu, Cr, P e B non sono rappresentati in modo significativo nel piano delle prime due componenti.

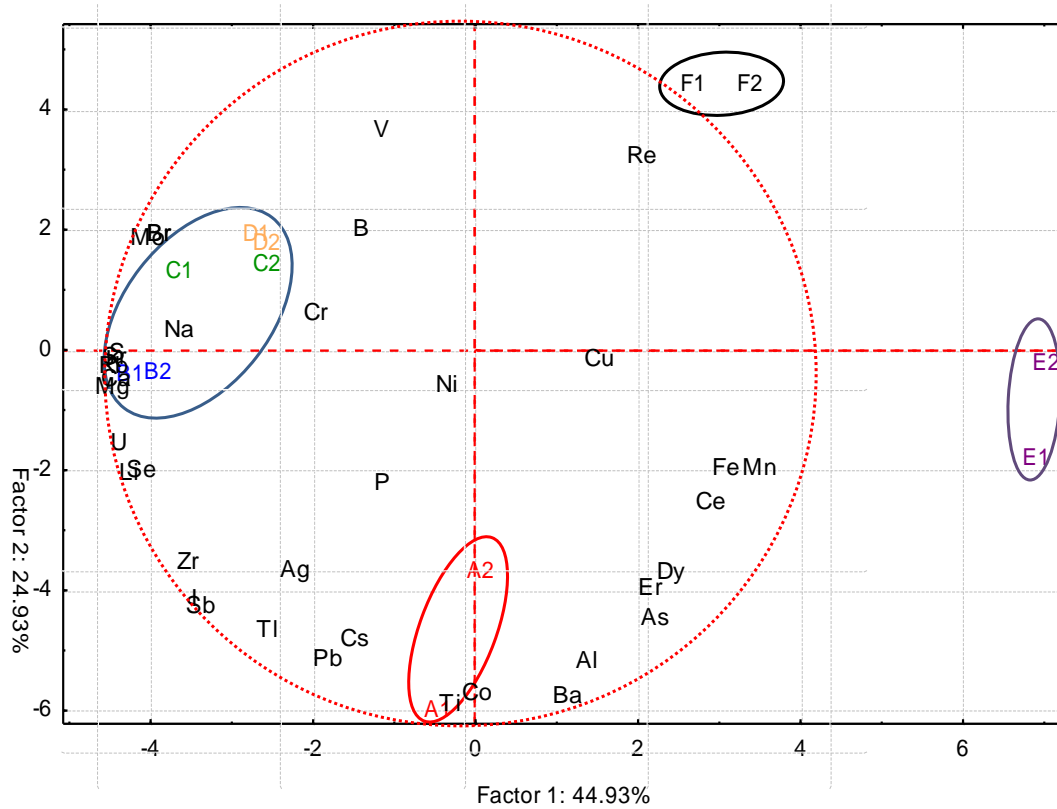


Figura 12. Rappresentazione PCA delle concentrazioni degli elementi nelle acque lagunari. Con il codice dei campioni d'acqua si identifica la posizione che assumono i campioni stessi nella rappresentazione PCA, dello stesso colore sono evidenziate le zone. Sono segnati i cluster formatisi.

Come dimostra la Tabella 12 delle correlazioni tra variabili e fattori la terza componente principale (PC) è correlata con B, V, Cr, Fe, Ni, Cu e Ce.

Componente	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
% varianza	44.31	25.18	13.78	6.77
Li	-0.93	-0.24	-0.21	0.11
B	-0.28	0.42	0.53	-0.06
Na	-0.79	0.16	0.30	-0.09
Mg	-0.96	-0.01	-0.27	0.03
Al	0.31	-0.82	-0.36	0.22
P	-0.23	-0.31	-0.41	0.45
S	-0.94	0.08	-0.32	0.03
K	-0.95	0.07	-0.29	0.02
Ca	-0.95	0.01	-0.31	0.03
Ti	-0.09	-0.91	0.18	0.27
V	-0.18	0.65	-0.67	-0.09
Cr	-0.40	0.17	-0.48	-0.12
Mn	0.80	-0.32	-0.45	0.03

Metodo di analisi degli elementi nelle alghe e nelle acque

Componente	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
Fe	0.72	-0.32	-0.57	0.05
Co	-0.01	-0.89	0.04	-0.44
Ni	-0.04	-0.06	-0.72	-0.26
Cu	0.38	0.00	-0.64	-0.58
As	0.48	-0.70	-0.06	0.46
Se	-0.90	-0.23	0.05	0.24
Br	-0.81	0.40	-0.40	0.00
Rb	-0.95	0.05	-0.29	0.00
Sr	-0.95	0.07	-0.29	0.00
Zr	-0.79	-0.48	0.27	0.16
Mo	-0.84	0.40	-0.30	-0.04
Ag	-0.50	-0.52	0.30	-0.57
Sb	-0.76	-0.61	0.15	-0.16
I	-0.77	-0.59	-0.03	-0.13
Cs	-0.35	-0.71	0.34	-0.48
Ba	0.24	-0.91	-0.07	0.12
Ce	0.67	-0.41	-0.56	0.09
Dy	0.55	-0.59	-0.42	-0.21
Er	0.50	-0.63	-0.39	-0.36
Re	0.50	0.58	0.30	-0.47
Tl	-0.58	-0.68	0.25	-0.31
Pb	-0.42	-0.76	0.37	0.20
U	-0.95	-0.16	-0.25	-0.03

Tabella 12. Tabella delle correlazioni tra fattori e variabili operate sui dati di concentrazione degli elementi nelle acque lagunari, in grassetto sono evidenziati i punteggi maggiori di |0.5| ottenuti dagli elementi nelle componenti calcolate.

Si procede ora con il confronto tra i limiti di legge evidenziati in Figura 13 e le concentrazioni determinate per gli elementi Pb e As.

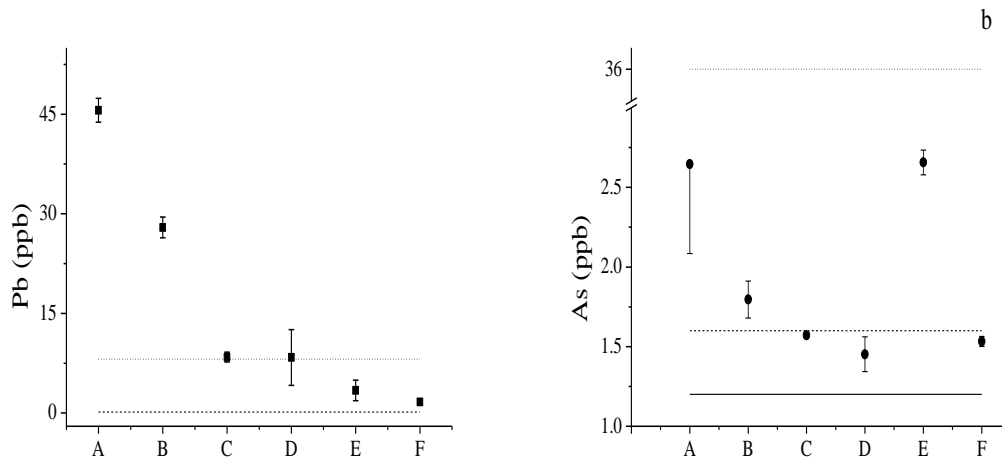


Figura 13. a) Concentrazioni medie per zona con barre di errore di Pb (ppb). Linea tratteggiata si riferisce al valore imperativo italiano (0.15ppb);⁵⁴ la linea punteggiata si riferisce al valore limite statunitense (8.1ppb).^{52,53} b) Concentrazioni medie per zona con barre di errore di As (ppb). Linea continua si riferisce al valore guida italiano (1.2 ppb);⁵⁴ la linea tratteggiata si riferisce al valore imperativo italiano (1.6 ppb);⁵⁴ la linea punteggiata si riferisce al valore limite statunitense (36 ppb).^{52,53}

La Figura 13 in a) mostra le concentrazioni medie con le barre di errore di Pb nelle diverse zone di campionamento A...F e i limiti di concentrazione previsti per la legge italiana e americana. È possibile notare come le zone A e B con maggior traffico di imbarcazioni mostrino concentrazioni di Pb che arrivano fino a 40 volte il limite di legge (imperativo) definito dal Magistrato delle Acque.⁵⁴ Tutte le zone risultano inquinate di Pb per la normativa italiana mentre solo le zone A e B superano i limiti rispetto alla normativa americana per le acque marine definita nel *Federal water pollution control act* del Novembre 2002.^{52,53}

In Figura 13 b) sono riportate le concentrazioni con le barre di errore di As nei campioni d'acqua analizzati, confrontati con il valore imperativo e il valore guida dettati dal D.M. 23 Aprile 1998;⁵⁴ risultano superiori al primo per le zone A, B ed E e compresi tra il primo valore limite e il secondo valore guida per le zone C, D ed F. Tutti i risultati ottenuti sono in concentrazione di gran lunga inferiore a quella massima prevista dalla legge degli Stati Uniti per la salvaguardia della salute umana.^{52,53} Nel complesso, tutti gli elementi analizzati per i quali sono definiti dei

valori limite con il D.M. 23/04/98 sono in concentrazione superiore come è possibile vedere dalla Tabella 11.⁵⁴

5.2. Analisi degli elementi nelle alghe lagunari

In Tabella 13 vengono riportati i valori dei recuperi ottenuti sui diversi elementi analizzati nelle alghe mediante la procedura descritta al Paragrafo 3.3.

R1 ed R2 sono i recuperi calcolati su spot di soluzione multistandard a basse (10 ppb) e alte concentrazioni (100 ppb) rispettivamente. R3 riporta le percentuali di recupero per gli elementi in presenza di una piccola quantità d'alga a cui è stata aggiunta un'aliquota di standard multielemento.

M	R1	R2	R3	M	R1	R2	R3
B	n	109	130*	Zr	108	109	108
Na	n	123	n	Mo	105	104	104
Mg	n	102	110*	Cd	105	95	77
Al	36	59	n	Sn	98	94	96
P	n	64	79*	Te	n	n	n
S	n	n	n	I	n	50	55
K	n	72	120*	Cs	106	98	86
Ca	73	102	110*	Ba	105	94	86
Ti	n	112	115	La	108	99	87
Cr	115	103	92	Ce	108	98	87
Mn	113	102	127*	Pr	107	97	84
Fe	n	114	n	Nd	105	98	87
Co	111	106	91	Sm	104	99	87
Ni	112	101	78	Gd	104	100	94
Cu	112	105	92	Dy	104	97	89
Zn	116	101	83	Er	103	98	91
Ga	111	101	88	Yb	102	97	90
As	112	99	89	W	62	54	100
Se	109	97	85	Pb	102	97	84
Br	30	45	37	Th	110	96	85
Rb	111	102	91	U	106	95	85
Sr	109	100	116	Ge	107	96	86

Tabella 13. Percentuali di recupero degli elementi analizzati nelle alghe e nelle acque. Nelle colonne R1 ed R2 si trovano le percentuali di recupero dell'analisi di

elementi rispettivamente a basse concentrazioni (10 ppb) e alte concentrazioni (100 ppb). In colonna R3 si trovano le percentuali di recupero calcolate in prove in cui è stata addizionata una quantità nota d'alga. Le percentuali asteriscate si riferiscono a recuperi su concentrazioni nominali di 60 ppb e 600 ppb.

La maggior parte degli elementi analizzati mostrano recuperi compresi nell'intervallo tra l'80% e il 110% ritenuto valido dalle normative EURACHEM (e UNICHIM).

Il recupero sull'Ag è vicino al 100% nel caso R1 e R2 ma diventa il 2% nel caso R3. Un recupero basso può essere giustificato dalla presenza di alogenuri nell'alga che favoriscono la precipitazione del metallo come AgX.

Gli elementi B, Mg, K, Ca, Mn, Sr, mostrano recuperi maggiori di 110% a causa della loro elevata concentrazione nelle alghe rispetto all'aggiunta di standard operata. Gli elementi P, Br, I, Al, Ni e W mostrano recuperi inferiori al 80%. Il P, con ICP-MS, è difficilmente determinabile a bassi livelli di concentrazione, mentre bassi recuperi su I, Br sono dovuti alle perdite di I₂ e Br₂ che si formano durante la digestione. L'Al e W in HNO₃ formano ossidi stabili mentre il Ni forma nitrati volatili che contribuiscono ad abbassare il recupero totale. Complessivamente l'attacco con HNO₃ può ritenersi la procedura adeguata per l'analisi complessiva di molti elementi sempre tenendo conto delle specificità di ognuno di loro. Alcuni recuperi in R3 di elementi molto concentrati nell'alga (Mg, Ca, Na, S, P, Mn) non sono significativi a causa della variabilità sperimentale che ha mascherato la capacità di valutare l'aggiunta operata.

La tabella seguente riporta un riassunto completo dei dati ottenuti dall'analisi dei campioni di alga *Sargassum muticum* e *Undaria pinnatifida* della Laguna Veneta e Wakame, alga commerciale acquistata in negozio.

Elemento	%p/p	CV _D %	%p/p	CV _T %	%p/p	CV _T %	R	R	%p/p
	Wakame		SM		UP		SM/UP	W/UP	LOQ
H*	4.32		5.6	1	5.7	1	1		
B	3.5E-02	8	6.6E-03	25.8	1.9E-03	28.0	3.4	18	6.E-06
C*	24.21		37.9	1	38.9	1			
N*	2.52		2.9	0.5	4.4	0.5			
Na	7.2E+00	5	0.56	28.2	1.3	14.4	0.4	5.5	2.E-03
Mg	8.8E-01	5	1.1	12.2	0.85	9.8	1.3	1.0	2.E-05

Metodo di analisi degli elementi nelle alghe e nelle acque

	%p/p	CV _D %	%p/p	CV _T %	%p/p	CV _T %	R	R	%p/p
Elemento	Wakame		SM		UP		SM/UP	W/UP	LOQ
Al	2.4E-04	7	5.2E-02	59.4	7.4E-03	137.4	7.1	0.03	1.E-04
P	3.5E-01	10	0.12	20.0	0.27	17.9	0.5	1.3	8.E-04
S	2.7E+00	6	1.4	11.4	1.2	9.6	1.1	2.2	1.E-03
S*	0.81		0.8	10	0.6	11			
K	1.4E+01	6	1.2	22.4	1.0	17.3	1.2	14	2.E-05
Ca	1.5E+00	5	2.8E-01	12.6	2.5E-01	15.1	1.1	6.0	1.E-05
Ti	6.8E-05	21	3.3E-04	111.2	1.2E-04	112.0	2.7	0.57	2.E-05
Cr	3.7E-05	10	6.2E-05	29.6	2.6E-05	70.7	2.4	1.4	3.E-06
Mn	5.0E-04	5	2.1E-02	42.5	7.9E-04	46.2	26.6	0.63	4.E-06
Fe	3.9E-03	8	4.2E-02	52.4	1.3E-02	62.1	3.4	0.30	1.E-05
Co	1.6E-05	8	1.8E-04	44.2	3.1E-05	38.1	5.6	0.52	8.E-07
Ni	5.4E-05	15	1.7E-03	18.4	1.0E-03	68.1	1.7	0.05	6.E-06
Cu	6.2E-05	14	4.8E-04						7.E-06
Zn	1.3E-03	7	3.8E-03	21.7	5.2E-03	42.1	0.7	0.25	5.E-06
Ga	1.2E-04	34	6.3E-05	144.0					4.E-06
As	3.0E-03	8	1.4E-03	29.2	1.3E-03	11.1	1.0	2.31	5.E-07
Se	1.7E-05	29	4.0E-06	38.3					5.E-06
Br	1.24E-01	12	9.6E-03	21.3	4.0E-02	56.2	0.2		5.E-05
Rb	4.1E-03	17	2.1E-04	57.0	4.4E-04	14.3	0.5	9.3	3.E-06
Sr	8.3E-02	5	1.1E-01	13.1	1.1E-01	17.0	1.0	0.75	3.E-06
Zr	4.1E-05	10	4.9E-05	32.5					6.E-07
Mo	6.0E-06	15	1.9E-05	18.5					2.E-06
Cd	1.2E-05	10	5.0E-05	17.9	9.4E-06	45.5	5.3	1.3	9.E-07
Sn	2.3E-05	11	2.3E-05	31.2	1.1E-06	31.8	20.8	21	1.E-06
Te	9.6E-04	30	7.5E-03	46.5	1.3E-02	13.7	0.6	0.07	8.E-06
I	1.64E-02	34	3.7E-03	21.7	2.4E-02	41.4	0.2		1.E-05
Cs	1.0E-05	8	9.0E-06	59.3	2.3E-06	37.3	3.8	4.3	5.E-06
Ba	7.4E-04	7	3.1E-03	29.8	3.3E-03	40.9	0.9	0.22	9.E-06
La	5.5E-07	10	2.0E-05	59.9	5.1E-06	137.2	4.0	0.11	5.E-07
Ce	1.8E-06	8	4.1E-05	50.7	1.4E-05	87.9	2.9	0.13	5.E-07
Pr	n	9	4.3E-06	61.1	3.8E-06		1.1		4.E-07
Nd	5.2E-06	8	1.9E-05	55.6	1.0E-05	54.4	1.8	0.52	7.E-07
Sm	5.6E-06	8	3.8E-06	60.4	3.8E-06		1.0	1.5	6.E-07
Gd	n	10	4.3E-06	50.7	4.0E-06		1.1		5.E-07
Dy	2.7E-06	6.3	3.4E-06	50.0	3.1E-06		1.1	0.87	5.E-07
Er	3.9E-06	8.2	1.5E-06	83.6					4.E-07

Metodo di analisi degli elementi nelle alghe e nelle acque

Elemento	%p/p	CV _D %	%p/p	CV _T %	%p/p	CV _T %	R	R	%p/p
	Wakame		SM		UP		SM/UP	W/UP	LOQ
Yb	2.2E-06	5.2	7.3E-07	167.3					6.E-06
W	1.0E-06	32.5	2.0E-06	24.3					5.E-07
Pb	3.9E-05	21.6	2.0E-04	34.8	2.8E-04	169.9	0.7	0.14	4.E-06
Th	2.6E-06	12.4	4.8E-06	92.5					4.E-07
U	1.1E-05	9.4	2.6E-05	25.4	3.5E-05	33.8	0.7	0.31	2.E-07
Ge	4.4E-05	8			5.0E-05	40		0.88	1.E-06

*Tabella 14. Nella seconda, quarta e sesta colonna si trovano rispettivamente le concentrazioni in %p/p degli elementi analizzati, considerando i valori mediani complessivi delle alghe commerciali (Wakame), Sargassum muticum e Undaria pinnatifida, per ognuna di queste è stato calcolato il coefficiente di variazione percentuale (CV_T%) sulla variabilità totale delle misur; per l'alga commerciale il coefficiente di variazione percentuale si riferisce alla procedura di digestione adottata (CV_D%), Nell'ottava e nona colonna si trovano i rapporti (R) delle concentrazioni di ogni elemento rispettivamente SM/UP e W/UP. Nell'ultima colonna sono riportati i limiti di quantificazione (L.d.Q) in %p/p. *Elementi determinati con l'analisi elementare.*

Nella Tabella 14 si trovano, per ogni elemento analizzato, i valori di concentrazione medi nel Wakame (alga commerciale), in SM e in UP (%p/p). Nella terza colonna ci sono i coefficienti di variazione percentuale (CV%_D) riferiti all'alga commerciale, ottenuti dalla variazione di cinque misure fatte sullo stesso campione, essi sono a carico della procedura di digestione. Nella quinta e settima colonna si trovano i CV%_T riferiti alle misure fatte sulle alghe nelle diverse zone per la specie SM e UP; i coefficienti comprendono la variabilità del campionamento e della zona. Nelle colonne ottava, nona e decima sono riportati rispettivamente i rapporti tra le concentrazioni di SM/UP e W/UP e i limiti di quantificazione di ciascun elemento. Si può notare come per molti elementi la variabilità del processo di digestione sia intorno al 10% e che le percentuali più alte di variabilità siano degli elementi in basse concentrazioni. Confrontando i coefficienti di variazione degli elementi nelle alghe SM e UP si nota come questi siano molto più elevati di quelli dovuti alla sola procedura di digestione che quindi risulta accettabile. I CV% sono più elevati tanto da superare il 100% per elementi presenti in piccole quantità nei campioni come Ti, Yb, Gd per l'alga SM e Al, Ti, Cr e Pb per l'alga UP, nella maggior parte dei casi ciò avviene se la concentrazione misurata è comparabile con il limite di quantificazione. I rapporti effettuati tra le concentrazioni degli elementi nelle due specie d'alga evidenziano come Al, Mn, Co, Cd e Sn si trovino nella specie SM almeno in

concentrazione 5 volte superiore rispetto a UP; B, Ti, Cr, Fe, Ni, Cs, La e Nd siano in SM almeno 2 volte più concentrati che in UP; altri elementi quali P, Zn, Br, Rb, Te, I, Ba, Pb, U si trovino in concentrazione minore in SM rispetto ad UP, i rimanenti invece diano rapporti di circa 1.

Confrontando i rapporti tra Wakame/Up è possibile notare che elementi come Na e K sono in quantità rilevanti e superiori nell'alga commerciale rispetto a quella raccolta in Laguna, questo si può attribuire all'aggiunta di conservanti. Altri elementi quali B, Ca, Rb, Sn e Ce sono in concentrazione maggiore nell'alga commerciale a differenza di Al, Ti, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Rb, Te, Ba, La, Ce, Nd, Dy, Pb, Ge e U che sono in concentrazioni da 10 a 100 volte inferiori.

Il confronto tra l'analisi delle acque e quello delle alghe permette di notare che nelle alghe non sono presenti Li, V, Ag, Sb, Re invece riscontrati nelle acque e viceversa, nelle acque non si trovano Ga, Cd, Sn, Te, La, Pr, Nd, Sm, Gd, Dy, Er, Yb, W, Th, Ge invece misurate nelle alghe. L'effetto di bioconcentrazione è visibile per Al, Ti, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb, Sr, Zr, Mo, Ce, Ba, Pb e U che risultano da 10 a 100 volte più concentrati rispetto all'acqua. In realtà non esistono chiare correlazioni tra le concentrazioni degli elementi nelle alghe e quelli nell'acqua, questo può indicare che le alghe accumulano metalli soprattutto dal substrato solido dove sono aggrappate, più che dall'acqua nella quale sono immerse.

In Tabella 15 sono riportati i valori della statistica F ottenuta dall'analisi della varianza (ANOVA). L'ANOVA è a due fattori ("fattore zona" e "fattore specie") con replica (5 campionamenti per zona), ed è applicata alle percentuali in peso ottenute degli elementi contenuti nei campioni d'alga SM e UP.

fattore	zona	specie	interazione
critico	2.409	4.043	2.409
B	0.329	22	1.611
Na	1.020	74	2.247
Mg	3.299	57	1.653
Al	2.529	26	2.929
P	2.190	185	1.500
S	3.141	18	2.576

Metodo di analisi degli elementi nelle alghe e nelle acque

fattore	zona	specie	interazione
critico	2.409	4.043	2.409
K	2.704	4.1	3.103
Ca	1.302	6.8	0.861
Ti	2.889	37	2.796
V	2.953	33	3.559
Cr	2.218	0.2	2.568
Mn	7.054	138	7.704
Fe	2.362	21	2.950
Co	6.390	82	6.212
Ni	1.149	0.85	1.496
Cu	1.554	6.5	1.342
Zn	4.204	4.9	4.425
As	0.864	13	4.860
Br	1.283	21	1.479
Rb	4.522	13	1.659
Sr	0.374	0.23	1.344
Zr	0.892	2.5	1.127
Ag	0.122	3.2	1.006
Cd	0.676	286	1.324
Sn	2.812	17.5	1.921
I	10.5	54.4	3.283
Cs	1.954	32.9	2.530
La	1.635	17.4	2.018
Ce	1.932	23.3	2.106
Pr	3.367	11.2	1.741
Nd	1.957	0.89	1.141
Pb	7.064	2.8	5.111
U	5.604	15	3.102
Dy	2.756	0.43	0.158

Tabella 15. ANOVA a due fattori con replica (5 campionamenti per zona);, "fattore specie" e "fattore zona" con livello di significatività $\alpha = 0.05$. Il valori evidenziati in grassetto sono quelli che superano l' F critico.

In grassetto sono evidenziati i valori della statistica F che superano il valore critico ad un livello di significatività $\alpha = 0.05$. Gli elementi Cr, Ni, Sr, Zr e Ag presentano valori della statistica F minori di quello critico indicando che le loro concentrazioni sono indipendenti dalla zona e dalla specie di alga analizzata. Tutti gli altri elementi invece hanno almeno uno dei due fattori superiori al valore di F critico, alcuni anche di molto, come ad esempio Mn, P e Cd.

Per poter sintetizzare la mole di dati è stata eseguita una PCA; in Figura 14 e Figura 15 vengono riportati rispettivamente i "loading" e gli "score" ottenuti, nel piano delle prime due componenti principali. La prima componente (PC1) rappresenta il 34.4% della variabilità dei dati, la seconda componente (PC2) il 12.3% e le altre riportate rispettivamente il 9.5% e 7.4%.

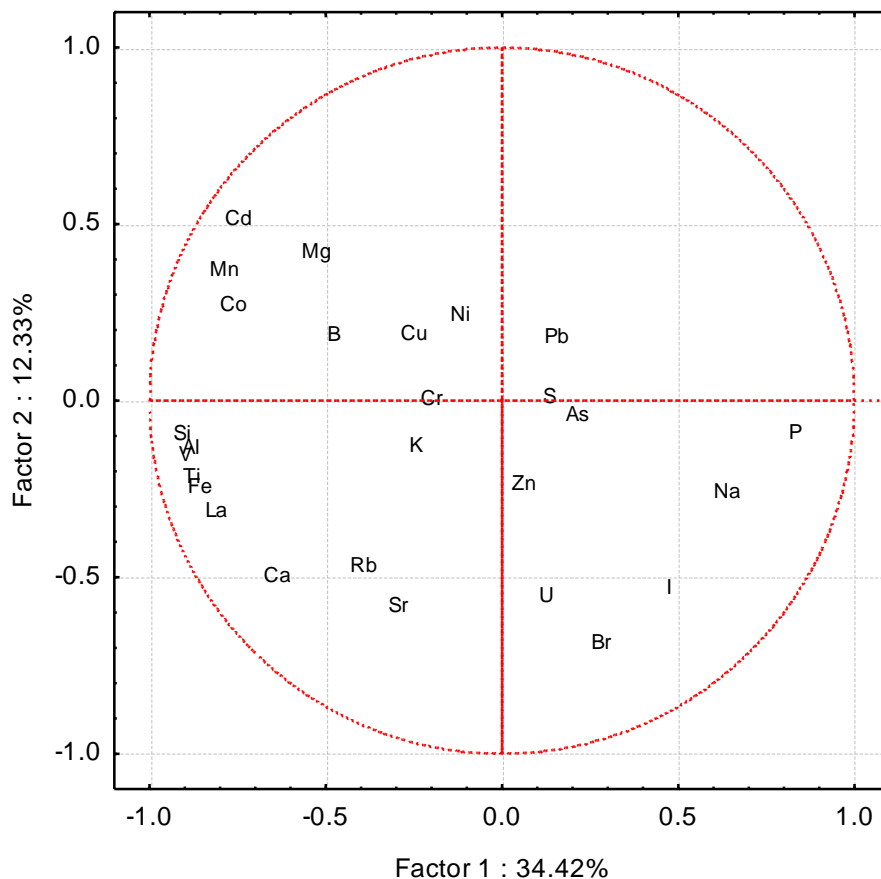


Figura 14. Rappresentazione PCA degli elementi analizzati nei campioni d'alga. In ascissa si trova il Fattore 1 che rappresenta il 34.42% della varianza totale e in ordinata il Fattore 2 che ne rappresenta il 12.33%.

Al centro del grafico dei “loading” si trovano le variabili scarsamente rappresentate come Cu, Ni, Cr, K, Zn, S, As e Pb, contrariamente agli elementi Mn, Mg, Co e Cd, Si, Al, V, Fe, La e Ca che hanno un modulo vicino all’unità, infatti più il vettore dei “loading” si trova vicino alla circonferenza (cerchio rosso con raggio unitario) più esso è rappresentato nel piano della PCA. Questi elementi sono anticorrelati con la prima componente mentre P e Na sono invece correlati positivamente. La seconda componente è anticorrelata con I e Br. La terza e la quarta componente principali non possono essere ritenute trascurabili e sono rappresentate da K, Cr, Zn e Pb l’una e S, As e Sr l’altra.

Si riporta quindi una rappresentazione PCA comprensiva di tutti i campioni.

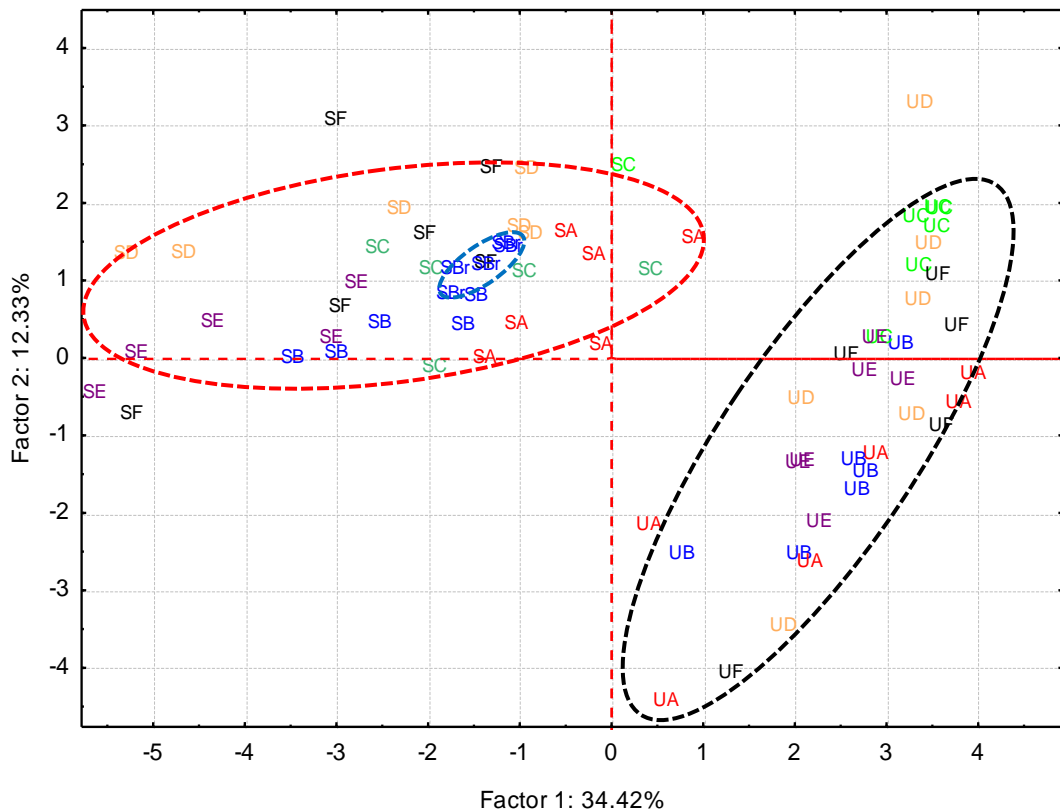


Figura 15. Grafico degli “score” di 60 campioni di alghe UP e SM. La prima lettera dei punti introdotti nel grafico identifica la specie S per *Sargassum muticum* e U per *Undaria pinnatifida*; la seconda lettera e il colore riporta la zona di campionamento. Con linee tratteggiate sono evidenziati i cluster di alga formati nel piano delle prime due componenti principali. Il cerchio blu indica la variabilità dovuta alla procedura analitica, il cerchio rosso circonda gli oggetti di SM mentre quello nero contiene gli oggetti di UP.

In Figura 15 sono riportati gli “score” della rappresentazione PCA di 60 campioni algali campionati nelle zone A, B, C, D, E e F sia di alga SM che UP. È visibile la formazione di due “cluster” di oggetti che racchiudono le due specie algali. Il “cluster” della specie UP si trova a destra del piano dove i “loading” di I, Be, Na e P aumentano mentre il “cluster” di SM si trova a sinistra del piano in corrispondenza di un aumento della maggior parte degli elementi. Passando dalla zona A, C, B, F, D e E dell’alga SM si ha uno spostamento verso sinistra degli oggetti indicando un chiaro effetto della zona sul contenuto di elementi. L’insieme di oggetti SB circoscritti all’interno dell’ellisse blu dà un’indicazione della variabilità dovuta alla procedura di digestione del campione, che risulta più contenuta rispetto alla variabilità dovuta al campionamento all’interno della stessa zona.

In Tabella 16 sono riportati i valori di correlazione tra variabili e le prime 4 componenti principali risultate da un test statistico significative. In grassetto sono evidenziati i valori di correlazione che superano |0.5|. La terza componente è correlata da K, Cr, Zn e Pb mentre la quarta da S, As e Sr.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
% varianza	34.4	12.3	9.5	7.4
B	-0.48	0.15	0.00	0.11
Na	0.63	-0.30	0.24	-0.11
Mg	-0.53	0.38	0.08	0.43
Al	-0.89	-0.17	-0.15	-0.26
Si	-0.91	-0.13	-0.12	-0.14
P	0.82	-0.13	-0.03	-0.21
S	0.13	-0.03	-0.40	0.53
K	-0.25	-0.17	0.78	0.34
Ca	-0.65	-0.53	0.22	0.30
Ti	-0.89	-0.25	-0.13	-0.23
V	-0.91	-0.19	-0.15	-0.25
Cr	-0.21	-0.03	-0.65	0.24
Mn	-0.80	0.33	-0.03	0.13
Fe	-0.87	-0.28	-0.17	-0.27

Metodo di analisi degli elementi nelle alghe e nelle acque

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
%varianza	34.4	12.3	9.5	7.4
Co	-0.77	0.23	-0.05	0.17
Ni	-0.12	0.20	-0.26	0.16
Cu	-0.26	0.15	-0.04	-0.09
Zn	0.05	-0.27	-0.55	0.36
As	0.21	-0.08	-0.10	0.51
Br	0.28	-0.72	-0.26	-0.08
Rb	-0.40	-0.51	0.47	-0.04
Sr	-0.30	-0.62	0.15	0.58
Cd	-0.76	0.48	0.13	0.22
I	0.47	-0.57	-0.36	0.08
La	-0.82	-0.35	-0.14	-0.23
Pb	0.15	0.14	-0.53	-0.04
U	0.12	-0.59	0.13	0.11

Tabella 16. Score ottenuti dall'analisi delle componenti principali, in grassetto sono evidenziati quelli maggiori di |0.5|.

6. Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state studiate le procedure analitiche per la determinazione della composizione di due specie algali alloctone campionate in sei zone differenti della laguna di Venezia. In particolare si sono determinate le concentrazioni di 54 elementi in 60 campioni di alghe brune delle specie *Sargassum muticum* e *Undaria pinnatifida*.

La prima procedura analitica studiata riguarda la determinazione della concentrazione totale di iodio nelle alghe con l'uso dell'ICP-MS. La complicazione che emerge riguarda il fatto che lo iodio presenta sensibilità di risposta differenti all'ICP-MS in funzione della struttura molecolare in cui si trova. In particolare la sensibilità di calibrazione dipende sia dallo stato di ossidazione dello iodio I_2 , I^- , IO_3^- e IO_4^- sia dal tipo di solvente in cui sono disciolte le specie contenenti lo iodio. In particolare, l'aumento della concentrazione di acido nitrico da 0%, 1% al 5% in peso produce una perdita significativa nella sensibilità di risposta di KI e una minore perdita è misurata anche per le restanti forme molecolari. L'assenza della possibilità di prevedere la speciazione dello iodio dopo la digestione dell'alga ha come conseguenza l'impossibilità di operare una corretta calibrazione. In particolare, in questo lavoro di tesi, test di recupero dello iodio dopo digestione acida con microonde di differenti sali di iodio hanno potuto confermare un comportamento insolito dell' HNO_3 concentrato che, sottoposto a certe condizioni operative di pressione e temperatura, può manifestare un comportamento sia ossidante che riducente. La formazione quindi di I_2 prodotto dell'ossidazione di I^- e/o dalla riduzione di IO_3^- o IO_4^- ha creato l'ulteriore problema della perdita di iodio sia nella fase di digestione come I_2 volatile, sia nella fase di nebulizzazione nella spray chamber dell'ICP-MS. Questo lavoro di tesi ha risolto il problema del recupero dello iodio totale bloccando lo iodio molecolare nella forma di complesso con i cloruri (I_2Cl) operando una digestione in acqua regia. Risultati eccellenti si sono trovati facendo precipitare lo ioduro e lo iodato come sali d'argento aggiungendo nella digestione l' $AgNO_3$ evitando così la formazione di iodio molecolare. Il problema delle differenti sensibilità di calibrazione è stato risolto trovando un ambiente che

Conclusioni

minimizzasse tale differenza costituito da un solvente di HNO₃ all'1% in peso contenente 0.1 moli/L di NH₄SCN.

La seconda parte di questa tesi riguarda la determinazione quantitativa di 54 elementi costituiti dalle alghe. L'attacco acido che ha prodotto il miglior risultato è stato di solo HNO₃ concentrato. I recuperi ottenuti su un'aggiunta di standard multielemento ad un'aliquota di campione di alga hanno dato valori tutti intorno al 100%. Questo approccio non funziona per gli alogenuri (recuperi < 50%) come dimostrato nella prima sessione e per P, Al e W. Il recupero per W e Al è inferiore al 50% a causa della formazione di ossidi non solubili. La composizione elementare trovata dimostra una significativa differenza tra le due specie algali indagate, tanto che nel piano delle prime due componenti principali si evidenzia la formazione di due insiemi appartenenti alle due alghe. Interessante notare che tra le variabili che contribuiscono a differenziare le due alghe c'è lo iodio che risulta circa 6 volte superiore in *Undaria pinnatifida* la cui concentrazione mediana di iodio totale è pari a 0.024% in peso rispetto all'alga secca. L'analisi delle componenti principali ha permesso di visualizzare la distribuzione delle misure di campioni algali fatte sulle differenti zone di campionamento notando che esiste una correlazione tra zona e concentrazioni degli elementi. La dispersione degli oggetti nel piano delle componenti principali è da attribuire ad un effetto associato al campionamento e alla zona di campionamento poiché l'errore associato alla procedura analitica si è dimostrato essere marginale. L'analisi dei campioni di acqua infine non mostra nessuna correlazione con quella delle alghe campionate nelle stesse zone dimostrando che le alghe accumulano metalli soprattutto dal substrato solido dove sono aggrappate più che dall'acqua nella quale sono immerse. Rilevante è la quantità di elementi tossici come Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Ag e Pb che superano abbondantemente i livelli massimi previsti dal decreto legge ministeriale (D.M. 23 Aprile 1998), soprattutto nelle zone di campionamento prossime ai porti.

Bibliografia

1. Caliceti, M., Argese, E., Sfriso, A. & Pavoni, B. Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. *Chemosphere* **47**, 443–454 (2002).
2. Curiel, D. & Marzocchi, M. Stato delle conoscenze nella laguna di Venezia di due alien species: *Undaria pinnatifida* e *Sargassum muticum*. *Soc. Ven. Sc. Nat.* **35**, 93 – 106 (2010).
3. Curiel, D., Guidetti, P., Bellemo, G., Scattolin, M. & Marzocchi, M. The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the lagoon of Venice. *Hydrobiologia* **477**, 209–219 (2002).
4. Solazzi D., Volpe S., Curiel D. & Rismondo A. Segnalazione di *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar a Chioggia (Laguna di Venezia). *Soc. Veneziana Sci. Nat.* **18**, (1993).
5. Farnham, W. F., Fletcher, R. L. & Irvine, L. M. Attached sargassum found in Britain. *Nature* **243**, 231–232 (1973).
6. Baer, J. & Stengel, D. B. Variability in growth, development and reproduction of the non-native seaweed *Sargassum muticum* (Phaeophyceae) on the Irish west coast. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **90**, 185–194 (2010).
7. Kumar, C. S., Ganesan, P., Suresh, P. V. & Bhaskar, N. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds - A review. *J. Food Sci. Technol.* **45**, 1–13 (2008).
8. Fung, A., Hamid, N. & Lu, J. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem.* **136**, 1055–1062 (2013).
9. Piovan, A., Seraglia, R., Bresin, B., Caniato, R. & Filippini, R. Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: Photostability and Coextractive Effects. *Molecules* **18**, 6298–6310 (2013).
10. Anderson, M. A., Morel, F. M. M. & Guillard, R. R. L. Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature* **276**, 70–71 (1978).
11. Muse, J. . *et al.* Seaweeds in the assessment of heavy metal pollution in the Gulf San Jorge, Argentina. *Environ. Pollut.* **104**, 315–322 (1999).

12. Fuge, R. & James, K. H. Trace metal concentrations in *Fucus* from the Bristol channel. *Mar. Pollut. Bull.* **5**, 9–12 (1974).
13. Sfriso, A. & Facca, C. Annual growth and environmental relationships of the invasive species *Sargassum muticum* and *Undaria pinnatifida* in the lagoon of Venice. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **129**, 162–172 (2013).
14. Hays, M. T. Estimation of Total Body Iodine Content in Normal Young Men. *Thyroid* **11**, 671–675 (2001).
15. Istituto Superiore di Sanità. Osservatorio Nazionale per il Monitoraggio della Iodoprofilassi in Italia.
16. Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V. & Bermejo-Barrera, P. A review on iodine speciation for environmental, biological and nutrition fields. *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, 2107–2152 (2011).
17. *Disposizioni finalizzate alla prevenzione del gozzo endemico e di altre patologie da carenza iodica.* (2005).
18. World Health Organization. *Trace elements in human nutrition and health.* (1996).
19. Hou, X. & Yan, X. Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *Sci. Total Environ.* **222**, 141–156 (1998).
20. Hou, X., Chai, C., Qian, Q., Yan, X. & Fan, X. Determination of chemical species of iodine in some seaweeds (I). *Sci. Total Environ.* **204**, 215–221 (1997).
21. Holak, W. Determination of iodine in foods by cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.* **59**, 2218–2221 (1987).
22. Pavel, J., Fille, M. & Frey, U. Determination of iodine in biological materials and in some standard reference materials by X-ray fluorescence spectrometry. *Fresenius Z. Für Anal. Chem.* **331**, 51–54 (1988).
23. Ozaki, H. & Ebihara, M. Determination of trace halogens in rock samples by radiochemical neutron activation analysis coupled with the k₀-standardization method. *Anal. Chim. Acta* **583**, 384–391 (2007).
24. Huang, M. D. *et al.* Determination of iodine via the spectrum of barium monoiodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **64**, 697–701 (2009).

25. Yoshida, S., Muramatsu, Y., Katou, S. & Sekimoto, H. Determination of the chemical forms of iodine with IC-ICP-MS and its application to environmental samples. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **273**, 211–214 (2007).
26. Fukushi, K. & Hiroy, K. Simultaneous determination of bromide and iodide ions by capillary isotachopheresis using quaternary ammonium salts. *J. Chromatogr. A* **760**, 253–258 (1997).
27. Reddy Noone, K., Jain, A. & Verma, K. K. Liquid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of bromate, iodate, bromide and iodide in high-chloride matrix. *J. Chromatogr. A* **1148**, 145–151 (2007).
28. Vtorushina, E. A., Saprykin, A. I. & Knapp, G. Optimization of the conditions of oxidation vapor generation for determining chlorine, bromine, and iodine in aqueous solutions by inductively coupled plasma atomic-emission spectrometry. *J. Anal. Chem.* **63**, 643–648 (2008).
29. Shah, M., Wuilloud, R. G., Kannamkumarath, S. S. & Caruso, J. A. Iodine speciation studies in commercially available seaweed by coupling different chromatographic techniques with UV and ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 176–182 (2005).
30. Fecher, P. A., Goldmann, I. & Nagengast, A. Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. *J. Anal. At. Spectrom.* **13**, 977–982 (1998).
31. Knapp, G., Maichin, B., Fecher, P., Hasse, S. & Schramel, P. Iodine determination in biological materials Options for sample preparation and final determination. *Fresenius J. Anal. Chem.* **362**, 508–513 (1998).
32. Romarís–Hortas, V. *et al.* Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed. *Food Chem.* **124**, 1747–1752 (2011).
33. Gamallo Lorenzo, D., Barciela-Alonso, M. del C., Moreda Piñeiro, A., Bermejo Barrera, A. & Bermejo Barrera, P. Microwave-assisted alkaline digestion combined with microwave-assisted distillation for the determination of iodide and total iodine in edible seaweed by catalytic spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* **542**, 287–295 (2005).
34. Thomas, R. *Practical guide to ICP-MS*. (Marcel Dekker, Inc., 2004).

Bibliografia

35. Skoog, A. D., Holler, F. J. & Crouch, R. S. *Chimica Analitica Strumentale*. (EdiSES S.r.l., 2009).
36. Hoz, A. de la, Díaz-Ortiz, Á. & Moreno, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 164–178 (2005).
37. Lambie, K. J. & Hill, S. J. Microwave digestion procedures for environmental matrices. Critical Review. *Analyst* **123**, 103R–133R (1998).
38. Pella, E. & Colombo, B. Study of carbon, hydrogen and nitrogen determination by combustion-gas chromatography. *Microchim. Acta* **61**, 697–719 (1973).
39. Hubaux, A. & Vos, G. Decision and detection limits for calibration curves. *Anal. Chem.* **42**, 849–855 (1970).
40. Fabbris, L. *Statistica multivariata. Analisi esplorativa dei dati*.
41. *Handbook of Chemistry and Physics*. (CRC, 1972).
42. Stern, S. A., Mullhaupt, J. T. & Kay, W. B. The Physicochemical Properties of Pure Nitric Acid. *Chem. Rev.* **60**, 185–207 (1960).
43. F. A. Cotton, G. Wilkinson. (Casa Editrice Ambrosiana, 1984).
44. Lee, J. D. (Piccin-Nuova Libreria, 2000).
45. Novick, S. E., Howard, B. J. & Klemperer, W. Polymerization of Nitrogen Dioxide. *J. Chem. Phys.* **57**, 5619–5620 (1972).
46. Reid, H. *et al.* Determination of iodine and molybdenum in milk by quadrupole ICP-MS. *Talanta* (2007). doi:10.1016/j.talanta.2007.10.051
47. Vanhoe, H., Van Allemeersch, F., Versieck, J. & Dams, R. Effect of solvent type on the determination of total iodine in milk powder and human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* **118**, 1015–1019 (1993).
48. Izmer, A. V., Boulyga, S. F. & Becker, J. S. Determination of ¹²⁹I/¹²⁷I isotope ratios in liquid solutions and environmental soil samples by ICP-MS with hexapole collision cell. *J. Anal. At. Spectrom.* **18**, 1339–1345 (2003).
49. Sun, M., Gao, Y., Wei, B. & Wu, X. Determination of iodine and bromine in coal and atmospheric particles by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **81**, 473–476 (2010).
50. Charlot, G. *Analisi chimica qualitativa. Equilibri in soluzione*. (1977).

Bibliografia

51. Ispettorato Generale per la laguna di Venezia, Marano e Grado. La rete di monitoraggio SAMANET della qualità delle acque della laguna di Venezia. (2008).
52. *Water quality standards. 33 USC 1251et Seq*
53. *Federal Water Pollution Control Act Amendments of 1972. 33 USC Ch 23 § 1151*
54. *Requisiti di qualità delle acque e caratteristiche degli impianti di depurazione per la tutela della laguna di Venezia. 498H23AP.9.8*

Bibliografia

A mamma e papà

*A tutti quelli che hanno portato con me
la borsa da spiaggia
e le ciabatte infradito*