



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

INCENDI, ROGHI E INQUINAMENTO

Le nuove frontiere ambientali delle scienze forensi

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Dipartimento di Chimica
Corso di Dottorato in Scienze Chimiche 34° Ciclo

Simona Teodori
Matricola 699723

Relatore
Prof. Stefano Materazzi

A.A. 2020-2021

INDICE

Premessa e Scopo del lavoro	4
1. Introduzione.....	8
1.1 I contaminanti organici persistenti (POPs)	8
1.1.1 IPA.....	11
1.1.2 PCB	16
1.1.3 Diossine e Furani	19
1.1.4 PCDD, PCDF e DL-PCB: conversione dei dati analitici in equivalenti di tossicità	23
1.2 Sorgenti di contaminazione.....	26
1.2.1 Emissioni e Immissioni	32
1.2.2 Inventario Delle Emissioni	34
1.2.3 Sorgenti Di Combustione Incontrollate - Incendi.....	37
1.3 Distribuzione Ambientale	40
1.3.1 Valori Di Fondo Dei Comparti Ambientali.....	45
1.4 Normativa.....	52
1.4.1 Decreto legislativo del 13 Agosto 2010 n. 155.....	53
1.4.2 Decreto legislativo del 03 Aprile 2006 n. 152	55
2. Stato Dell'arte.....	58
2.1 Metodi di analisi IPA/PCB/Diossine.....	58
2.1.1 Campionamento	62
2.1.2 Procedura analitica	63
2.2 La spettroscopia nel vicino infrarosso	68
3. Materiali e Metodi	71
3.1 Campioni	72
3.2 Spettroscopia NIR.....	73
3.2.1 MicroNIR	75
3.3 Analisi statistica multivariata	77
3.3.1 PCA.....	78
3.3.2 Regressione multivariata mediante Partial Least Square	81
3.3.3 Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA)	84
3.4 Protocollo analitico (metodo di NIR-metodo PLS-DA,PLS).....	86

4. Risultati e discussioni.....	88
4.1 Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento PCB nell'aria ambiente.....	92
4.1.1 Ottimizzazione analisi MicroNIR.....	92
4.1.2 Modello di predizione PLS-DA	96
4.1.3 Modello di predizione PLS.....	98
Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento IPA nell'aria ambiente	
103	
4.2.....	103
4.2.1 Ottimizzazione analisi MicroNIR.....	103
4.2.2 Modello di predizione PLS-DA	106
4.2.3 Modello di predizione PLS.....	107
4.3 Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento PCDD/F nell'aria ambiente.....	118
4.3.1 Ottimizzazione analisi MicroNIR.....	118
4.3.2 Modello di predizione PLS-DA	121
4.3.3 Modello di predizione PLS.....	123
4.4 Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento e la discriminazione di PCB, IPA e PCDD/F nell'aria ambiente	125
CONCLUSIONI.....	129
Bibliografia	134

Premessa e Scopo del lavoro

Il territorio italiano negli ultimi anni è stato teatro di incendi di varia natura per entità e proporzioni. Secondo una stima della Coldiretti, solo nel 2017, sono andati in fumo oltre 74mila ettari di bosco, le superfici percorse dal fuoco hanno raggiunto livelli record anche a causa di una drammatica siccità. L'incremento di diffusi e frequenti episodi di roghi di rifiuti, di maggiore o minore gravità, anche in aree naturali protette è, invece, quanto emerge dalla relazione su "il fenomeno degli incendi negli impianti di trattamento e smaltimento dei rifiuti" redatta dalla commissione parlamentare di inchiesta sugli illeciti ambientali [1]. Questi eventi non coinvolgono tanto le vecchie discariche quanto invece gli impianti di trattamento, stoccaggio e selezione dei rifiuti. Quelli medio piccoli, in particolar modo, sono meno soggetti a controlli e di più agile autorizzazione, e sono in grado di accogliere grandi quantità di rifiuti che, se accumulati e incendiati, possono dare luogo a roghi della durata di settimane [2].

In Italia il problema degli incendi o roghi che coinvolgono rifiuti è reso particolarmente serio dal rischio di infiltrazioni, nei lavori di bonifica e messa in sicurezza del territorio, della criminalità organizzata, già coinvolta nel traffico illecito dei rifiuti. Visto l'incremento di episodi di questo tipo, e per consentire un'azione preventiva più efficace, il Procuratore nazionale antimafia Federico Cafiero de Raho e il Commissario straordinario alle bonifiche e discariche abusive Giuseppe Vadalà hanno sottoscritto lo scorso Novembre un protocollo d'intesa che definisce un "piano d'azione mirato contro discariche abusive, roghi e traffici illeciti, a tutela della salute dei cittadini" [3]. Ciò che emerge da questo

documento è la necessità di potenziare il monitoraggio delle matrici ambientali interessate e la prontezza di comunicazione dei fenomeni in atto, e quindi dei dati ambientali, tra i diversi enti preposti, nell'interesse della tutela dell'ambiente, della salute e della sicurezza pubblica.

Il fenomeno degli incendi è stato ampiamente affrontato in diversi studi, non solo dal punto di vista dell'impatto chimico che la combustione incontrollata ha sull'ambiente, ma anche sulle possibili conseguenze per la salute umana, in seguito al rilascio in atmosfera e/o alla ricaduta al suolo di sostanze tossiche, quali idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB) e diossine. Il rischio inquinamento non riguarda solo l'atmosfera ma anche l'acqua, il suolo e le eventuali coltivazioni. Liem et All. in uno studio del 2000 [4] hanno dimostrato che oltre il 90% dell'esposizione umana a PCB e diossine è attribuita all'assunzione di cibo. Studi più recenti hanno mostrato la relazione tra la contaminazione del suolo e del cibo da diossina in seguito ad incendi vaste aree forestali [5] e di discariche pubbliche [6] [7]. Del 1998 invece, è uno studio sul rapporto tra la distanza di ricaduta del contaminante a terra e la zona di combustione di rifiuti solidi urbani, in una discarica aperta [8]. I metodi di analisi proposti prevedono la determinazione di diossine, PCB e IPA mediante GC/MS, facendo riferimento alle metodiche elaborate dall'Environmental Protection Agency, EPA, o alle norme UNI EN (Ente Nazionale Italiano di Unificazione, adottate a livello Europeo). Tali metodi hanno una durata variabile a seconda della matrice trattata, del tipo e delle modalità di estrazione e/o purificazione dei campioni, che può raggiungere anche 24h [9].

La determinazione analitica di questi microinquinanti richiede tempo, denaro, personale qualificato, strumentazione, materiali per il campionamento e reattivi per la preparazione

dei campioni. Come si evince dalle *linee guida SNPA per la gestione delle emergenze derivanti da incendi* i tempi di restituzione del risultato analitico sono lunghi, in genere sono richiesti almeno quattro giorni lavorativi [10].

È Sulla base di queste considerazioni che è nata l'idea di sperimentare, sviluppare e validare un approccio analitico integrato ai microinquinanti organici, che possa essere adottato nelle attività di emergenza ambientale e/o di monitoraggio, che ricadono nelle competenze di intervento delle Agenzie per la Protezione Ambientale, e nello specifico di Arpa Lazio. L'obiettivo prioritario è quello di ridurre al minimo i campionamenti attraverso un incremento della raccolta dei dati su campo. Tale raccolta non è fine a se stessa ma ha lo scopo di fornire informazioni che possono poi essere validate in un secondo tempo, in fase di laboratorio, riducendo i tempi ed i costi associati alla gestione dei campioni negativi [11]. L'idea progettuale è stata quella di studiare i possibili vantaggi dell'applicazione della tecnica NIR per quei contaminanti la cui presenza, ad oggi, viene confermata solo da lunghe e costose analisi di laboratorio. Il vantaggio di tale approccio consisterebbe, inoltre, nel poter analizzare il campione in loco senza danneggiare né il campione stesso né l'area investigata da parte delle forze dell'ordine

Nella parte introduttiva verranno esposte la natura del progetto, le caratteristiche chimico fisiche dei contaminanti di interesse, la normativa nazionale e comunitaria vigente.

Nella seconda parte verrà inoltre evidenziato lo stato dell'arte con le metodiche normate di riferimento e le applicazioni della spettroscopia NIR attraverso un'analisi multivariata dei dati.

Nella terza parte sarà presentato il lavoro svolto, il protocollo analitico, le problematiche incontrate e le scelte fatte durante lo sviluppo del metodo.

Infine verranno esposti i risultati ottenuti dall'analisi di campioni di laboratorio, discutendone il significato analitico e la possibile applicabilità in campo ambientale come metodo di screening qualitativo e semi-quantitativo.

1. Introduzione

“Ogni modificazione dell’aria atmosferica dovuta all’introduzione nella stessa di una o più sostanze in quantità e con caratteristiche tali da ledere o costituire un pericolo per la salute umana, per la qualità dell’ambiente oppure tali da ledere i beni materiali o compromettere gli usi legittimi dell’ambiente”

D.Lgs.152/06, art.268 - definizione di inquinamento atmosferico

1.1 I contaminanti organici persistenti (POPs)

Gli inquinanti organici persistenti (POPs) sono sostanze chimiche prodotte per lo più dall'uomo difficili da scomporre e tossiche, persistono per lunghi periodi nell’ambiente e possono passare da una specie all’altra attraverso la catena alimentare. Dopo il loro rilascio, complice la loro persistenza e semivolatilità, si diffondono a livello globale poiché vengono trasportati, attraverso l’aria e l’acqua, oltre i confini internazionali [12]. L’evidenza di ciò è testimoniata dal riscontro di livelli ambientali significativi di alcuni POPs (DDT e PCB) negli ecosistemi e nelle popolazioni indigene dell’Artico dove non erano mai stati prodotti o utilizzati [13];[14].

A tal proposito, la Convenzione di Stoccolma aggiunge un'importante dimensione globale agli sforzi nazionali e regionali per il controllo dei POP rappresentando uno strumento

internazionale legalmente vincolante, per la riduzione e l'eliminazione dei rilasci di queste sostanze in tutti i comparti ambientali (atmosfera, acqua, suolo, residui e prodotti) [15].

Il testo della Convenzione originariamente adottato prevedeva misure di controllo, restrizione all'uso e produzione intenzionale e non, di una lista aperta di 12 sostanze o classi di sostanze tossiche, suddividibili in tre categorie: insetticidi clorurati di prima generazione (dieldrin, DDT, toxafene, clordano), prodotti chimici industriali (PCB e esabromobifenile) e sottoprodotti indesiderati (diossine, furani e alcuni IPA). Da allora sono state aggiunte nuove sostanze chimiche attualmente elencate negli allegati A (Eliminazione), e B (Limitazione).

Alla convenzione, adottata il 22 maggio 2001 ed entrata in vigore il 17 Maggio 2004, ad oggi hanno aderito più di 180 Paesi. L'Unione Europea ha già dato attuazione alla Convenzione di Stoccolma, con Decisione 2006/507/CE del Consiglio del 14 ottobre 2004 e da ultimo con il Reg. n.2019/1021/UE relativo agli inquinanti organici persistenti, attuando una rifusione del precedente regolamento (CE) n. 850/2004 (che è dunque abrogato). L'Italia risulta essere l'unico Paese europeo che, dopo aver firmato la convenzione il 23 Maggio 2001 non l'ha ancora ratificata.

Per quanto una sostanza possa essere considerata pericolosa o dannosa per l'uomo e/o per l'ambiente, non necessariamente viene classificata come POP. Affinché questo accada è necessario che sussistano quattro caratteristiche importanti: persistenza, bioaccumulo, tossicità e mobilità nell'ambiente [16]. Nello specifico:

- Tensione di vapore <1000 Pa
- Tempo di semivita in aria e in acqua > 2 mesi

- Tempo di semivita nel suolo/sedimenti > 6 mesi
- Evidenze sperimentali della presenza in zone remote
- Fattore di bioaccumulo (BAF) > 5000
- Fattore di bioconcentrazione (BCF) > 5000
- Log KOW > 5

Questi criteri, tuttavia, rappresentano solo il punto di partenza del complesso iter di identificazione di sostanze candidate ad essere classificate come POP. La classificazione come tali è infatti un processo lungo e tutt'altro che immediato che richiede sinergia di informazioni derivanti da monitoraggi di misura rigidi e riproducibili nei lunghi periodi di tempo.

La criticità del tema affrontato dipende dal fatto che a differenza della maggior parte degli inquinanti chimici, le concentrazioni ambientali dei POPs non diminuiscono al cessare delle emissioni in quanto non vanno incontro a processi di diluizione. Essi invece nel lungo termine tendono ad accumularsi nei livelli trofici più elevati, soprattutto nell'uomo a causa dell'alta lipofilità e resistenza alla degradazione chimica e biologica.

Attraverso l'osservazione degli effetti sanitari a breve, medio e lungo termine, si è constatato che gli episodi di intossicazione umana acuta da POPs, con conseguenze anche letali, sono abbastanza limitati. Più importanti sono gli effetti a lungo termine che si manifestano a seguito di esposizione cronica anche a basse concentrazioni di POPs. Nella classificazione IARC, (International Agency for Research on Cancer) la 2,3,7,8-TCDD è classificata nel Gruppo 1 essendo sicuramente cancerogena per l'uomo. I PCB, invece, sono classificati nel Gruppo 2A (probabile cancerogeno) mentre tra gli IPA considerati POPs nel

Protocollo UNECE, il Benzo(a)pirene è classificato come “probabilmente” cancerogeno per l’uomo (Gruppo 2A) mentre il benzo(b)fluorantene, il benzo(k)fluorantene e l’indeno[1,2,3- cd]pirene come “possibilmente” cancerogeni per l’uomo (Gruppo 2B).

L’esposizione ai POPs presenti nell’ambiente come contaminazione di fondo avviene principalmente attraverso la dieta. Circa il 95% dell’introduzione giornaliera di diossine risulta da ingestione di cibi, in particolare prodotti alimentari di origine animale.

Particolarmente rilevante, soprattutto per questo lavoro, è un gruppo di POPs conosciuto come U-POPs o Unintentional POPs, che si distingue perché non prodotto intenzionalmente. Si tratta di composti organici che si formano come sottoprodotto indesiderato di varie attività antropiche, tra cui per l’appunto gli incendi. Tra questi i più importati sono Diossine e Furani. Si tratta di sostanze che non hanno alcun interesse produttivo, la maggior parte delle emissioni in atmosfera di queste sostanze sono riconducibili a due settori principali: processi di combustione controllata e incontrollata e lavori di fusione e affinazione di metalli ferrosi e non.

In questo lavoro di ricerca verrà focalizzata l’attenzione solamente su tre classi di contaminanti organici, gli IPA, i PCB e le Diossine/Furani e la loro produzione durante combustioni incontrollate.

1.1.1 IPA

Idrocarburi Policiclici Aromatici o IPA, sono composti organici caratterizzati dalla presenza di due o più anelli aromatici (fino a 7) condensati tra loro. Il più semplice dal punto di vista strutturale è il Naftalene.

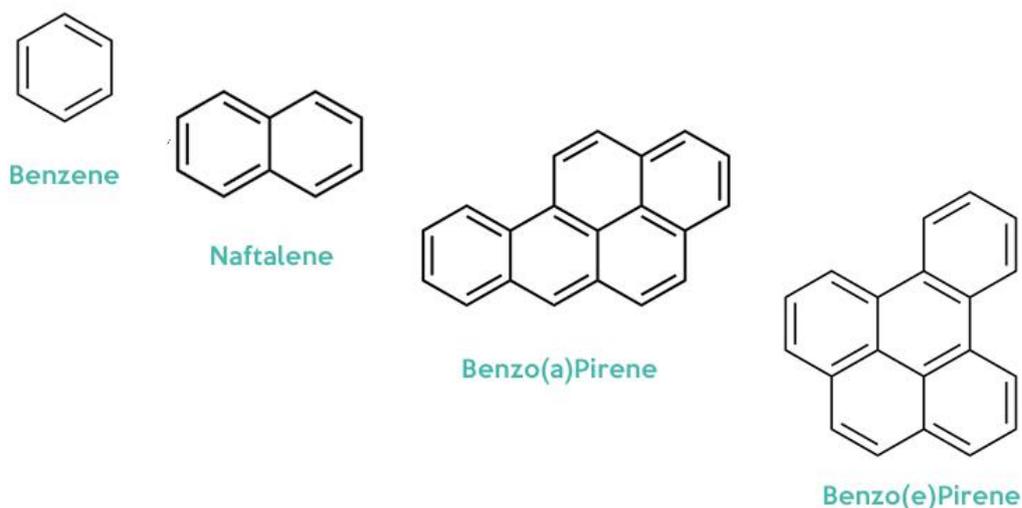


FIGURA 1 - FORMULE DI STRUTTURA DEL BENZENE E ALTRI IPA DIVERSAMENTE CONDENSATI

Sono sostanze solide a temperatura ambiente, caratterizzate da un alto punto di fusione e di ebollizione e da una bassa tensione di vapore. Gli IPA sono solubili nella maggior parte dei solventi organici ma scarsamente in acqua (la solubilità diminuisce all'aumentare del peso molecolare) e sono molto lipofili. Chimicamente piuttosto stabili sebbene in seguito a fotodecomposizione in presenza d'aria e luce danno luogo a molti prodotti d'ossidazione tanto da contribuire al fenomeno dello "smog fotochimico".

Le proprietà chimico-fisiche degli IPA sono legate ai sistemi coniugati degli elettroni π e variano piuttosto regolarmente con il numero degli anelli ed il peso molecolare (Tab. 1). Sono suddivisi in IPA leggeri (2-3 anelli condensati) e IPA pesanti (4-6 anelli).

IPA	Peso Molecolare	Tensione di vapore (Pa)	Solubilità (mg/L a 25°C)	Log Kow
Naftalene	128,12	-	-	-
Acenaftilene	152,20	3,78	3,93	4,07
Acenaftene	154,21	$5,96 \cdot 10^{-1}$	1,93	3,98
Fluorene	166,20	$4,27 \cdot 10^{-2}$	1,68 – 1,98	4,18
Fenantrene	178,20	$9,07 \cdot 10^{-2}$	1,20	4,45
Antracene	178,20	$2,27 \cdot 10^{-3}$	0,076	4,45
Fluorantene	202,26	$6,67 \cdot 10^{-4}$	0,20 -0,26	4,90
Pirene	202,30	$3,33 \cdot 10^{-4}$	0,077	4,88
Benzo[a]antracene	228,29	$2,93 \cdot 10^{-6}$	0,01	5,61
Crisene	228,30	$8,40 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	5,16
Benzo[k]fluorantene	252,30	$8,79 \cdot 10^{-9}$	$7,6 \cdot 10^{-4}$	6,06
Benzo[b]fluorantene	252,30	$6,67 \cdot 10^{-5}$	0,0012	6,04
Benzo[a]pirene	252,30	$7,47 \cdot 10^{-7}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	6,06
Dibenzo[a,h]antracene	278,35	$1,33 \cdot 10^{-8}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	6,84
Indeno[1,2,3-c,d]pirene	276,30	$1,33 \cdot 10^{-9} - 1,33 \cdot 10^{-4}$	0,062	6,58
Benzo[g,h,i]perilene	276,34	$1,37 \cdot 10^{-8}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	6,50

TABELLA 1 - PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE DEGLI IPA

La pressione di vapore generalmente tende a diminuire con l'aumentare del peso molecolare e questa circostanza influenza le differenti percentuali con cui i singoli IPA sono assorbiti sul particolato atmosferico. Composti a basso peso molecolare sono quasi totalmente presenti nella fase gassosa, mentre composti con 5 o più anelli tendono a essere maggiormente adsorbiti sulle particelle e difatti molto spesso sono associati alle polveri sospese o particolato atmosferico. Questi ultimi non permangono a lungo nell'atmosfera come molecole gassose perché a causa della loro bassa tensione di vapore, tendono rapidamente a condensarsi e ad essere adsorbiti sulla superficie dei nuclei di condensazione presenti nell'atmosfera (ad esempio particelle di fuliggine e di cenere) [17].

Nel periodo invernale anche gli IPA contenenti un numero di anelli ≤ 4 aderiscono a tali particelle, poiché la loro tensione di vapore si riduce bruscamente con l'abbassarsi della temperatura. Diversamente, nel periodo estivo gli IPA leggeri tendono a rimanere in forma gassosa una volta immessi nell'atmosfera e nell'arco delle 24 ore iniziano a degradarsi attraverso una sequenza di reazioni radicaliche.

Nel particolato atmosferico che ha dimensioni tali da poter essere respirato, gli IPA possono penetrare nei polmoni mediante la respirazione e venire trasportati a livello della regione degli alveoli polmonari e quindi al sangue e ai tessuti. Sebbene gli IPA rappresentino solo circa l'1 ‰ del particolato atmosferico, la loro presenza come inquinanti dell'aria rappresenta un importante problema sanitario poiché molti di essi sono stati classificati come cancerogeni e/o mutageni.

La IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato 16 IPA come cancerogeni, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) considera 8 IPA cancerogeni per l'essere umano quando vengono assunti con gli alimenti (EFSA, 2008 [18]). Nell'allegato VI del regolamento CLP (regolamento (CE) n. 1272/2008) attualmente figurano otto IPA classificati come cancerogeni di categoria 1B e un IPA cancerogeno di categoria 2.

E' bene comunque precisare che sotto il profilo tossicologico, molti studi indicano che gli IPA probabilmente non sono cancerogeni in quanto tali perché non hanno le caratteristiche di elettrofilicità necessarie ad interagire con il DNA. I vari agenti cancerogeni sono molecole, chiamate diidrodiolepossidi, che derivano dalla loro conversione metabolica. Tali composti infatti possono interagire con i centri nucleofili del DNA provocandone la distorsione e l'alterazione genetica [19].

Gli IPA Solitamente nell'aria non si ritrovano mai come composti singoli, ma sono presenti nell'ambiente sotto forma di miscele complesse contenenti oltre un centinaio di differenti composti. A causa di questa estrema varietà è possibile identificare analiticamente solo alcune molecole, in generale vengono analizzati unicamente i sedici idrocarburi policiclici aromatici dell'elenco EPA o gli otto IPA disciplinati in Europa.

Tuttavia, il più delle volte ci si limita a misurare solo il Benzo[a]Pirene (BaP) della classe degli IPA poiché si riscontra sempre in proporzioni relativamente costanti, attorno al 10 per cento, nelle miscele contenenti IPA. Essendo quindi la relazione tra questo composto e gli altri IPA (detto profilo IPA), relativamente stabile nell'aria delle diverse città, il Benzo[a]pirene viene utilizzato come indicatore (marker) di esposizione all'intera classe degli IPA di interesse sanitario [20].

Gli IPA sono dei contaminanti ubiquitari, si diffondono in tutti i comparti ambientali e derivano dalla combustione incompleta o pirolisi di materiale organico contenente carbonio, come carbone, legno, prodotti petroliferi e rifiuti. La fonte più importante di origine antropica è rappresentata dalle emissioni veicolari seguita dagli impianti termici, dalle centrali termoelettriche e dagli inceneritori. Anche incendi di foreste, fumo di tabacco ed eruzione vulcaniche possono rappresentare delle fonti non trascurabili di IPA nell'ambiente, con impatti locali talvolta rilevanti. Rispetto ad altri inquinanti, gli sono presenti nell'atmosfera in quantità più contenute, inoltre la loro concentrazione negli ultimi anni si sta riducendo grazie ai convertitori catalitici e alla riduzione di legno e carbone come fonti energetiche, nonché ad un miglioramento delle tecnologie e dei controlli delle emissioni dei fumi in campo industriale.

1.1.2 PCB

I policlorobifenili o PCB, sono composti aromatici costituiti da molecole di bifenile variamente clorate. Le diverse combinazioni possibili, determinate dalla posizione e dal numero di atomi di cloro presenti, origina 209 singoli isomeri chiamati "congeneri". La nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) assegna ad ogni congenere un numero tra 1 e 209.

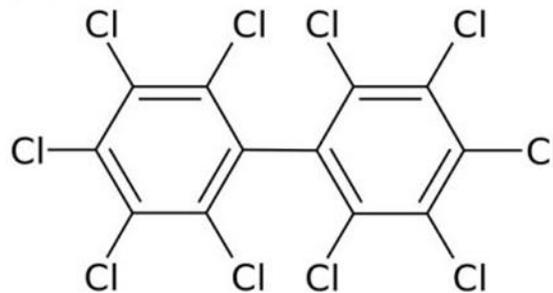


FIGURA 2 - FORMULE DI STRUTTURA DEL DECA-CLOROBIFENILE

All'aumentare del contenuto di cloro, anche lo stato di aggregazione dei PCB cambia, così come altre proprietà (solubilità e volatilità), inclusa la loro stabilità nell'ambiente (Tab. 2) [21].

PCB	Punto di fusione (°C)	Punto di ebollizione (°C)	Tensione di vapore (mmHg a 25°C)	Solubilità (mg/L a 25°C)	Log KOW
Bifenile	71	256	4,9	9,3	4,6
Mono – CB	25 – 77,9	285	1,1	4,0	4,7
Di – CB	24,4 – 149	312	0,24	1,6	5,1
Tri – CB	28,87	337	0,054	0,65	5,5
Tetra – CB	47 – 180	360	0,012	0,26	5,9
Penta – CB	76,5 – 124	381	$2,6 \cdot 10^{-3}$	0,099	6,3
Hexa – CB	77 – 150	400	$5,8 \cdot 10^{-4}$	0,038	6,7
Hepta – CB	122,4 – 149	417	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,014	7,1
Octa – CB	159 – 162	432	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$	7,5
Nona – CB	182,8 – 206	445	$6,3 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	7,9
Deca - CB	305,9	456	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$7,6 \cdot 10^{-3}$	8,3

TABELLA 2 - PRINCIPALI MISCELE COMMERCIALI DI PCB E RELATIVO CONTENUTO DI CLORO

I PCB sono composti chimici molto stabili scarsamente biodegradabili, inerti ad acidi e alcali e resistenti alla fotodegradazione, non sono ossidabili e non attaccano i metalli. Estremamente lipoaffini, hanno una solubilità scarsa in acqua e alta nei grassi, oli e solventi organici. Il loro interesse produttivo deriva dalla elevata capacità termica e bassa conduttanza, poco volatili e non infiammabili (quando la loro molecola contiene più di 4 atomi di cloro), evaporano a temperature superiori a 300°C e si decompongono solo oltre 800-1000°C.

La produzione di questi composti avviene per reazione diretta del cloro con la molecola del bifenile, in presenza di cloruro ferrico come catalizzatore. Tanto più alta è la percentuale di cloro a inizio reazione, tanto maggiore sarà il grado di clorurazione della molecola finale. In generale, le miscele commerciali si trovano sotto forma di una soluzione oleosa con un contenuto medio in cloro che varia tra il 21% e il 68%.

I congeneri dei PCB sono suddivisi in due gruppi in base alla diversa possibilità che hanno gli atomi di cloro di disporsi su un unico anello del bifenile o su entrambi. L'effetto tossico varia da congenere a congenere in maniera non correlata solo al numero di clori, bensì anche alla posizione di questi rispetto alla molecola di bifenile. Solo 12 dei 209 congeneri dei PCB, i cosiddetti coplanari, presentano caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche paragonabili alle diossine e ai furani: questi vengono definiti PCB *dioxin-like* (cioè simili alle diossine) e indicati con la sigla PCB_{dl} o PCB-DL. La presenza di atomi di cloro in posizione *-orto* fa sì che, a causa dell'ingombro sterico, la molecola di bifenile non possa assumere una conformazione planare (Fig. 3). I PCB quindi caratterizzati da una maggiore tossicità saranno i congeneri *non-orto* sostituiti (senza atomi di cloro in posizione *-orto*) e i *mono-orto* sostituiti (un solo atomo di cloro in posizione *-orto*) e i congeneri coplanari che presentano atomi di cloro in entrambe le posizioni *-para* e in due o più *-meta*. E' proprio la somiglianza strutturale a far sì che i PCB coplanari agiscano, a livello cellulare, in maniera simile alla 2,3,7,8-tetracloro-p-dibenzodiossina, interazione che non è possibile per i congeneri non planari, detti *non dioxin-like* [22].

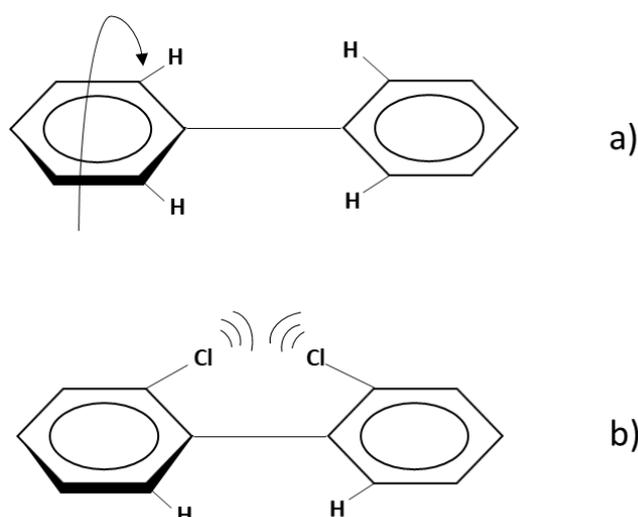


FIGURA 3 - STRUTTURA DEI PCB NON-ORTO (A) E -ORTO SOSTITUITI (B).

Come verrà dettagliato in seguito, questi PCB, proprio come le diossine e i furani, hanno fattori di tossicità equivalente (TEF). In tabella 4, sono riportati i TEF secondo la World Health Organization (WHO) per i 12 congeneri tossici PCB *dioxin-like* e sono confrontati i valori proposti nel 1998 con i più recenti del 2005.

L'Agencia Internazionale per le Ricerche sul Cancro (IARC) di Lione ha classificato i PCB come probabili agenti cancerogeni per l'uomo, diversi studi negli anni hanno dimostrato come l'esposizione a questi inquinanti causerebbe danni al sistema immunitario, al fegato, alla pelle, all'apparato riproduttivo, al tratto gastrointestinale e alla ghiandola tiroidea.

Altri undici PCB *non diossina simili*, interessanti a livello sanitario e ambientale, completano il quadro dei PCB ricercati prevalentemente nelle matrici ambientali.

1.1.3 Diossine e Furani

Con il termine generico "diossine" si indica un gruppo di 210 composti chimici aromatici policlorurati, ossia formati da carbonio, idrogeno, ossigeno e cloro, divisi in due famiglie: dibenzo-p-diossine (PCDD o propriamente "diossine") e dibenzo-p-furani (PCDF o "furani") (Fig. 4). La struttura di questi composti è costituita da due anelli aromatici connessi da due atomi di ossigeno nel caso delle diossine e da un legame carbonio-carbonio e da un atomo di ossigeno nei furani, con un numero di atomi di cloro variabile da 1 a 8 [23]. Nella figura seguente sono riportate, a titolo esemplificativo, le strutture della tetraclorodibenzodiossina e del tetraclorodibenzo furano.

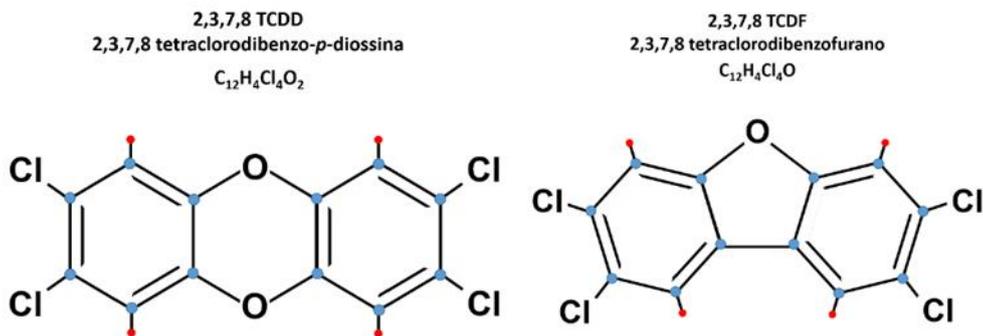


FIGURA 4 – FORMULE DI STRUTTURA DI 2,3,7,8 TCDD E 2,3,7,8 TCDF

Fatta eccezione per gli ottacloroderivati, a ogni livello di clorosostituzione (gruppo omologo) corrispondono più isomeri strutturali e in totale si distinguono 75 congeneri delle PCDD e 135 dei PCDF. La differenza tra il numero di congeneri dipende dalla presenza, nel caso dei furani, di un piano di simmetria in meno rispetto alle diossine. I congeneri di interesse ambientale e sanitario sono 17 (quelli con sostituenti almeno nelle posizioni 2, 3, 7, e 8), di cui 7 delle PCDD e 10 dei PCDF.

Nella terminologia corrente il termine “diossina” è usato come sinonimo della 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-*p*-diossina (TCDD), ossia del congenere maggiormente tossico che ha 4 atomi di cloro nelle posizioni β e nessuno in α . La diossina con maggior grado di clorurazione, invece, vale a dire la ottaclorodibenzo-*p*-diossina (OCDD), presenta una tossicità bassa, comparata con quella degli altri congeneri, poiché gli atomi di cloro occupano tutte le posizioni α . La caratteristica tossica di questi composti dipende infatti dal grado e dalla posizione in cui gli atomi di cloro sostituiscono la molecola. I congeneri maggiormente tossici sono sostituiti con 4 atomi di cloro in posizione β , la sostituzione in posizione α , invece, tende a far diminuire la loro tossicità [24].

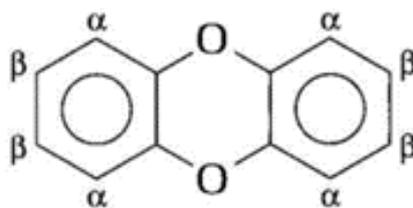


FIGURA 5 – POSIZIONE ALFA E BETA IN UNA DIOSSINA

Le caratteristiche chimico/fisiche variano al variare del grado di sostituzione (Tab. 3) [25]

Congenero	Tensione di vapore (mmHg a 25°C)	Log KOW	Solubilità (mg/L a 25°C)	Costante di Henry
TCDD	$8,1 \cdot 10^{-7}$	6,4	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$
PeCDD	$7,3 \cdot 10^{-10}$	6,6	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$
HxCDD	$5,9 \cdot 10^{-11}$	7,3	$4,4 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-3}$
HpCDD	$3,2 \cdot 10^{-11}$	8,0	$2,4 \cdot 10^{-6}$	$5,14 \cdot 10^{-4}$
OCDD	$8,3 \cdot 10^{-13}$	8,2	$7,4 \cdot 10^{-8}$	$2,76 \cdot 10^{-4}$
TCDF	$2,5 \cdot 10^{-8}$	6,2	$4,2 \cdot 10^{-4}$	$6,06 \cdot 10^{-4}$
PeCDF	$2,7 \cdot 10^{-9}$	6,4	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$2,04 \cdot 10^{-4}$
HeCDF	$2,8 \cdot 10^{-10}$	7,0	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$5,87 \cdot 10^{-4}$
HpCDF	$9,9 \cdot 10^{-11}$	7,9	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$5,76 \cdot 10^{-4}$
OCDF	$3,8 \cdot 10^{-12}$	8,8	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$4,04 \cdot 10^{-5}$

TABELLA 3 - PROPRIETÀ CHIMICO FISICHE PER CLASSI DI OMOLOGHI DI PCDD E PCDF

Tutti i PCDD/F sono solidi organici con un punto di fusione elevato e una bassa tensione di vapore, sono inoltre caratterizzati da marcata persistenza ambientale e tendenza al trasporto transfrontaliero aereo anche a lunghe distanze. Hanno una bassissima solubilità in acqua ma elevata lipofilia e tendenza alla bioconcentrazione (fattore di bioconcentrazione, log BCF 3,90 - 5,27) [US EPA, 2003] e biomagnificazione nelle catene alimentari [UNEP⁽¹⁾, 2003]. Per tali caratteristiche questi composti sono stati inclusi nella Convenzione di Stoccolma sui Contaminanti Organici Persistenti (POP) [UNEP, 2001] e nel

⁽¹⁾ United Nations Environment Programme

Protocollo sui POP all'interno della Convenzione sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero [UNECE ⁽²⁾, 1998]. Si osserva come i composti in questione abbiano anche un'emivita metabolica dell'ordine di anni nell'essere umano [IARC, 1997].

Questi composti presenti seppur a livelli molto bassi, possono determinare un inquinamento cronico, pressoché ubiquitario e possono dar luogo ad eventi che, con una nuova accezione del termine, potremmo definire "emergenze ambientali". Le evidenze sperimentali mostrano che attualmente esiste un flusso significativo di diossine e furani dall'atmosfera al suolo, indicando che le attività antropiche rappresentano ancora la principale fonte di emissione in atmosfera, e nell'ecosistema in generale, di queste sostanze. Una delle principali vie di esposizione a PCDD/F per l'uomo è l'ingestione di alimenti ad elevato tenore lipidico contaminati, come pesce, mammiferi marini, grassi, carne e prodotti caseari [26]. Pertanto fenomeni di bioaccumulo e/o pratiche antropiche porterebbero le concentrazioni a livelli pericolosi per l'ambiente e l'uomo anche a fronte di una presenza di inquinanti bassa, o addirittura bassissima, che non comporterebbe rischi immediati e chiaramente identificabili.

Il rischio per l'essere umano derivante dall'esposizione a PCDD/F, viene valutato sulla base della loro concentrazione totale espressa in equivalenti di 2,3,7,8-TCDD (TEQ), come verrà dettagliato nel paragrafo successivo. In tabella 5, si riportano due gruppi di TEF: gli I-TEF (International TEF), attualmente utilizzati per l'espressione della concentrazione totale di PCDD/PCDF in campioni ambientali, e i WHO-TEF definiti per PCDD/PCDF e PCB dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS = WHO).

⁽²⁾ United Nations Economic Commission for Europe

1.1.4 PCDD, PCDF e DL-PCB: conversione dei dati analitici in equivalenti di tossicità

Generalmente PCDD/PCDF e PCB non vengono rilevati nelle diverse matrici come singoli composti, ma come miscele complesse dei diversi congeneri aventi differente tossicità. Per esprimere la tossicità dei singoli congeneri sono stati introdotti i concetti di fattore di tossicità equivalente (Toxic Equivalency Factor, TEF) e di tossicità equivalente (total toxic equivalents, TEQ). Si tratta di un parametro adimensionale, il primo, e di una grandezza tossicologica, la seconda, che permettono di esprimere la concentrazione di una sostanza nociva in termini di quantità equivalente ad un composto standard, ovvero una sostanza di riferimento in grado di generare i medesimi effetti tossici. Il concetto di base è che i PCDD/PCDF/PCB-DL presentano il medesimo meccanismo di azione (attivazione del recettore citoplasmatico AhR, Aryl hydrocarbon Receptor, ovvero il recettore arilico per gli idrocarburi) causando di fatto effetti tossici simili.³ [27]

In particolare la tossicità di questi composti è causata dalla simultanea presenza di atomi di cloro nelle posizioni 2,3,7,8, mentre, una volta verificata questa condizione, si osserva una diminuzione della tossicità stessa con l'aumentare del grado di clorurazione. A titolo di esempio, dunque, la 1,2,3,7,8,9-HxCDD è meno tossica della 2,3,7,8-TCDD, mentre la 1,2,7,8-TCDD ha tossicità nulla. Tutto ciò viene appunto incorporato nel TEF di ciascun congenere. A ciascun composto quindi, viene assegnato un TEF che è la misura della

⁽³⁾ Il recettore AhR è una proteina solubile intracellulare in grado di legarsi più o meno fortemente con alcuni tipi di sostanze ed è proprio questo legame a rappresentare il passo chiave per il successivo innescarsi degli effetti tossici. L'affinità di legame tra molecola e recettore è funzione del numero e della posizione degli atomi di cloro che determinano una differente configurazione spaziale della molecola (coplanare o non-coplanare); il meccanismo di azione tossicologica, non è completamente noto, sembra legato ad un'alterazione mediata dal recettore AhR nell'espressione di una serie di geni connessi, tra l'altro, con la crescita e la differenziazione cellulare (IARC, 1997).

tossicità di tale composto rispetto al congenere più tossico la 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina) a cui è assegnato un valore di TEF pari a 1. Tutti gli altri congeneri hanno tossicità inferiore ad 1,0. Il TEF moltiplicato per la concentrazione effettiva della sostanza (espressa con l'unità di misura della matrice in cui viene ricercata) fornisce la TEQ.

Per tale conversione nel corso degli anni sono stati proposti differenti schemi di tossicità relativa e attualmente sono adottati e riconosciuti due sistemi. Il primo sistema I-TEQ, (International Toxicity Equivalent) sviluppato in sede NATO/CCMS nel periodo 1986-1988 e definita per tale motivo "internazionale", è utilizzato principalmente per misurare i livelli di tossicità nelle matrici ambientali (acqua, aria, suolo). Tale scala include esclusivamente i TEF per le PCDD e i PCDF. Il secondo sistema WHO-TEQ, sviluppato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS = WHO) in cooperazione con l'International Programme on Chemical Safety¹⁰ [27] e aggiornato nel 2005 [28], comprende anche i TEF per i DL-PCB. È tipicamente utilizzato per valutare i possibili effetti sulla salute umana, per i campioni alimentari e, nel caso dei PCB, per i campioni ambientali.

I Fattori di tossicità equivalente, quindi, consentono di misurare la tossicità di una miscela di diossine partendo dai contributi relativi dei singoli congeneri. Dopo conversione, i valori dei singoli congeneri possono essere sommati riassumendo in un unico valore la tossicità di tutti i composti, in questo modo viene facilitata la quantificazione del rischio e le misure di controllo.

Numero CAS ⁽⁴⁾	CONGENERE	WHO98-TEF	WHO05-TEF
32598-13-3	3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 77)	0,0001	0,0003
70362-50-4	3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl (PCB 81)	0,0001	0,0001
31508-00-6	2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 118)	0,0001	0,0003
65510-44-3	2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 123)	0,0001	0,00003
74472-37-0	2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 114)	0,0005	0,00003
32598-14-4	2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl (PCB 105)	0,0001	0,00003
57465-28-8	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126)	0,1	0,1
52663-72-6	2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 167)	0,00001	0,00003
38380-08-4	2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl (PCB 156)	0,0005	0,00003
69782-90-7	2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 157)	0,0005	0,00003
32774-16-6	3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 169)	0,01	0,03
39635-31-9	2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl (PCB 189)	0,0001	0,00003

TABELLA 4 - PCB_{DIOXIN-LIKE} E RELATIVI FATTORI DI TOSSICITÀ EQUIVALENTE

Numero CAS	PCDD/PCDF	I-TEF	WHO05-TEF
174-01-6	2,3,7,8 TETRA-CDD	1	1
40321-76-4	1,2,3,7,8 PENTA-CDD	0,5	1
39227-28-6	1,2,3,4,7,8 ESA-CDD	0,1	0,1
57653-85-7	1,2,3,6,7,8 ESA-CDD	0,1	0,1
19408-74-3	1,2,3,7,8,9 ESA-CDD	0,1	0,1
35822-46-9	1,2,3,4,6,7,8 EPTA-CDD	0,01	0,01
3268-87-9	OCTA-CDD	0,001	0,0003
51207-31-9	2,3,7,8 TETRA-CDF	0,1	0,1
57117-41-6	1,2,3,7,8 PENTA-CDF	0,05	0,03
57117-31-4	2,3,4,7,8 PENTA-CDF	0,5	0,3
70648-26-9	1,2,3,4,7,8 ESA-CDF	0,1	0,1
57117-44-9	1,2,3,6,7,8 ESA-CDF	0,1	0,1
60851-34-5	2,3,4,6,7,8 ESA-CDF	0,1	0,1
72918-21-9	1,2,3,7,8,9 ESA-CDF	0,1	0,1
67562-39-4	1,2,3,4,6,7,8 EPTA-CDF	0,01	0,01
55673-89-7	1,2,3,4,7,8,9 EPTA-CDF	0,01	0,01
39001-02-0	OCTA-CDF	0,001	0,0003

TABELLA 5 – PCDD, PCDF E RELATIVI FATTORI DI TOSSICITÀ EQUIVALENTE

⁽⁴⁾ Il CAS NR è il numero identificativo univoco di ogni sostanza attribuito dal Chemical Abstract Service, divisione della American Chemical Society.

Per la sommatoria di PCDD/F e PCB possono essere seguiti diversi approcci:

- ✓ *Lower bound*: il contributo alla sommatoria in TEQ di ogni congenere non rilevabile è pari a zero;
- ✓ *Medium bound*: il contributo alla sommatoria in TEQ di ogni congenere non rilevabile è pari alla metà del rispettivo limite di quantificazione;
- ✓ *Upper bound*: il contributo alla sommatoria in TEQ di ogni congenere non rilevabile è pari al rispettivo limite di quantificazione.

La modalità utilizzata per il calcolo della sommatoria deve sempre essere specificata al fine di una corretta interpretazione e valutazione dei dati. In campo ambientale, l'approccio prevalentemente utilizzato per il raffronto con i limiti normativi è quello del Medium bound.

1.2 Sorgenti di contaminazione

Gli IPA sono generati dalla combustione incompleta di materiale organico (p. es. carbone, olio da riscaldamento, carburante, legno, tabacco) e si diffondono nell'aria adsorbiti alle particelle di fuliggine o per usura dei materiali (es. gomme, guaine ecc. a cui vengono aggiunti per migliorarne le proprietà). Gli IPA sono anche componenti naturali del carbone e del petrolio, pertanto nel processo di raffinazione si accumulano nel bitume. Quest'ultimo trova notevoli applicazioni tra cui la produzione di asfalto che di conseguenza contiene elevate quantità di IPA. Negli anni '60 erano ancora in uso colle contenenti catrame per incollare il parquet e fino agli anni '90 si impregnava il legno (per

esempio le traversine ferroviarie o i pali) con olio di catrame per proteggerlo dagli agenti atmosferici.

I PCB sono composti di sintesi, scoperti per la prima volta nel 1881 dai due chimici Schmidt e Schultz, prodotti a livello industriale solo a partire dagli anni '30. La produzione globale totale di PCB tra il 1930 e il 1993 è stata stimata in 1324 milioni di tonnellate (Brevik et al., 2002) di cui circa la metà per opera della Monsanto Industrial Chemicals Company (Aroclor®), negli Stati Uniti d'America. In relazione al contenuto di cloro e al processo di produzione, miscele tecniche di PCB vengono venduti sotto forma di vari nomi commerciali (Fenclor®, Kanechlor®, Clophen®) [29].

Al fine di tutelare la salute e la sicurezza, nonché la salvaguardia ambientale, la produzione industriale dei PCB è stata interrotta o drasticamente ridotta fra gli anni '70 e gli anni '90 a livello mondiale e ne è stata vietata la produzione e l'importazione nei Paesi della Comunità Europea (con qualche deroga ai paesi dell'Europa dell'est). L'Italia ha vietato la commercializzazione e l'uso delle apparecchiature contenenti PCB con recepimento della DPR 206/88 e con il D.Lgs. 209/99.

Prima che ne venisse vietato il commercio, i PCB venivano utilizzati principalmente nei sistemi chiusi, come fluidi dielettrici in apparecchiature elettriche (trasformatori e condensatori) e nei sistemi aperti, ovvero come additivi per antiparassitari, ritardanti di fiamma, isolanti, vernici, ecc. Di questi usi, le principali vie di contaminazione ambientale sono riconducibili a perdite, incendi, emissione in atmosfera a seguito di evaporazione, scarichi illeciti e smaltimento inadeguato.

Le Diossine e i Furani non vengono prodotti intenzionalmente, non avendo alcun utilizzo pratico, ma sono sottoprodotti indesiderati di una serie di processi chimici e/o di combustione. Questi processi nel loro insieme vengono indicati come *Sorgenti Primarie*, mentre le sostanze che possono generare diossine a seguito della loro combustione sono denominate "*precursori*". Le diossine una volta immesse nell'ambiente, per le loro proprietà, danno origine a processi di accumulo in determinati comparti/matrici ambientali e di bioaccumulo in specifici prodotti ed organismi (ad esempio vegetazione, fauna ittica, erbivori, latte e prodotti caseari), in questo caso si parla di "*sorgenti secondarie*". È importante sottolineare che le PCDDs ed i PCDFs, essendo composti chimici formati da carbonio, idrogeno, ossigeno e cloro non possono essere in alcun modo generate in assenza di cloro, qualunque sia il processo e la temperatura di formazione. I fattori favorevoli alla formazione di questi prodotti sono alte temperature (250 - 450°C, al di sopra degli 850°C le diossine eventualmente prodotte vengono sostanzialmente distrutte), ambienti alcalini, presenza di luce ultravioletta e radicali nel processo chimico [30]. L'incidente all'ICMESA di Seveso è passato alla storia tra gli incidenti più rilevanti di formazione involontaria di Diossina come sottoprodotto di reazione.

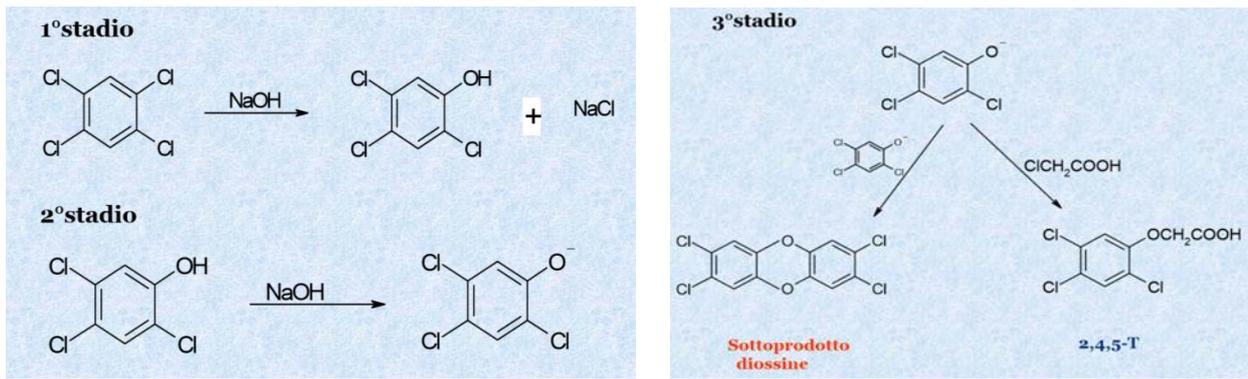


FIGURA 6 – SCHEMA DI FORMAZIONE DI OSSINA COME SOTTOPRODOTTO DELLA PRODUZIONE DI TRICLOROFENOLO (INCIDENTE SEVESO (10 LUGLIO 1976))

Le sorgenti primarie originano PCDD/F tramite due tipologie di processo: i **processi chimici-industriali**, per effetto di sintesi chimiche, e i **processi termici**, per effetto del calore.

Lo sviluppo dell'industria chimica tra il 1920 e il 1970, la mancanza di controllo e procedure di emergenza negli impianti industriali, hanno comportato un aumento delle emissioni di PCDD/F e dei livelli di concentrazione nell'aria, nel suolo e nell'acqua [31] spesso associati a incidenti (Seveso). In passato la principale fonte di questi composti era da imputarsi alla produzione di sostanze chimiche organoclorurate quali PCB e alla produzione di pesticidi, erbicidi e fungicidi come il DDT, o miscele di Agente Orange (gas utilizzato durante la guerra del Vietnam) [32]; [33]. Anche altre emissioni industriali che comportano alte temperature come gli impianti metallurgici, la sinterizzazione del minerale di ferro e la fusione dei metalli, producono involontariamente PCDD e PCDF [34]; [35]. Altri studi hanno invece dimostrato che lo sbiancamento con cloro di carta e cellulosa genera anche PCDD e PCDF [36]. Oltre alle fonti industriali, PCDD/F possono

anche formarsi naturalmente nell'atmosfera da incendi boschivi, eruzioni vulcaniche, processi biologici [37] [38] e discariche [39];

L'utilizzo di nuove e migliori tecnologie accompagnato da una diversa scelta e trattamento dei reagenti e da una normativa più mirata (es. Direttiva Seveso), ha portato ad una progressiva riduzione delle concentrazioni di PCDD/F come sottoprodotto di processi industriali, tanto che ad oggi una delle principali fonti di inquinamento da diossine/furani è correlata per lo più ai processi termici e di combustione [40].

Combustioni incontrollate (incendi accidentali) e controllate di rifiuti solidi urbani (incenerimento), la produzione di energia (combustione di combustibili fossili come carbone, petrolio e naturali [41], l'utilizzo di oli combustibili nei più diversi settori produttivi e i gli scarichi dei veicoli da trasporto che contengono composti clorurati [42], rappresentano una buona percentuale del totale di PCDD/F immesse nell'ambiente.

Gli inceneritori di rifiuti solidi urbani sono stati identificati per la prima volta da Olie et al. (1977) come una fonte significativa di emissioni di PCDD/F. La formazione avviene nella zona di post-combustione dell'inceneritore dove i composti alogenati vengono scomposti, producendo PCDD e PCDF nei gas di scarico del camino [38]. Le elevate concentrazioni di PCDD/F nei gas combusti ha indotto le autorità competenti all'individuazione e l'adozione una maggiore cautela nei riguardi delle tecnologie adottate. Dati UNEP (United Nations Environmental Programme – Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente) dimostrano come a partire dagli anni '70 i livelli di concentrazione siano diminuiti del 99,8% grazie proprio al fatto che gli inceneritori di nuova concezione adottano delle metodologie di incenerimento più efficienti.

Da quanto emerge dall'inventario nazionale delle emissioni in atmosfera 1990-2019, invece, curato da Ispra (Informative Inventory Report 2021) il trend generale mostra un decremento dal 1990 al 2019 pari al 46%.

Come sarà evidenziato nel paragrafo successivo, problema a parte è rappresentato dalle sorgenti di combustione incontrollate in cui il rilascio di PCDD/F (ma anche PCB e IPA) non è facilmente contenibile.

Il meccanismo di formazione (e distruzione) di PCDD/PCDF è abbastanza complesso e negli ultimi anni è stato investigato in molti studi di laboratorio e su scala industriale in varie condizioni [43] [44] [45]. Sono stati investigati anche gli effetti della tipologia di combustibile e di impianti utilizzati per il riscaldamento domestico sui fattori di emissione di PCDD/F [46]. Nella comunità scientifica, c'è oggi un generale consenso sui principali meccanismi di formazione e di distruzione di PCDD e PCDF che si possono riassumere in due vie principali: formazione in fase gassosa (*meccanismo omogeneo*) e su superficie solida di fly ash e di fuliggine (*meccanismo eterogeneo*). [47]

Il meccanismo omogeneo comporta reazioni tra precursori in fase gassosa, a temperature comprese tra 500° e 800°C. I precursori (per esempio, policlorobenzene o policlorofenoli) possono essere già presenti nella fase gassosa oppure possono formarsi in situ (per esempio, per reazioni di condensazione di idrocarburi alifatici) [48].

Nel meccanismo eterogeneo, PCDD/F si formano sulla superficie solida delle fly ash (o di altri materiali, in presenza di opportuni catalizzatori) a temperature comprese tra 200°C e 400°C (reazione a bassa temperatura). Ci sono due possibili cammini di reazione, il primo richiede l'accoppiamento di precursori quali clorofenoli e clorobenzene, il secondo

cammino, solitamente denominato “*sintesi de novo*”, richiede reazioni catalizzate di rottura, ossidazione e clorurazione (i tre processi possono avvenire con sequenze differenti) di una matrice carboniosa in presenza di ossigeno e di cloro gassoso oppure di cloruri presenti sulla matrice solida. La “*sintesi de novo*” rappresenta attualmente il principale meccanismo nella formazione di diossine e furani. Parte di queste PCDD/F formatesi rimangono parzialmente nella fase solida e parte come fase gassosa trasportata dal flusso di gas di scarico [49].

1.2.1 Emissioni e Immissioni

Per comprendere meglio lo stato di qualità dell’aria, è necessario approfondire le definizioni di **emissione** ed **immissione**. Pur essendo tra loro correlate esprimono concetti sostanzialmente diversi tanto che vengono regolate con strumenti normativi e di controllo differenti.

Il concetto di emissione è facilmente comprensibile e corrisponde agli effluenti rilasciati in atmosfera, sotto forma di particelle o gas, da una qualsiasi fonte (tubo di gas di scarico di un’automobile, camino di un’abitazione civile o camino industriale). Dal punto di vista normativo si definisce l’emissione in atmosfera come “*una qualsiasi sostanza solida, liquida o gassosa introdotta nell’atmosfera che possa causare inquinamento atmosferico*” (art. 268, D.Lgs 152/06). Nel caso di sorgenti industriali le corrispondenti emissioni sono sottoposte a specifiche e rigorose limitazioni (individuate anche nelle autorizzazioni), relativamente alle concentrazioni di inquinanti che possono essere introdotte nell’ambiente.

L'immissione rappresenta l'effetto dell'emissione in atmosfera che ricade al suolo (ricadute atmosferiche) e determina quindi ciò che respiriamo. È dunque alle immissioni che si dovrà fare riferimento per valutare lo stato della qualità dell'aria. Il fenomeno è complesso ed è influenzato principalmente da tre variabili:

- *Morfologia del territorio*: un'emissione ricade al suolo in maniera differente in base alla collocazione geografica della sorgente (es. se si trova posizionato in mezzo ad una valle lunga e stretta piuttosto che in pianura);
- *Direzione prevalente e forza dei venti*: influenza il trasporto dei contaminanti in una direzione piuttosto che in un'altra e la distanza di trasporto.
- *Condizioni meteo- climatiche*: il percorso dei fumi in atmosfera dipende anche dalle condizioni di insolazione, dalla pressione atmosferica e dalla temperatura. Questi fattori combinati tra loro generano differenti condizioni di "turbolenza" atmosferica e ne determinano il trasporto e la ricaduta a suolo.

Le immissioni sono quindi il risultato della cosiddetta "dispersione atmosferica" ossia il modo con il quale le emissioni si disperdono e ricadono ad altezza uomo. La relazione tra immissioni ed emissioni può essere determinata attraverso l'impiego di modelli matematici previsionali.

Come accennato precedentemente, si fa riferimento a due normative differenti, se si parla di emissioni il Testo Unico Ambientale è la norma da considerare (D.Lgs. 152/06), mentre per le immissioni si deve tenere in considerazione il D.Lgs. 155/2010 (paragrafo 1.4).

Il monitoraggio e l'analisi dello stato della qualità dell'aria viene effettuato dalle Autorità Competenti installando sul territorio idonee "centraline di monitoraggio" dotate di apparecchiature necessarie per la misura qualitativa e quantitativa delle condizioni ambientali, che si trovano in uno specifico sito di campionamento. Esse vengono posizionate in punti strategici che tengono anche conto delle diverse fonti antropiche che possono condizionare l'inquinamento atmosferico della zona considerata, rispetto ai criteri stabiliti nella norma.

1.2.2 Inventario Delle Emissioni

L'inventario Nazionale Delle Emissioni in atmosfera rappresenta lo strumento indispensabile di verifica degli impegni assunti dall'Italia a livello internazionale sulla protezione dell'ambiente atmosferico. Viene redatto sulla base di quanto stabilito dalla Convenzione Quadro delle Nazioni Unite sui Cambiamenti Climatici (UNFCCC) e dal Protocollo di Kyoto, ma anche in relazione alla Convenzione di Ginevra del 1979 sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero a lunga distanza (UNECE-CLRTAP), e alle Direttive europee sulla limitazione delle emissioni (Direttiva NEC).

Di fatto rappresenta una raccolta coerente dei valori delle emissioni disaggregate per:

- ✓ attività (es. produzione di energia elettrica, trasporti, allevamenti);
- ✓ unità territoriale (es. regione, provincia, comune);
- ✓ periodo di tempo (es. anno, mese, ora);
- ✓ combustibile utilizzato (es. benzina, gasolio, metano);
- ✓ tipo di inquinante (es. NO_x, CO);

- ✓ tipo di emissione (es. puntuali, diffuse, ecc.).

L'inventario delle emissioni viene realizzato con cadenza annuale e con riferimento al territorio nazionale per i due anni precedenti l'anno di pubblicazione. Nel 2021 è stato pubblicato l'inventario per l'anno 2019 e revisionata la serie storica dal 1990 al 2019 (*Italian Emission Inventory 1990-2019. Informative Inventory Report 2021*) [50].

L'inventario delle emissioni fornisce una stima quantitativa della pressione emissiva che insiste su un determinato territorio permettendo, inoltre, di determinare e comprendere su quale sorgente emissiva chiave può essere più efficace o prioritario agire per ridurre la formazione dell'inquinante di interesse o, nel caso di inquinanti secondari, per limitare la produzione dei precursori

La fonte di tutti i fattori di emissione utilizzati è l'EMEP/CORINAIR Atmospheric Emission Inventory Guidebook – 2007, dove è riportato un capitolo di metodologia generale relativo specificatamente alle fonti di emissione di questi inquinanti persistenti.

L'inventario viene trasmesso ufficialmente ogni anno alla Commissione Europea e agli organismi internazionali competenti, in funzione dei diversi impegni e obblighi ricadenti sull'Italia.

Il Decreto Legislativo 51 del 7 Marzo 2008 e il Decreto Legislativo n. 30 del 13 marzo 2013 conferisce all'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) la responsabilità della preparazione e realizzazione dell'inventario nazionale, in qualità di National Reference Centre dell'Agencia europea per l'ambiente (EEA).

In base all'ultimo report pubblicato da ISPRA nel periodo 1990 al 2019 si è osservata una diminuzione delle emissioni totali di IPA del 27 % (Tab. 6) e del 46% per le Diossine (Tab

7). Meno significative sono state le variazioni di concentrazione totale di emissione dei PCB (Tab 8).

	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2016	2017	2018	2019
	<i>Mg</i>									
Combustion in energy and transformation industries	0.9	1.0	0.7	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Non-industrial combustion plants	31.9	35.2	35.7	38.9	67.3	55.9	54.2	59.2	52.2	51.2
Combustion - industry	4.5	4.6	2.2	2.4	0.4	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5
Production processes	48.4	47.4	16.8	17.7	14.1	9.3	10.5	9.6	9.4	9.0
Solvent and other product use	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Road transport	2.0	2.0	2.2	2.6	2.6	2.6	2.6	2.4	2.5	2.4
Other mobile sources and machinery	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3
Waste treatment and disposal	1.4	1.5	1.4	1.4	1.2	1.3	1.3	1.2	1.2	1.2
Agriculture	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Total	89.9	92.4	59.7	64.2	86.7	70.7	70.3	74.1	66.8	65.5

TABELLA 6 - PAH EMISSION TREND FROM 1990 TO 2019 (MG)

	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2016	2017	2018	2019
	<i>g I Teq</i>									
Combustion in energy and transformation industries	24.93	27.89	20.94	13.97	8.16	6.20	5.75	5.27	4.70	4.22
Non-industrial combustion plants	173.76	164.61	150.96	87.03	134.57	112.42	108.88	118.43	103.76	101.75
Combustion - industry	116.66	120.91	112.00	118.65	65.28	58.24	59.07	59.78	55.87	56.98
Production processes	67.20	71.68	70.66	78.59	76.16	76.79	78.78	86.05	88.92	84.46
Solvent and other product use	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Road transport	10.66	13.60	18.17	21.38	20.18	13.61	12.66	11.48	10.00	9.18
Other mobile sources and machinery	1.29	1.44	1.33	1.55	1.19	0.94	1.04	1.01	1.07	1.10
Waste treatment and disposal	108.01	84.48	33.61	13.10	11.89	12.93	13.66	14.32	12.79	12.75
Agriculture	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12
Total	502.64	484.73	407.80	334.41	317.55	281.26	279.98	296.46	277.24	270.57

TABELLA 7 - DIOXIN EMISSION TREND FROM 1990 TO 2019 (G I TEQ)

	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2016	2017	2018	2019
	<i>Mg</i>									
Combustion in energy and transformation industries	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Non-industrial combustion plants	0.002	0.003	0.006	0.006	0.004	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004
Combustion - industry	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002	0.002
Road transport	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Other mobile sources and machinery	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Waste treatment and disposal	0.013	0.014	0.010	0.008	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000
Agriculture	0.119	0.084	0.007	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002
Total	0.139	0.107	0.028	0.022	0.012	0.012	0.011	0.011	0.010	0.010

TABELLA 8 - PCB EMISSION TREND FROM 1990 TO 2019 (MG)

1.2.3 Sorgenti Di Combustione Incontrollate – Incendi

Durante un incendio hanno luogo molteplici processi di tipo chimico e fisico.

Tra i processi fisici ci sono:

- ✓ riscaldamento
- ✓ evaporazione di sostanze

tra quelli chimici:

- ✓ combustione
- ✓ pirolisi
- ✓ decomposizioni
- ✓ reazioni tra i processi di combustione

La combustione può essere completa o incompleta e questo aspetto ha influenza sui prodotti che si formano. Inoltre, la formazione di IPA, PCB e PCDD/F durante una

combustione incontrollata all'aperto, dipende da vari fattori quali la varietà del materiale combusto e le condizioni di combustione (temperatura, turbolenza, ossigeno ecc..).

Contrariamente a quanto osservato per le sorgenti industriali, le emissioni prodotte da sorgenti non-industriali, in particolare quelle legate agli impianti di riscaldamento domestico e alla combustione illegale e incontrollata dei rifiuti, sembrano destinate a diminuire in maniera molto più contenuta, tanto da rappresentare una buona percentuale del totale di PCDD/F immesse nell'ambiente. C'è anche da tener presente il fatto che, per quanto riguarda gli incendi all'aperto (accidentali e/o dolosi e/o colposi), causa la molteplicità e varietà dei materiali che possono bruciare (carta, plastica, sostanze organiche, vestiti, metalli, ecc.) e la diversa natura degli incendi possibili (incendi di edifici, di automobili, rifiuti, ecc.), risulta molto difficile effettuare una stima precisa di emissione per questa categoria di sorgente.

I PCB, al pari di PCDD/F si possono generare in caso di incendio, avendo come precursore i clorobenzeni. La combustione di PCB dà luogo a Clorofenoli e PCDD/F in particolare dibenzofurani. Il meccanismo che porta alla formazione delle dibenzodiossine appare più articolato e tortuoso, per questo motivo se ne formano meno.

Numerosi studi hanno evidenziato come spesso siano gli stessi PCB e IPA [51]; [52]. che si vengono a formare durante le combustioni incomplete, a fungere da precursore per la formazione di PCDD/F in un incendio.

Molti IPA che contengono nella loro struttura la molecola fenantrene formano facilmente PCDF per scissione del legame C-C, incorporazione della molecola di O₂ e clorazione (Fig. 9) [53].

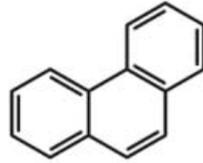


FIGURA 7 – MOLECOLA DI FENANTRENE



FIGURA 8 – MOLECOLA DI CORONENE

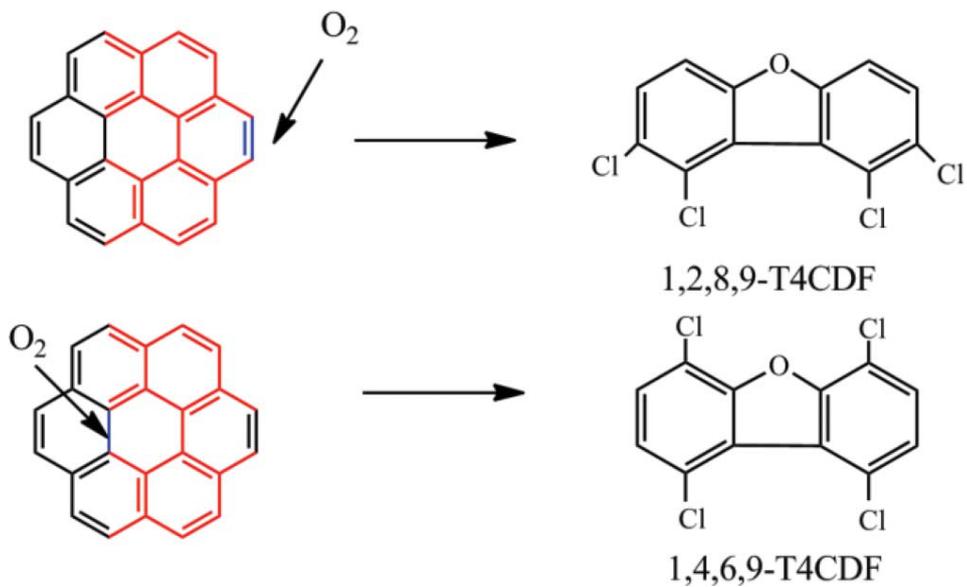


FIGURA 9 - CONVERSIONE A 1,2,8,9-TCDF O 1,4,6,9-TCDF A PARTIRE DALLA MOLECOLA DI CORONENE

1.3 Distribuzione Ambientale

A causa della loro natura persistente e lipofilia, una volta che IPA, PCDD/F e PCB entrano nell'ambiente e negli organismi viventi, rimarranno per un tempo molto lungo, come molti altri composti aromatici alogenati [40].

L'aria è un compartimento significativo per la distribuzione ambientale di questi microinquinanti organici. Le caratteristiche chimico-fisiche di questi composti, consentono il trasporto attraverso correnti atmosferiche in luoghi lontani dalle sorgenti di emissione. [54]. Conoscere la forma (gas o particolato) in cui queste sostanze si trovano nell'atmosfera è importante in quanto da essa dipendono i fenomeni a cui tali inquinanti sono sottoposti (trasferimento in altre matrici e meccanismi di degradazione).

Gli IPA sono relativamente poco solubili in acqua e poco volatili. Tendono a non diffondersi evaporando e generalmente finiscono nell'ambiente adsorbiti sulle particelle che si liberano dai materiali con l'usura. L'essere umano può assumere gli IPA in tre modi: per via orale consumando alimenti, per via respiratoria inalando pulviscolo o per via cutanea venendo in contatto con materiali che li contengono.

I PCB tendono a concentrarsi nella matrice suolo e sedimento, ma trovano nell'acqua un'ottima via di diffusione una volta adsorbiti sulle particelle minerali ed organiche presenti in sospensione.

Le PCDD/F sono composti definibili "semivolatili" e, nell'atmosfera, sono presenti sia in fase vapore che adsorbite su particolato.

Molti studi di letteratura, sia a livello europeo che nazionale, hanno evidenziato una variazione stagionale delle concentrazioni di PCDD/F e di PCB-DL in aria ambiente [55]. Uno studio italiano ha investigato nei 7 capoluoghi di provincia del Veneto (siti di fondo urbano) i livelli di concentrazione di PCDD/F e PCB-dl in aria ambiente. Il campionamento è stato effettuato in diversi periodi dell'anno, per tenere conto delle variazioni meteorologiche stagionali. Con questo studio gli autori hanno dimostrato che la dispersione di queste sostanze nell'ambiente varia non solo a seconda delle stagioni ma è fortemente influenzata dalle condizioni di stabilità atmosferica. Per le PCDD/F vengono registrati livelli massimi durante i mesi invernali e minimi durante quelli estivi, con differenze di concentrazione molto accentuate tra le due stagioni. Al contrario per i PCB-DL, si osservano livelli più alti durante la stagione estiva rispetto a quella invernale [56].

Il monitoraggio della deposizione di particelle nell'aria contribuisce notevolmente alla conoscenza della dinamica dell'inquinamento in un'area, consentendo di studiare i flussi di deposizione e il destino ambientale degli inquinanti con l'obiettivo di affrontare la potenziale esposizione per la popolazione.

La deposizione di questi microinquinanti sul suolo, vegetazione e/o superfici acquatiche, può avvenire attraverso meccanismi di:

- ✓ *deposizione umida* (rimozione attraverso precipitazioni);
- ✓ *deposizione secca di particolato* (caduta gravitazionale delle particelle) ed
- ✓ *deposizione secca della fase vapore* (assorbimento di queste sostanze in fase vapore dalla vegetazione).

Il trasferimento sulla vegetazione di tutti i congeneri delle diossine, esclusi HpCDD/F e OCDD/F (presenti principalmente nel particolato atmosferico), avviene attraverso meccanismi di deposizione secca della fase vapore, mentre i congeneri *epta* e *octa* sostituiti contaminano suolo e vegetazione attraverso meccanismi di deposizione secca e umida di particolato.

In uno studio italiano gli autori [57] hanno misurato le deposizioni totali (bulk) per una valutazione ambientale delle concentrazioni ambientali di IPA, PCB e PCDD/F in siti vicino l'area portuale di Civitavecchia. I dati raccolti dalla deposizione di massa sono utili per stimare la contaminazione dei terreni agricoli e un successivo accumulo nella catena alimentare (i POPs sono particolarmente associati ai grassi). I risultati della caratterizzazione chimica delle deposizioni hanno mostrato che le maggiori differenze tra i siti sono attribuibili al contenuto di PCDD/Fs. Infatti, il contenuto totale di metalli e quello totale degli IPA sono comparabili tra i quattro siti, mentre i PCDD/F e i DL-PCB tra i siti di Roccaccia e Rocca Respanpami sono 3-4 ordini di grandezza superiori rispetto alle altre due località. Ciò fa pensare che quanto osservato sia dovuto ad attività svolte localmente, probabilmente riconducibili ad attività zootecniche e agricole. Ciò è concepibile osservando le differenze stagionali nel contenuto di PCDD/F e PCB-DL nei diversi siti. Contributi più elevati di PCDD/F e DL-PCB nelle deposizioni si osservano principalmente in estate e in autunno.

Nello stesso articolo vengono anche paragonati i valori di concentrazione di deposizione di IPA e PCDD/F ricavati per differenti località italiane ed europee.

LOCALITA'	tipologia sito	Benzo[a]Pirene	rif.
		ng/m ² *d	
AOSTA	sito urbano	28	[58] – [59]
Nord-ovest Italia	area rurale	5	
Venezia	sito urbano	30	[60]
Nord-est Italia	area rurale	6 - 9	
Perugia centro Italia	sito urbano	5,0 - 14	[61]
Terni	sito urbano	10 -11	[61]
centro Italia	sito industriale	18 - 27	
Latina	sito urbano	1,4 - 7,1	[57]
centro Italia	sito industriale	1,4 - 4,6	
	area rurale	1,1 - 3,9	
Melfi	sito urbano	3,2 - 4,1	[62] - [63]
sud Italia	sito industriale	4,6 - 6,9	
	area rurale	140	
	sito remoto/riferimento	1,9 - 5,7	
Tarano	sito urbano	2,0 - 182	[64]
sud Italia	sito industriale	57 - 555	
	area rurale	5,6 - 42	
Finlandia	sito remoto	51 - 280	[65]
	area rurale	2 - 10	
Rorvik (Svezia)	area rurale	5 - 17	[66]
Parigi (Francia)	sito urbano	25	[67] – [68]
Cardiff, Manchester UK	sito urbano	219 -300	[69]

TABELLA 9 – LIVELLI DI B[A]PNELLE DEPOSIZIONI. CONFRONTO TRA DIVERSI SITI ITALIANI ED EUROPEI

LOCALITA'	tipologia sito	PCDD/F	rif.
		pg I-TE/m ² *d	
AOSTA	sito urbano	0,6 -3,0	[70]
Nord-ovest Italia	area rurale	3,7	
Venezia	sito urbano	13 - 200	[60]
Nord-est Italia	sito industriale	15 - 2767	
Mantova	sito urbano	1,2 - 4,2	[58]
Nord Italia	sito industriale	1,3 - 5,1	
	area rurale	1,3 - 2,7	
Stroncone, Terni centro Italia	sito urbano	< 5,0	[61]
Latina centro Italia	sito urbano	1,4 - 7,1	[57]
	sito industriale	1,4 - 4,6	
	area rurale	1,1 - 3,9	
Tarano sud Italia	sito industriale	0,57 - 45	[64]
	area rurale	1,6 -33	
Melfi su Italia	sito industriale	1,7 -2,1	[63] – [71]
	area rurale	1,2 -2,7	
Belgio	sito urbano	< 1 - 12	[72]
	area rurale	< 1 - 3,1	
Germania	sito urbano	< 0,5 - 464	[73] – [74]
	area rurale	7 -17	
Regno Unito	sito urbano	<1 - 312	[69]
	area rurale	0 - 517	
Danimarca	sito urbano	300 - 31600	[75] – [76]
	area rurale	300 1700	
Francia	sito urbano	100 - 147	[77]
	area rurale	20 - 50	

TABELLA 10 – LIVELLI DI PCDD/F NELLE DEPOSIZIONI. CONFRONTO TRA DIVERSI SITI ITALIANI ED EUROPEI

1.3.1 Valori Di Fondo Dei Comparti Ambientali

I valori di fondo e gli andamenti stagionali degli IPA, invece, sono nella maggior parte dei casi noti. Molte ARPA, infatti, attraverso l'istallazione di centraline monitorano questi analiti in continuo. I dati sono presenti nei siti delle Agenzie relativamente al territorio di competenza.

Diverso è per PCB E PCDD/F. In Italia la legislazione ancora non prevede un Piano di Monitoraggio e Controllo a livello locale delle concentrazioni di questi microinquinanti organici. Esistono tuttavia una serie di campagne di monitoraggio e di dati di letteratura che rappresentano una base di partenza per una valutazione più dettagliata dell'estensione della contaminazione da POPs. Indagini di questo tipo, in alcuni casi, hanno avuto anche come obiettivo quello di andare a valutare i *valori di fondo*, di specifici contaminanti, nei vari comparti ambientali. Questo parametro assume particolare rilievo nel caso di PCDD/F poiché, come già detto, a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche, esse si possono trovare anche in matrici/comparti ambientali molto distanti dalle sorgenti che li hanno generati. È importante ricordare, inoltre, che per i PCDD/F non è previsto un limite di legge in aria ambiente, esistono solo delle linee guida. Pertanto, quale primo riferimento, si possono considerare le concentrazioni di PCDD/F di fondo, ovvero determinate in condizioni non alterate. Data la complessità e l'onerosità delle analisi di PCDD/F, però, i dati storici per questa classe di inquinanti non sono molto numerosi.

Sono presenti in letteratura dei dati relativi ai valori di fondo per diverse località del Nord America (fonte EPA) sia per quanto riguarda i PCB-DL che i PCDD/F. I dati di queste

indagini si riferiscono a matrici ambientali che sono rappresentative di zone lontane da potenziali sorgenti di emissione (Tab 11) [23].

Matrice ambientale	PCDD/PCDF (TEQ – WHO)	PCBdl (TEQ- WHO)
Suolo urbano	9,3 ppt	2,3
Suolo rurale	2,7 ppt	0,59
Sedimento	5,3 ppt	0,53
Aria urbana	0,12 pg/m ³	0,0009
Aria rurale	0,013 pg/m ³	0,00071
Acqua	0,00056 pg/kg	-

TABELLA 11 - VALORI DI FONDO PER DIVERSE LOCALITÀ DEL NORD AMERICA (FONTE EPA)

È comunemente accettato che l'intervallo tipico di concentrazione per PCDD/F sia 20–50 fg I-TEQ /m³ per i siti rurali, e 100–400 per i siti urbani/industriali [78].

In una review del 2021 [79] gli autori hanno raccolto i dati di differenti studi mettendo a confronto i valori di PCDD/F in aria ambiente in diverse zone del sud-estt asiatico, Asia, Europe, America, Africa e Oceania per un periodo temporale dal 2008 al 2017. Le misurazioni dei PCDD/PCDF di fondo nel monte Lulin in Vietnam hanno rilevato livelli relativamente bassi compresi tra 0,7 e 4,1 fg TEQ /m³ e leggermente superiori durante una stagione di combustione della biomassa da 2,6-19,1 fg TEQ/m³. Confrontando diversi ambienti (urbani, rurali e industriali), nei siti industriali e urbani si osservano livelli di PCDD/F significativamente più elevati rispetto a quelli misurati nelle aree rurali (compresipresi tra 10 e 38 fg TEQ/m³). Inoltre, è stato osservato un aumento dei valori nelle zone interessate da combustione di rifiuti, (466–1110 fg TEQ/m³). I livelli ambientali nelle aree urbane e rurali della regione (23–565 fg TEQ/m³) rientrano nei limiti standard

ambientali PCDD/PCDF del Giappone (600 fg TEQ/m³). Rispetto ad altre regioni, i livelli di PCDD/PCDF nelle aree rurali in Europa sono tre volte più alti che nel sud-est asiatico e 4,6 volte più alti nelle aree urbane della Cina e della Corea del Sud.

sito	paese	continente	anno	concentrazione fg I -TEQ/m ³	riferimento	
BACKGROUND	Taiwan	Asia	2013	1,6 -3,2 ^(a)	110	
	Sud Corea	Asia	2008 - 2017	15 - 51	111	
	Italia	Europa	2005 - 2006	1 -215 ^(a)	112	
	Danimarca	Europa	2002 - 2003	3 -180	113	
RURALE	Taiwan	Asia	2010	1,5 -10,8	114	
	Spagna	Europa	1994 - 2000	5 - 125	115	
	Stati Uniti	America	2002 - 2006	13,9 ^(a)	116	
	Argentina	America	2012 - 2013	3 ±2,7 ^(a)	117	
	Australia	Oceania	2003	1,94 - 2,82	118	
	URBANO	Cina	Asia	2001 - 2016	10 - 1000	119
Sud Corea		Asia	2009	271 - 2600	120	
Danimarca		Europa	1994 - 2002	10 -357	113	
Stati Uniti		America	2002 - 2006	30 ^(a)	116	
California		America	2003 - 2005	13 -43 ^(a)	121	
Argentina		America	2012 - 2013	33 ± 50 ^(a)	117	
Australia		Oceania	2003	11,8 -12,5 ^(a)	118	
INDUSTRIALI		Cina	Asia	2016	65 -2029 ^(a)	122
		Italia	Europa	2003	144 - 337	[56]
		Stati Uniti	America	2002 - 2006	140 ^(a)	116
	Algeria	Africa	2008 - 2009	596 - 775	124	

TABELLA 12 – LIVELLI DI PCDD/F IN ARIA AMBIENTE IN ASIA, EUROPA, AMERICA, AFRICA E OCEANIA (A, WHO-TEQ)

I PCDD/PCDF atmosferici nelle aree industriali di altri continenti come Europa, Africa, America e Oceania che vanno da 65 a 2029 fg TEQ/m³ sono simili a quelli del sud-est asiatico.

Rispetto ad altri paesi europei, vi è una sostanziale scarsità di informazioni sulla contaminazione di fondo di PCDD/F in Italia. Esistono tuttavia alcuni studi che hanno affrontato il problema.

In una pubblicazione di ARPA Lombardia [80] viene ribadita l'importanza di avere informazioni sulle concentrazioni di fondo dei contaminanti di interesse, in modo tale da garantire anche una corretta interpretazione dei risultati nel momento in cui si verificano situazioni emergenziali come gli incendi. Per colmare questa lacuna l'Agenzia lombarda ha raggruppato tutti i dati a disposizione dalle varie campagne di monitoraggio eseguite negli anni.

I dati mostrati in tabella 13 mostrano che, in condizioni di qualità dell'aria non alterata da eventi emissivi straordinari, la concentrazione di PCDD/F è generalmente inferiore 0,10 pgTEQ/m³, valore considerato come concentrazione di riferimento tipica in ambito urbano.

È in base a questo che di solito si considera quale riferimento, per il rientro ad una condizione indicativa di un impatto non significativo sulla qualità dell'aria di un incendio, fatto salvo ovviamente eventuali altri specifici indicatori, una concentrazione di PCDD/F inferiore a 0,30 pgTEQ/m³ (300 fgTEQ/m³).

LOCALITA'	PROVINCIA	PERIODO		PCDD/F (media pg TEQ/m3)
Bottanuco	BG	dic-16	feb-17	0,075
Filago	BG	dic-16	feb-17	0,03
Madone	BG	dic-16	feb-17	0,046
Bergamo	BG	dic-16	feb-17	0,029
Brescia Via Cantore	BS	dic-13	mar-14	0,021
Brescia Via Cantore	BS	dic-15	feb-16	0,117
Brescia Circostrizione	BS	feb-13	mar-14	0,035
Brescia Villaggio Sereno	BS	feb-13	mar-14	0,028
Milano Via Pascal	MI	lug-13	ago-13	0,01
Milano Via Pascal	MI	feb-14	mar-14	0,034
Dorno	PV	dic-16	feb-17	0,035
Galliavola	PV	dic-17	feb-18	0,012
Parona	PV	lug-13	ago-13	0,056
Parona	PV	feb-14	mar-14	<0,060
Pieve Albignola	PV	dic-16	dic-16	0,027
Pieve Albignola	PV	feb-17	feb-17	0,014

TABELLA 13 – VALORI DI PCDD/F NELLE VARIE PROVINCE LOMBARDE

Un altro studio italiano sull'inquinamento atmosferico da IPA, PCDD/F e PCB considera dati raccolti contemporaneamente in un sito di background regionale nel centro Italia e in un sito urbano a Roma [81]. In tabella 14 vengono riportati i dati relativi alla sommatori degli analiti calcolata come medium bound.

ANALITA	URBANO	Regional background site (BG)
PCDD/F (fg TEQ/m ³)	65,4	2,95
PCB(fg TEQ/m ³)	2,44	0,53
IPA (BENZO(A)PIRENE (ng/m ³))	1,128	0,016

TABELLA 14 – VALORI DI IPA, PCB E PCDD/F IN UN SITO URBANO E DI BACKGROUND

Gli autori al termine di questo studio dimostrano che per IPA e PCDD/F le concentrazioni medie annuali di fondo sono in linea con i pochi livelli disponibili nei siti di fondo/remoti in Europa. Secondo questi dati, l'inquinamento medio più basso recentemente misurato in Europa sembra essere dell'ordine di 0,01 ng/m³ per B[a]P e di pochi fg TEQ/m³ per PCDD/Fs. Analoghe considerazioni non possono essere fatte per la classe dei PCB, sia perché in letteratura sono presenti pochi dati e sia per la diversa selezione dei congeneri effettuata dai ricercatori negli studi.

Un'altra pubblicazione sempre Italiana dell'Arpa Veneto [82] riporta i dati di diverse campagne di monitoraggio condotte su vari siti per IPA, PCB e PCDD/F nella provincia di Venezia. Lo scopo di tale lavoro è stato quello di investigare i livelli in aria ambiente e nelle emissioni, nello specifico di 4 IPA, 12 PCB, 7 PCDD E 10 PCDF.

Nella seguente tabella (Tab. 15) sono riportati i risultati ottenuti da queste campagne di monitoraggio, per quanto riguarda PCB e PCD/F è stata riportata la sommatoria.

ANALITA	rurale background remoto	Traffico	industriale	background urbano (1)	background urbano (2)
Benzo(a)antracene (ng/m ³)	0,51	2,9	1,11	1,77	0,75
Benzo(a)pirene (ng/m ³)	0,65	2,97	1,68	2,28	1,16
Benzo(b)fluorantene (ng/m ³)	0,98	3,29	1,93	2,42	1,39
Benzo(k)fluorantene (ng/m ³)	0,35	1,31	0,96	1,24	0,69
PCDD/F (I-TE pg/m ³)	0,014	0,0609	0,0724	0,0527	0,0248
PCB-DL (WHO-TE pg/m ³)	0,001	0,005	0,004	0,005	0,002

TABELLA 15 - LIVELLI IN ARIA AMBIENTE E NELLE EMISSIONI, NELLO SPECIFICO DI IPA, PCB E PCDD/F

Come si può osservare dai dati, concentrazioni maggiori si riscontrano nelle zone industriale e successivamente in quelle di traffico. Questa situazione è coerente con quanto atteso: i microinquinanti sono maggiormente presenti nelle zone interessate da maggiori pressioni.

I dati di letteratura non sono sufficienti a descrivere lo stato di qualità dell'aria, relativamente a queste tipologie di contaminanti organici, anche perché molti studi vengono condotti con metodiche e protocolli differenti, pertanto anche un confronto dei dati può diventare complicato. C'è anche da dire che molti di questi studi sono stati condotti in tempi non recentissimi e che queste sostanze hanno la capacità di venire trasportate dalla sorgente di contaminazione per lunghe distanze. A tal proposito, lo studio della variazione stagionale delle concentrazioni dei POPs può fornire, in via preliminare, degli indizi sul ruolo dei fattori meteorologici e della diversa capacità dispersiva dell'atmosfera nell'influenzare l'inquinamento legato a questi composti. Tale indagine, specialmente per le diossine e i furani, può aiutare a mettere in relazione la variazione dei livelli di questi composti in atmosfera, con sorgenti emissive tipicamente stagionali (ad esempio le combustioni legate al riscaldamento domestico).

Per tutti questi motivi, la pianificazione di campagne di monitoraggio ad hoc [83] per periodi di tempo congrui, diventa quindi condizione essenziale per la comprensione di un fenomeno quale l'inquinamento da micrionquinanti organici.

1.4 Normativa

Il tema delle emissioni in atmosfera è affrontato a livello europeo sotto diversi profili; in particolare, è possibile distinguere, da un lato, la normativa relativa alle emissioni industriali e, dall'altro, la disciplina sulla qualità dell'aria ambiente. A questi due macro-ambiti si aggiungono, poi, ulteriori norme di dettaglio (ad esempio per quanto riguarda i cambiamenti climatici o particolari tipi di inquinanti).

Nonostante i molteplici interventi normativi, l'inquinamento atmosferico ancora oggi determina significativi impatti negativi per l'ambiente e la salute umana, come rilevato dalla Commissione europea nella comunicazione del 18 dicembre 2013 intitolata "Aria pulita per l'Europa". Da ciò è nata la proposta di un nuovo pacchetto di misure in tema di qualità dell'aria con orizzonte temporale al 2030 (coerentemente con gli impegni internazionali assunti dall'Unione europea e dagli Stati membri)

La normativa italiana in materia di tutela dell'inquinamento è stata emanata in attuazione delle direttive dell'Unione Europea il cui recepimento è obbligatorio, pena una procedura di infrazione. Analogamente alla normativa europea, la legislazione si articola su due piani: La qualità dell'aria e la disciplina delle emissioni in atmosfera (Decreto legislativo, 03/04/2006 n° 152, parte V).

La normativa di riferimento tuttavia presenta alcune lacune. Per microinquinanti come PCDD/PCDF e/o PCB in aria ambiente non sono al momento stati stabiliti né a livello europeo, né a livello nazionale o regionale valori limite o soglie di riferimento.

Concentrazioni di tossicità equivalente (TEQ) in ambiente urbano di diossine e furani sono stimati (dati OMS nel documento "Air Quality Guide Lines for Europe") pari a circa 0,1

pg/m³, anche se è elevata la variabilità da zona a zona, mentre concentrazioni in aria di 0,3 pg/m³ o superiore sono indicazioni per fonti di emissione localizzate che devono essere identificate e controllate.

Non sono reperibili valori guida o di riferimento per i PCB.

1.4.1 Decreto legislativo del 13 Agosto 2010 n. 155

Il D.Lgs.155/2010 “Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa”, aggiornato nel 2012 con il D.Lgs. 250, costituisce la norma quadro in materia di controllo dell'inquinamento atmosferico. Definito anche Testo Unico sulla qualità dell'aria, fissa i limiti di accettabilità ed i requisiti di qualifica dell'aria nei centri urbani e più in generale sul territorio. Costituito da 22 Articoli, 16 Allegati e 10 Appendici, il Decreto definisce l'elenco degli inquinanti per i quali è obbligatorio il monitoraggio (5) e introduce il concetto di zonizzazione del territorio nazionale a carico di Regioni e Province autonome. Elaborata sulla base di diversi fattori come la densità emissiva, le caratteristiche orografiche e meteo-climatiche e il grado di urbanizzazione, la zonizzazione generalmente viene rivista ogni 5 anni a meno di significative modifiche della concentrazione degli inquinanti nell'aria ambiente. Ogni regione deve quindi possedere e tenere costantemente aggiornato un *Inventario delle Emissioni* relativo alla propria regione, che costituisce uno strumento di conoscenza delle pressioni rappresentando un supporto decisionale per la pianificazione delle politiche ambientali sia su scala regionale che locale. Per il Lazio, è L'ARPA Lazio a gestisce l'Inventario Regionale

(5) NO₂, NO_x, SO₂, CO, O₃, PM₁₀, PM 2.5, Benzene, Benzo(a)pirene, Piombo, Arsenico, Cadmio, Nichel, Mercurio, Precursori dell'ozono.

delle Emissioni, reso pubblico e quindi consultabile sul sito dell’Agenzia alla sezione Aria insieme al riesame della zonizzazione e all’aggiornamento della classificazione dei comuni del territorio Laziale (Deliberazione del 28 maggio 2021, n. 305).

La norma, abbastanza dettagliata, definisce negli Allegati anche i metodi di campionamento ed analisi oltre alle soglie di valutazione, i valori limite e i valori obiettivo.

Nell’elenco degli inquinanti da monitorare solo gli IPA, delle tre classi di contaminanti di interesse per questo lavoro, è preso in considerazione e nello specifico tra questi il Benzo(a)pirene (Tab. 16).

SOSTANZA	VALORE OBIETTIVO	RIFERIMENTO
Benzo(a)pirene	1 ng/Nm ³	All. XIII D.Lgs.155/10

TABELLA 16- VALORE OBIETTIVO BAP IN ARIA AMBIENTE

Il valore obiettivo è riferito al tenore totale di BaP presente nella frazione PM10 del materiale particolato, calcolato come media su un anno civile.

Qualora siano riscontrati dei superamenti dei livelli di inquinanti - e in ogni caso per preservare la qualità dell’aria anche qualora i valori limite e i valori obiettivo siano rispettati - le Regioni (anche congiuntamente sulla base di accordi interregionali) e le Province autonome sono chiamate ad adottare appositi piani e misure, in collaborazione con gli enti locali interessati, per garantire il rispetto dei valori limite e il raggiungimento degli obiettivi nonché per garantire, complessivamente, il livello di qualità dell’aria.

Il D.Lgs. n. 155/2010 non prevede un apparato sanzionatorio autonomo per la violazione dei valori limite di qualità dell’aria previsti; tuttavia, l’art. 29-quattordicesimo, comma 4,

D.Lgs. n. 152/2006, prevede sanzioni penali per colui che non osservi le prescrizioni autorizzative (o imposte delle autorità) laddove il relativo superamento dei limiti emissivi comporti superamento dei valori limite di qualità dell'aria. Ancora, nella disciplina generale in tema di emissioni in atmosfera degli impianti industriali (parte V del D.Lgs. n. 152/2006) è previsto che l'autorizzazione alle emissioni possa determinare i valori limite di emissione tenendo conto degli obiettivi di qualità dell'aria nella zona in cui si colloca l'impianto.

1.4.2 Decreto legislativo del 03 Aprile 2006 n. 152

Il D.Lgs.152/2006 "*Testo Unico Ambientale*" o più impropriamente "*Codice dell'Ambiente*", recentemente aggiornato con le modifiche introdotte dal D.Lgs. 22/2021, si articola in sei parti. La parte V "*Norme in materia di tutela dell'aria e di riduzione delle emissioni in atmosfera*" (Artt. 267-298) e la V *bis* "*Disposizioni per particolari installazioni*" (Art. 298 bis), sono quelle relative alla matrice aria. Questa norma stabilisce i valori di emissione, le prescrizioni, i metodi di campionamento e di analisi e infine i criteri per la valutazione della conformità dei valori misurati ai valori limite, per impianti e attività che producono emissioni in atmosfera. In un primo momento sono stati esclusi dal campo di applicazione di questo decreto tutti gli impianti disciplinati dal D.Lgs.133/2005, recante attuazione della direttiva 2000/76/CE, in materia di incenerimento dei rifiuti. Il Dlgs.46/2014 ha successivamente inserito, nel corpo del Testo Unico Ambientale, gli articoli 237 *bis e ss.* che modificano la disciplina prima contenuta del D.Lgs. 133/2005 la cui abrogazione è differita al 1° gennaio 2016.

I valori di emissione minimi e massimi per le sostanze inquinanti sono riportati nelle tabelle degli allegati alla parte V, nello specifico:

- ✓ Tabella A1 - Sostanze ritenute cancerogene e/o tossiche per la riproduzione e/o mutagene (IPA);
- ✓ Tabella A2 - Sostanze di tossicità e cumulabilità particolarmente elevate (PCB, Diossine).

Come evidenziato in Tab. 17, nella norma, viene fatta una distinzione tra soglia di rilevanza espressa come flusso di massa e valore di emissione espresso come concentrazione.

SOSTANZA	SOGLIA DI RILEVANZA	LIMITE CONCENTRAZIONE	RIFERIMENTO
IPA ⁽⁶⁾	0,5 g/h	0,1 mg/Nm ³	Tab. A1 allegato I parte V
PCDD/PCDF	0,02 g/h	0,01 mg/Nm ³	Tab. A2 allegato I parte V
PCB	0,5 g/h	0,5 mg/Nm ³	Tab. A2 allegato I parte V

TABELLA 17 - VALORI DI EMISSIONE IN ATMOSFERA. D.LGS.152/2006 PARTE V

L'art. 269, D.Lgs. 152/2006 introduce il principio per cui tutti gli stabilimenti che producono emissioni devono essere previamente autorizzati. Il gestore, cioè la persona fisica o giuridica che ha potere decisionale in merito all'istallazione o l'esercizio dello

⁽⁶⁾ Benzo(a)pirene; Dibenzo(a,h)antracene; Benzo(a)antracene; Benzo(b)fluorantene; Indeno(1,2,3-cd)pirene 2-Nitronaftalene; Benzo(j)fluorantene; Benzo(k)fluorantene; 5-Nitroacenaftene Dibenzo(a,h)acridina; Dibenzo(a,j)acridina; Dibenzo(a,e)pirene; Dibenzo(a,h)pirene; Dibenzo(a,i)pirene; Dibenzo(a,l)pirene; 2-naftilammina e suoi Sali

stabilimento e che ne risulta responsabile dell'applicazione dei limiti e delle prescrizioni previste dalla disciplina, deve presentare all'Autorità competente una domanda di autorizzazione accompagnata dalla idonea documentazione. Questa comprende:

- ✓ Progetto dello stabilimento: in cui sono descritti gli impianti e le attività, le tecniche adottate per limitare le emissioni (BAT, Best Available Techniques) e la quantità e la qualità di tali emissioni, le modalità di esercizio, la quota dei punti di emissione, i parametri che caratterizzano l'esercizio e la quantità, il tipo e le caratteristiche merceologiche dei combustibili di cui si prevede l'utilizzo, nonchè, per gli impianti soggetti, il minimo tecnico definito tramite i parametri di impianto che lo caratterizzano;
- ✓ Relazione tecnica: descrive il complessivo ciclo produttivo in cui si inseriscono gli impianti e le attività in grado di indicare il periodo previsto intercorrente tra la messa in esercizio e la messa a regime degli impianti.

Di norma, l'autorizzazione viene rilasciata per lo stabilimento nel suo complesso e non per i singoli impianti o le singole attività nello stesso presenti, salvo casi specifici. Questo è il motivo fondamentale per cui è assolutamente necessaria l'indicazione specifica di tutte le sorgenti di emissione da inserire nella domanda di autorizzazione alle emissioni, compresi i dispositivi mobili.

2. Stato Dell'arte

2.1 Metodi di analisi IPA/PCB/Diossine

Solitamente, nello sviluppare una metodica analitica, si fa riferimento a metodi standard quali quelli indicati dall'EPA o UNI-EN. In questo paragrafo verranno approfondite le metodiche di riferimento e quelle presenti in bibliografia, con lo scopo di utilizzarle come punto di partenza per la messa a punto della metodica in esame.

Gli *EPA's Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air* sono una raccolta di 17 metodi standardizzati sottoposti a revisione paritaria, per la determinazione di inquinanti organici tossici volatili, semivolatili e selezionati nell'aria. L'EPA (United States Environmental Protection Agency) ha sviluppato questo compendio di metodi per assistere il personale di regolamentazione federale, statale e locale nello sviluppo e nel mantenimento delle competenze necessarie e della tecnologia di monitoraggio aggiornata per la caratterizzazione degli inquinanti organici nell'aria ambiente.

Questi metodi sono estremamente dettagliati: descrivono le modalità operative dal campionamento fino all'espressione del risultato analitico, riportando anche i criteri di accettabilità del risultato analitico in base all'utilizzo di particolari standard (campionamento, siringa e processo) cosiddetti "Marcati" aggiunti e ai loro recuperi.

L'US-EPA ha stabilito quattro metodi per determinare i 17 congeneri di PCDD/PCDF nell'aria, vale a dire il TO-9A, 1613B, 8290A e 0023A (US-EPA, 1994, 1996, 1999, 2007). È anche comune trovare in letteratura una combinazione di questi metodi.

Per l'analisi strumentale di PCDD/Fs è previsto l'utilizzo di strumentazione gascromatografia ad alta risoluzione (HRGC, High Resolution Gas Chromatography) con spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry). La tecnica analitica HRGC-HRMS è considerata il "*gold standard*" per la determinazione di PCDD/PCDFs [84].

Nella tabella 18 viene riportato un elenco delle tecniche analitiche e delle metodiche di riferimento di alcuni dei lavori presenti in letteratura.

Campione	Analita	Tecnica analitica	Metodo	Anno	Riferimento
AIR, SOIL	PCDD/F	Soxhlet 8 h HRGC/HRMS DANI (Electron Impact Mode)	US – EPA	2004	[85]
AIR	PCDD/F PCB-DL	ASE GC-HRMS (DFS magnetic sector)	EPA1613	2021	[86]
AIR	PCDD/F PCB-DL	ASE GC-HRMS	EPA 1613B/94 e TO-9A (EPA, 1994, 1996	2018	[56]
AIR	PCDD/F PCB-DL IPA	ultrasonically extracted Soxhlet 24H (puf) GC-HRMS GC-LRMS	-	2007	[81]
AIR	PCDD/F PCB-DL	Soxhlet 16 h GC-HRMS	USEPA TO-9A	2018	[87]
AIR	PCDD/F PCB-DL	Soxhlet 24 h HRGC/HRMS	Method TO-9A	2010	[88]
SOIL, SEDIMENT	PCDD/F	ASE GC × GC–TOFMS	-	2011	[89]
AIR and BOTTOM ASH	PCDD/F	HRGC-HRMS	EPA1613	2019	[90]

TABELLA 18- METODI E SPECIFICHE ANALITICHE PRESENTI IN LETTERATURA PER LA DETERMINAZIONE DI IPA, PCB E PCDD/F

Quando vi sono situazioni emergenziali che interessano la salvaguardia della salute dell'uomo in primis e dell'ambiente, è fondamentale per il laboratorio produrre risultati solidi, robusti, affidabili e comparabili. Queste garanzie possono essere fornite, in buona parte, dall'applicazione di metodi di analisi normalizzati ⁽⁷⁾ e dall'accreditamento del laboratorio di prova. ARPA Lazio è accreditata secondo la norma internazionale UNI EN

⁽⁷⁾ metodo emesso da organizzazioni tecniche nazionali o internazionali (ad es. Rapporti ISTISAN, Quaderni IRSA, ecc) e metodo sviluppato da laboratori/centri di riferimento nazionali o comunitari o da centri di referenza nazionali accreditati. Elemento discriminante è che la responsabilità dei dati forniti è riferita non all'organizzazione che lo ha emesso, ma ai singoli autori.

ISO 17025:2019 come laboratorio Multisito dal 2004. L'ente che si occupa di attestare la competenza, l'indipendenza e l'imparzialità dei laboratori di prova è l'Ente Unico di Accredimento ACCREDIA. Come si evince dal documento ACCREDIA RT-08 "Il laboratorio deve, ove possibile, utilizzare metodi ufficiali in vigore, metodi definiti da regole tecniche ⁽⁸⁾ o norme ⁽⁹⁾" [91].

L'utilizzo di metodi normalizzati è un argomento che si ripropone in più documenti e spesso è lo stesso decreto legge che impone limiti di concentrazione a suggerire (a volte in maniera perentoria) la metodica di analisi da adottare.

Quasi tutte le norme prevedono la possibilità di utilizzare dei metodi alternativi a quelli normalizzati detto *metodi equivalenti* purché ne venga attestata l'equivalenza attraverso apposita validazione. Nel Caso dell'aria ambiente (D.Lgs. 155/10) è rilasciata secondo i principi, le metodologie e le procedure di prova indicati nelle "guide to the demonstration of equivalence of ambient air monitoring methods" pubblicato dalla Commissione Europea e nei successivi atti che modificano o sostituiscono tali linee guida [92].

Ovviamente, la scelta del metodo di prova deve essere effettuata dal laboratorio, tenendo conto delle esigenze del cliente/utente, della finalità delle analisi, della disponibilità di strumentazione e materiali, delle competenze degli operatori e di eventuali considerazioni economiche.

⁽⁸⁾ Regola tecnica: documento, emanato da una autorità, che riporta requisiti tecnici obbligatori o direttamente o tramite riferimenti, oppure incorporando il contenuto di una Norma

⁽⁹⁾ Norma: documento prodotto mediante consenso e approvato da un organismo riconosciuto che fornisce, per usi comuni e ripetuti, regole, linee guida o caratteristiche relative a determinate attività o ai loro risultati, al fine di ottenere il miglior ordine in un determinato contesto. Norma di prova: Norma che stabilisce e descrive i metodi di prova, talvolta accompagnati da disposizioni relative alle attività di prova, quali: campionatura, uso di metodi statistici, sequenze di prova.

Per gli analiti di interesse in questo lavoro (IPA, PCB, PCDD/F in aria ambiente) si fa riferimento agli *EPA's Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air*.

Come verrà evidenziato nei paragrafi successivi i tempi di restituzione del dato sono lunghi, (sia per il campionamento che per le fasi analitiche) e in genere sono richiesti almeno quattro giorni lavorativi.

2.1.1 Campionamento

Il campionamento di questi analiti implica tecniche e strumentazione particolari e richiede pertanto personale specializzato sia nella gestione del campionamento sia nella fase di analisi. Di norma, in caso di incendio significativo (> 6 ore ⁽¹⁰⁾) e, comunque, in presenza di precursori, la strumentazione utilizzata per il campionamento di IPA, PCB, PCDD/F è un campionatore ad alto volume. Questi strumenti sono in grado di lavorare con flussi dell'ordine di almeno 200 litri/minuto (10 m³/h) o maggiori, di gran lunga superiori a quelli impiegati dai più tradizionali sistemi di prelievo utilizzati nelle Reti di Rilevamento della Qualità dell'Aria (RRQA). La scelta di questi sistemi di prelievo è dettata dall'esigenza di raccogliere quantità importanti di polveri aerodisperse, dell'ordine della decina di milligrammi di polvere, affinché, con le tecniche analitiche in uso, si riescano a raggiungere adeguati limiti di rilevabilità (dell'ordine dei fg/m³ per i vari congeneri dei

⁽¹⁰⁾ L'individuazione di tale durata minima di riferimento deriva principalmente dal fatto che solo incendi di lunga durata possono assicurare il campionamento di un quantitativo adeguato da sottoporre all'analisi. Durate inferiori dell'incendio non consentirebbero alcuna rilevazione utile.

PCDD/DF). Generalmente in una campagna di monitoraggio della qualità dell'aria i tempi di campionamento variano tra le 12 e le 24 h, per campionare rispettivamente dai 300 ai 600 Nm³ di aria.

Per tali campionatori possono essere utilizzate varie "teste di taglio" in grado di prelevare le PTS (Polveri Totali Sospese), il PM₁₀ o il PM_{2,5}. L'uso di teste PTS o PM₁₀ è funzionale all'obiettivo del campionamento e i flussi di campionamento devono essere in grado di garantire il taglio delle frazioni granulometriche e l'eventuale utilizzo di PUF o adsorbenti solidi a valle dei filtri. Per la raccolta degli IPA viene utilizzato solo il filtro a membrana, mentre per le diossine e i policlorobifenili è presente, in serie, anche una spugna cilindrica di poliuretano (PUF - poliurethane foam) capace di adsorbire le PCDD/DF che possono sfuggire al filtro, poiché non presenti in fase particolato;

2.1.2 Procedura analitica

In un incendio, sono moltissime le sostanze che possono essere prodotte. Particolarmente significativi, in caso di incendi risultano alcune molecole che appartengono alla classe delle diossine e dei furani (PCDD/DF), insieme alla classe degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e Policlorobifenili (PCB) (Tab. 19). Ciò non esclude ovviamente, in casi specifici, l'opportunità di monitoraggio anche di altre sostanze, quali polveri totali, frazione PM₁₀ e metalli nelle polveri.

Il campionamento viene effettuato mediante campionatore ad alto volume secondo la metodica EPA TO-9A [93], utilizzando filtri in fibra di quarzo ⁽¹¹⁾ (fig.10) e cilindri in schiuma poliuretana (PUF) (fig. 11) entrambi preliminarmente trattati con standard marcati al ¹³C₁₂ (standard di campionamento).

I metodi sono articolati in numerosi passaggi, il che comportano lunghi tempi di esecuzione. Il campione infatti, prima di essere sottoposto ad analisi strumentale, subisce più fasi che si differenziano per tipo di matrice e che possono essere riassunte in: pretrattamento del campione, estrazione (Fig.xx) e purificazione (fig. xx) [inserire foto].



FIGURA 10 – FILTRI IN FIBRA DI QUARZO DOPO CAMPIONAMENTO

⁽¹¹⁾ considerati gli elevati flussi e volumi di prelievo dei campionatori ad alto volume impiegati, si utilizzano filtri a matrice di fibre (in microfibre di vetro o in fibre di quarzo), poiché hanno adeguata capacità di carico e basso rischio di intasamento.



FIGURA 11 – CILINDRO DI SCHIUMA POLIURETANICA (PUF) UTILIZZATO PER IL CAMPIONAMENTO DELLA FRAZIONE COLATILE

Nel protocollo di analisi si quantificano contestualmente gli analiti in fase vapore, con quelli adsorbiti sul particolato depositato sul filtro, poiché alcuni dei composti volatizzano dal filtro e vengono raccolti dalla schiuma poliuretanic adsorbente (PUF). Ad esempio, durante il campionamento la maggior parte delle OCDD sono raccolte dal filtro mentre la maggior parte delle TCDD dal PUF. Diossine e furani delle altre famiglie sono distribuite tra la fase vapore e la fase adsorbita sul particolato dell'aria ambiente. Gli IPA si depositano solamente su filtro.

Filtro e PUF vengono, quindi, analizzati insieme fin dalla prima fase di estrazione e riuniti a formare un unico campione, il quale viene drogato con una quantità nota di standard interni di processo (miscela di PCDD/F, PCB e IPA marcati con $^{13}\text{C}_{12}$) per la determinazione dei recuperi (diluizione isotopica). I composti marcati hanno caratteristiche chimico-fisiche equivalenti agli analiti ricercati, quindi il metodo di diluizione isotopica consente:

- controllo delle fasi del metodo e della singola analisi attraverso i recuperi dei marcati;

- identificazione con m/z e rapporto isotopico in base alla corrispondenza del tempo di ritenzione;
- quantificazione mediante tecnica dello standard interno.



FIGURA 12 – ESTRATTORE AUTOMATICO RANDAL

Il campione viene sottoposto ad estrazione mediante estrattore automatico Randall ⁽¹²⁾ (fig. 12). La norma tecnica EPA prevede l'utilizzo del Soxhlet, tuttavia come specificato nella stessa (paragrafi § 1.5 e § 9.1.2), *ogni modifica al metodo è permessa al fine di ridurre le interferenze od abbassare i costi di analisi purché vengano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità richiesti*. Esistono pertanto sistemi alternativi al soxhlet (ASE-Accelerated Solvent Extractor, Randal, Sonicazione) che vengono normalmente impiegati nei laboratori perché permettono di ridurre notevolmente i tempi di estrazione (anche dell'ordine di decine di

⁽¹²⁾ Nel sistema Randall la prima parte dell'estrazione viene eseguita mediante immersione del campione in solvente bollente a cui segue un risciacquo continuo con solvente freddo a ricadere. La rapida solubilizzazione operata dal solvente caldo permette di ridurre notevolmente i tempi di estrazione (circa 3h).

ore). Condizione necessaria affinché questo avvenga è che i laboratori ne dimostrino l'equivalenza e quindi il rispetto dei requisiti indicati dalla norma di riferimento. Al termine della fase di estrazione, dopo aver portato l'estratto a piccolo volume si può procedere con la purificazione dello stesso. Questa fase viene condotta manualmente attraverso delle colonne specifiche per l'analita di interesse.

Nel caso di PCDD/F dopo aver effettuato una prima purificazione con una colonna multistrato e una seconda con una colonna di allumina basica, l'estratto purificato così ottenuto viene concentrato fino a secchezza e ripreso con gli *Standard marcati di siringa* (di PCDD/F e PCB) e portato a volume di 200 µL per le analisi strumentali.

Per la determinazione degli IPA, viene utilizzata una colonna di silice per la purificazione. Anche in questo caso l'estratto ottenuto viene concentrato fino a piccolo volume (circa 500 µL), ripreso con gli appositi *Standard marcati di siringa* e portato a volume di 1 mL per la determinazione strumentale

Dopo estrazione e purificazione i campioni sono vengono analizzati mediante:

- ✓ Spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) secondo il metodo EPA TO – 9A [93] per la ricerca di PCDD/F,
- ✓ Spettrometria di massa triplo quadrupolo secondo il metodo EPA TO – 4A [94] per la ricerca dei PCB.
- ✓ Spettrometria di massa singolo quadrupolo secondo il metodo EPA TO-13A [95] per la ricerca degli IPA.

Tutte le analisi, nel territorio della regione Lazio, vengono effettuate presso il Dipartimento Prevenzione e Laboratorio Integrato, Unità chimica area Nord sede di Rieti.

IPA	Diossine e furani	PCB non DL	PCB - DL
Naftalene	2,3,7,8 - TCDD	PCB-28	PCB-81
Acenaftilene	1,2,3,7,8 - PeCDD	PCB-52	PCB-77
Acenaftene	1,2,3,4,7,8 - HxCDD	PCB-95	PCB-123
Fluorene	1,2,3,6,7,8 - HxCDD	PCB-101	PCB-118
Fenantrene	1,2,3,7,8,9 - HxCDD	PCB-99	PCB-114
Antracene	1,2,3,4,6,7,8 - HpCDD	PCB-110	PCB-105
Fluorantene	OCDD	PCB-151	PCB-126
Pyrene	2,3,7,8 - TCDF	PCB-149	PCB-167
Benzo[a]antracene	1,2,3,7,8 - PeCDF	PCB-146	PCB-169
Crysene	2,3,4,7,8 - PeCDD	PCB-153	PCB-189
Benzo[b]fluorantene	1,2,3,4,7,8 - HxCDF	PCB-138	
Benzo[k]fluorantene	1,2,3,6,7,8 - HxCDF	PCB-187	
Benzo[j]fluorantene	2,3,4,6,7,8 - HxCDF	PCB-183	
Benzo[a]pirene	1,2,3,7,8,9 - HxCDF	PCB-177	
indeno	1,2,3,4,6,7,8 - HpCDF	PCB-180	
Dibenzo[a,h]antracene	1,2,3,7,8,9 - HpCDF	PCB-170	
Benzo[g,h,i]perylene	OCDF		
<i>IPA totali</i>	<i>PCDD/F totali</i>	<i>PCB totali</i>	

TABELLA 19 – ELENCO ANALITI DETRMINATI NEI CAMPIONI DI IMMISSIONI (INCENDI)

2.2 La spettroscopia nel vicino infrarosso

La spettroscopia NIR è ormai riconosciuta come una delle tecniche più versatili ed efficaci nell'ambito dell'analisi rapida e non distruttiva. Trova applicazione nei settori più disparati grazie anche al recente sviluppo di strumentazioni compatte e portatili che consentono analisi in campo. Negli anni è diventata la tecnica di riferimento in molti ambiti per il controllo di qualità ed il monitoraggio di processo. Tra i principali settori di interesse c'è quello Biomedico, agroalimentare, farmaceutico e industriale [96]. Recenti

pubblicazioni ne mostrano l'applicabilità anche nel settore ambientale per la ricerca di contaminanti chimici e biologici.

Aodhagan O' Reilly et al., hanno utilizzato un approccio NIR per prevedere le concentrazioni di nutrienti (azoto totale, fosforo totale) e microrganismi indicatori (*Escherichia coli*) nelle acque superficiali [97]. Sempre in soluzioni acquose, in un'altra pubblicazione, gli autori hanno utilizzato uno spettrofotometro NIR per la rilevazione e quantificazione dei pesticidi (Atrazina e Alachlor) [98].

Uno studio sullo sviluppo di un metodo di spettroscopia NIR, per la determinazione dell'umidità e del contenuto di materia organica in campioni di fanghi, è stato condotto per eseguire la caratterizzazione di campioni di origini diverse (fanghi provenienti da impianto di trattamento dei rifiuti municipali e dalle industrie alimentari, cellulosiche, tessili e del sughero) e del processo di essiccazione dei fanghi [99].

Italiane sono invece le pubblicazioni relative alla ricerca di alcuni contaminanti nei suoli della provincia di Taranto. Gli autori propongono la spettroscopia NIR come un valido e veloce metodo alternativo alle analisi convenzionali che sono onerose sul piano economico e temporale e per questo poco idonee per indagini su vaste aree di territorio. In particolare, le ricerche hanno interessato metalli pesanti, diciotto congeneri di PCB (dodici PCB diossina-simili e sei PCB "indicatori" non diossina-simili), la loro somma (PCB18) e il contenuto di alogeni organici estraibili (EOX) [100] [101].

Il NIR presenta evidenti potenzialità, con risultati (in alcuni ambiti) in pieno accordo con le più consolidate/classiche tecniche cromatografiche. Nonostante questo, ci sono palesi

riluttanze all'applicazione di questo approccio in alcuni settori. In particolar modo per le stringenti richieste regolamentari relative alla certificazione del dato analitico e la tardiva inclusione del NIR tra le metodiche certificabili. Altro fattore non trascurabile è che l'applicazione della spettroscopia NIR nei vari ambiti implica l'utilizzo di una analisi multivariata dei dati per poter estrapolare le informazioni di interesse e ad oggi, purtroppo, la chemiometria è ancora raramente presente nel bagaglio culturale dei manager che prendono le decisioni finali ed in molti tecnici che operano le analisi

3. Materiali e Metodi

La spettroscopia NIR rappresenta una delle tecniche spettroscopiche di diagnostica non invasiva ad oggi maggiormente impiegata per indagare le proprietà fisico-chimiche dei campioni in modo non distruttivo. E' una tecnica rapida, precisa e conveniente rispetto ad altre tecniche di laboratorio [102], soprattutto perché non produce rifiuti, favorendo una maggiore sostenibilità ambientale. E', inoltre, una tecnica multi-analitica, vale a dire che in molti casi è possibile determinare più di un parametro con una singola misurazione.

Per estrarre informazioni utili dai profili spettrali NIR, acquisiti se si tratta di matrici complesse, è quasi imprescindibile l'uso di metodi chemiometrici (analisi multivariata dei segnali).

I primi strumenti NIR erano estremamente sofisticati e costosi destinati, quindi, al solo uso di laboratorio. Nel tempo gli strumenti si sono evoluti, con una significativa riduzione delle dimensioni e del peso, consentendo lo sviluppo di strumenti portatili con migliori prestazioni (es. aumento della velocità di acquisizione degli spettri; miglioramento dell'elaborazione e trasmissione del segnale; miglioramenti di hardware e del software).

La disponibilità di strumenti portatili e l'uso sinergico della spettroscopia NIR e della Chemiometria ha ampliato i campi di applicazione e consentito lo sviluppo di numerosi metodi di indagine nei più svariati settori. Tra i principali ambiti di applicazione della spettroscopia NIR ci sono i settori agro-alimentare, farmaceutico, medico, chimico e petrolchimico, strumentale e analitico.

3.1 Campioni

Per lo scopo del lavoro di ricerca si è cercato di ricreare in laboratorio i campionamenti eseguiti da Arpa durante le campagne di monitoraggio, prendendo in considerazione IPA, PCB e PCDD/F come analiti.

Le prove sono state eseguite su un filtro in fibra di vetro fortificato con quantità crescenti degli analiti di interesse e montato su una pompa aspirante della portata di circa 3.5 L/min per un tempo pari a 15 min per ciascun campione. Per la calibrazione della risposta strumentale sono state utilizzate soluzioni standard di PCB, IPA e PCDD/F.

Le prove di ottimizzazione del processo analitico hanno riguardato in un primo momento la scelta del solvente e di conseguenza il tempo e il luogo di stoccaggio dei filtri. Inizialmente è stato impiegato il n-esano (grado di purezza) per la preparazione delle soluzioni a titolo noto di analita, successivamente sostituito dall'acetone, molto più volatile. Le diverse prove eseguite hanno mostrato l'equivalenza di uso dei due solventi per lo scopo del lavoro, fatta eccezione per i tempi di stoccaggio dei filtri, molto più brevi nel caso dell'utilizzo dell'acetone. Al fine di valutare l'effetto matrice del filtro sono state eseguite oltre alle prove su bianco filtro e bianco campionato, anche delle prove in parallelo caricando le singole quantità di analita sia su filtri differenti sia su uno stesso filtro attraverso aggiunte successive. Sono stati acquisiti quindi gli spettri (in un range di lunghezze d'onda compreso tra i 908 nm e 1676 nm) rispettivamente:

- ✓ del bianco, ovvero di un filtro prima del campionamento;

- ✓ del bianco campionato, ovvero di un filtro dopo il campionamento di aria nelle condizioni descritte;
- ✓ degli standard certificati di PCB, IPA e PCDD/F;
- ✓ filtri fortificati con analita

Per ogni tipologia di filtro e livello di concentrazione sono stati acquisiti 9 spettri.

Al fine di massimizzare l'informazione contenuta nei dati e allo stesso tempo diminuire il numero delle variabili sul data set ottenuto dall'acquisizione spettrale è stata eseguita un'analisi chemiometrica mediante il programma The Unscrambler X 10.4.

3.2 Spettroscopia NIR

La spettroscopia nel vicino infrarosso appartiene al gruppo delle tecniche di spettroscopia vibrazionale che si basa sull'interazione tra la luce e la materia. Interessa la regione dello spettro elettromagnetico compresa tra 780 a 2500 nm (12820–3959 cm⁻¹).

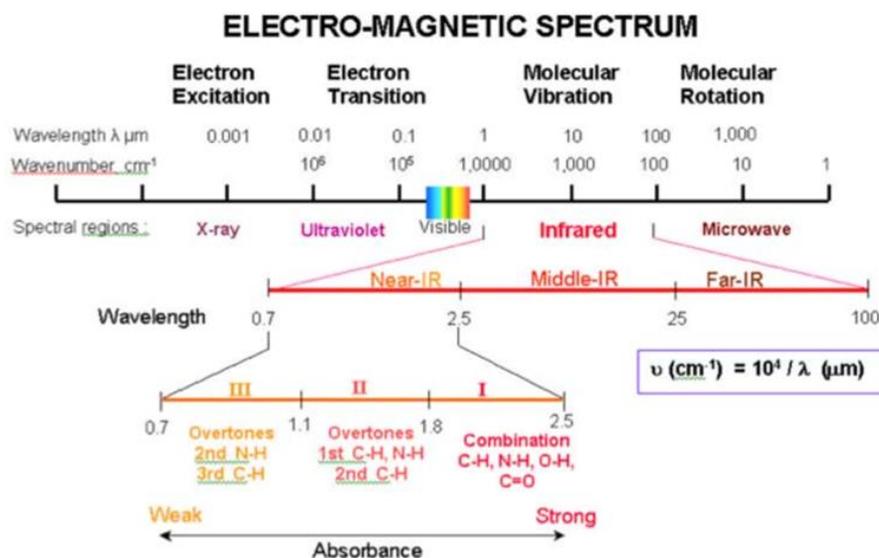


FIGURA 13 –REGIONI DELLO SPETTRO ELETTROMAGNETICO

La spettroscopia studia l'assorbimento di energia radiativa da parte delle molecole che raggiungono uno stato eccitato. In particolare l'IR è associata ad una eccitazione vibro-rotazionale delle molecole. I due principali moti vibrazionali sono lo stretching e il bending. Lo stretching è la variazione della lunghezza dei legami tra gli atomi mentre il bending è la variazione dell'angolo di legame tra gli atomi.

L'assorbimento di energia molecolare è quantizzato perciò ci si aspetterebbe uno spettro con delle righe, tuttavia la radiazione infrarossa eccita sia livelli vibrazionali che rotazionali (a più bassa energia) perciò lo spettro presenta delle bande.

Le bande di assorbimento più significative sono attribuite agli *overtoni* e alle combinazioni di vibrazioni fondamentali relative ai gruppi funzionali -CH, -NH, -OH (e -SH). Se nella regione dell'IR valeva la regola di selezione

$$\Delta v = \pm 1$$

dove v rappresenta i livelli energetici dell'oscillatore armonico, nella regione del NIR, poiché si usano delle radiazioni incidenti più intense, la regola di selezione valida nell'IR non viene rispettata e ciò porta alla possibilità di avere degli *overtones*.

Le bande di assorbimento NIR tipicamente sono molto ampie e sovrapposte e sono 10-100 volte più deboli delle loro corrispondenti bande di assorbimento nel medioIR. Queste caratteristiche restringono fortemente la sensibilità nel senso della spettroscopia classica è per questo motivo che si ricorre all'uso di tecniche di elaborazione multivariata per processare i dati relativi alle informazioni spettrali delle proprietà dei campioni. Il basso coefficiente di assorbimento, tuttavia, permette una penetrazione più alta e profonda e un

aggiustamento dello spessore del campione. Questo aspetto attualmente è un vantaggio analitico, poiché permette un'analisi diretta di campioni fortemente assorbenti e con elevato effetto di scattering, come i liquidi torbidi o i solidi senza ulteriori trattamenti. Si possono effettuare misure sia in *trasmittanza* che in *riflettanza*, la scelta dell'una piuttosto che l'altra dipende dalla tipologia di campione da analizzare e dallo scopo dell'analisi.

3.2.1 MicroNIR

Uno spettrofotometro NIR è generalmente composto di una sorgente di luce, un monocromatore, un campionatore o una interfaccia per la presentazione del campione e un detector per la misura in riflettanza e trasmittanza il tutto gestito da un PC (Fig. 1478pooi). La sorgente di luce è in genere una lampada alogena al tungsteno. I detector possono essere al silicio, al solfito di piombo (PbS) e all'arsenurio di indio e gallio (InGaAs). I primi sono veloci, poco rumorosi, piccoli e altamente sensibili dalla regione visibile a 1100nm. I detector a PbS sono più lenti ma molto diffusi poiché sono sensibili da 1100 a 2500nm e hanno un buon rapporto segnale rumore. Il più costoso è InGaAs che unisce la velocità e le caratteristiche dei detector al silicio con l'intervallo di lunghezza d'onda del detector a PbS. Esistono, comunque, varie configurazioni ottiche che possono essere usate per separare la regione spettrale policromatica NIR in frequenze "monocromatiche".

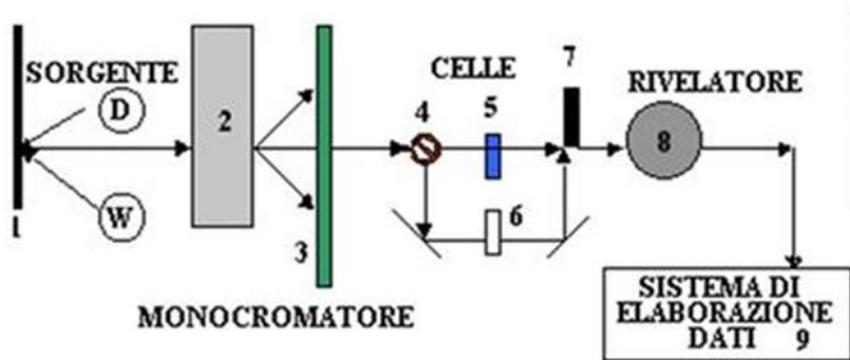


FIGURA 14 – SCHEMA A BLOCCHI DI UNO SPETTROFOTOMETRO NIR

Lo strumento utilizzato per questo lavoro è un MicroNIR Pro 1700 ES (gestito da software “The MicroNIR Pro ES 1700”), ovvero una versione portatile di un NIR da banco. Lo strumento lavora in un range di lunghezze d’onda compreso tra i 908 nm e i 1676 nm ed utilizza come sorgente una lampada a tungsteno. A differenza del NIR da banco, non vi è la presenza del chopper e della sfera integratrice e ha dimensioni e peso ridotti (circa 60 g). La compattezza dello strumento si sviluppa attorno alla tecnologia brevettata LVF (Linear Variable Filter) ovvero un filtro passa banda monodimensionale a variazione continua. I materiali del rivestimento sono film sottili multistrato, di tipo inorganico SiO₂, e Ta₂O₅ "depositati a cuneo" in un singolo asse. Il processo fisico di deposizione del materiale inorganico è del tipo "ion-assisted physical vapor". Il risultato di questa particolare lavorazione produce un componente estremamente affidabile, robusta e stabile che riduce ai minimi termini l'ingombro del componente. Il dispositivo LVF, inoltre, separa la radiazione incidente senza la necessità di utilizzare componenti ottici o meccanici in movimento rendendo il MicroNIR un dispositivo completamente passivo e immune da disallineamenti ottici o meccanici.



FIGURA 15 - MICRONIR

Il MicroNIR può lavorare secondo due diverse configurazioni:

- ✓ *Modalità di riflessione diffusa:* due lampade a tungsteno illuminano un punto del campione, le radiazioni riflesse sono raccolte e convogliate nello strumento per poi essere rilevate e viste al computer;
- ✓ *Modalità di trasmissione:* una sorgente esterna illumina una cuvetta mediante luce collimata e per misurarne la trasmissione si usa lo strumento a luci spente.

Per questo lavoro è stata utilizzata la prima configurazione acquisendo in riflettanza e convertendo istantaneamente il valore in assorbanza.

3.3 Analisi statistica multivariata

Prima che uno spettrofotometro NIR possa fare una analisi quantitativa è necessario sviluppare una calibrazione specifica per la matrice da analizzare usando metodi multivariati. Il processo di calibrazione principalmente prevede i seguenti passaggi:

- 1) Selezione di un numero di campioni rappresentativo,
- 2) Acquisizione degli spettri e determinazione dei valori di riferimento;

- 3) Modello multivariato relativo alle “variazioni spettrali” dei valori di riferimento delle proprietà analitiche del parametro di interesse;
- 4) Validazione del modello mediante “cross validation”, o validazione esterna.

3.3.1 PCA

Nell’analisi multivariata, uno dei metodi principali è l’Analisi delle Componenti Principali o PCA (Principal Component Analysis). Si tratta di una tecnica statistica che ha l’obiettivo di massimizzare la varianza, calcolando il peso da attribuire ad ogni variabile di partenza per poterle concentrare in una o più nuove variabili (dette Componenti Principali) che saranno una combinazione lineare delle variabili di partenza.

La tecnica della PCA consiste di fatto nella trasformazione lineare della matrice X di dati in un sub-set che rappresenta l’intera informazione di X. Ciò è reso possibile dal fatto che i dati sono “centrati” rispetto alla media (normalizzati) e che quindi tutta l’informazione è trasferita nella matrice di covarianza

L’analisi delle componenti principali consente in modo relativamente semplice di:

- ✓ Valutare la correlazione tra le variabili e la loro rilevanza;
- ✓ Visualizzare gli “oggetti” in esame;
- ✓ Sintetizzare la descrizione dei dati;
- ✓ Ridurre le dimensioni dei dati;
- ✓ Investigare sulle principali proprietà.

La PCA non solo permette di ridurre il numero delle variabili perdendo la minor quantità possibile, ma al tempo stesso fornisce una soluzione algebrica che consente anche rappresentazioni grafiche molto efficaci. La possibilità di vedere graficamente i dati consente di riassumere le caratteristiche principali dei dati stessi in una forma facile da comprendere.

I Dati ricavati vengono organizzati sotto forma di una matrice dei dati con cui si mettono in relazione i diversi campioni con le proprietà considerate ottenendo, alla fine, un insieme 2D ordinato di dati. In pratica, si ha un'operazione di rotazione dei dati originali, in modo che la prima PC sia la direzione lungo cui è *massima la dispersione* dei dati perché quanto più si vedono i dati separati tra loro, tanto più è possibile cogliere anche minime differenze tra i campioni. Considerando una seconda PC, ortogonale alla prima, questa è diretta lungo la direzione in cui è *massima la variabilità residua* ossia quella non spiegata lungo la prima direzione; questo vale per tutte le componenti successive che andranno a fornire una percentuale di informazioni sempre più esigua. Le PC vengono estratte dai dati in maniera sequenziale affinché spieghino una percentuale che è sempre la massima possibile però decrescente rispetto alla prima PC, la quale rappresenta la direzione nello spazio dove sia massima la varianza dei dati stessi.

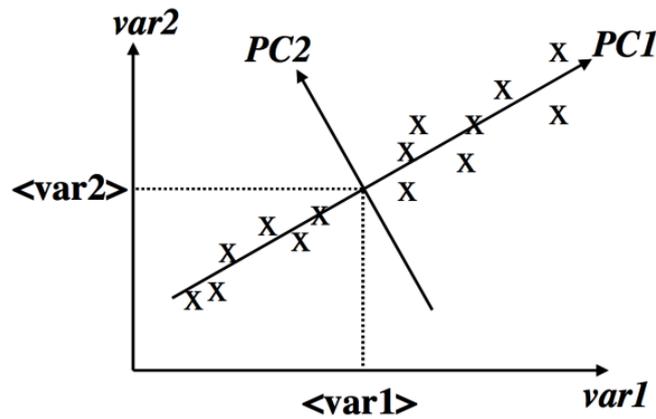


FIGURA 16 – ESEMPIO DI PCA

Dunque si ottiene una rappresentazione della matrice in un nuovo spazio ortogonale come

$$T=XL$$

dove:

X= matrice dei dati originali;

L= matrice che consente la rotazione;

T= matrice degli scores (coordinate dei campioni sulla PC).

Un'altra operazione importante, successiva al calcolo delle componenti principali,

è rappresentare la matrice dei dati ottenuta dal prodotto di due matrici

$$X=TL^T$$

dove:

T= matrice degli scores ¹³;

L= matrice dei loadings¹⁴ (direzioni lungo cui si proiettano i campioni).

La realizzazione di un *scores plot* consente una rappresentazione grafica molto attendibile degli oggetti e ciò permette di valutare il comportamento di questi rispetto alle diverse componenti principali e alla loro similarità. E' possibile notare dei clusters (raggruppamenti di oggetti simili) oppure *outliers* (oggetti differenti). Viceversa, il grafico costruito con i loadings permette di valutare graficamente le sole variabili, fornendo una valutazione della significatività che quest'ultime possiedono.

Una combinazione delle due tipologie di grafico (*biplot*) è possibile ed ha lo scopo di fornire in una unica rappresentazione grafica, simultaneamente tutte le informazioni fornite con i singoli grafici

3.3.2 Regressione multivariata mediante Partial Least Square

La Partial Least Squares (PLS) [103] rappresenta una delle tecniche statistiche più affidabili, utilizzate per cercare le correlazioni tra i segnali di uscita di uno strumento (nel caso specifico gli spettri IR) e le informazioni contenute nelle N misure stesse. Nel presente lavoro è stato utilizzato anche in senso predittivo per stime quantitative dei valori chimici di riferimento

¹³ Lo score è la coordinata del vettore di misura nello spazio delle componenti principali

¹⁴ Il loading concerne la singola variabile x e indica quanto questa contribuisce alla varianza delle PC

Il modello opera attraverso apposito che va a ricercare la massima correlazione possibile tra le variabili e le risposte applicando in modo iterativo coppie di fattori latenti sia sulla matrice delle variabili indipendenti X che sulla matrice delle risposte Y . Pertanto, se con la PCA si lavorava in termini di massima varianza, nel PLS si lavora in termini di massima covarianza.

Il PLS si basa sul metodo dei minimi quadrati, ideale nel caso in cui si voglia eseguire una regressione multipla partendo da una matrice incompleta, dove potrebbero essere non noti i valori che assumono dei campioni rispetto a delle specifiche risposte.

Considerando p variabili indipendenti x_1, x_2, \dots, x_p si va a valutare come quest'ultime influenzano statisticamente una variabile y , la quale è rappresentata da una funzione pari

$$y = f(x) + e$$

dove $f(x)$ rappresenta una funzione lineare che offre una stima delle variabili y dipendenti rispetto alle variabili x . L'algoritmo dietro al modello PLS è un ciclo iterativo che porta alla ricostruzione della matrice X in modo che questa sia capace a spiegare il vettore y .

Questo algoritmo porta ad avere il minimo numero necessario di variabili mostrando una componente alla volta poiché la covarianza della coppia di componenti successive è minore della covarianza massima nell'interazione successiva. Il processo prosegue fino a che non si hanno più coppie di componenti X e Y vicine tra loro oppure fin quando non si ottengono più informazioni da X usate per predire Y cioè non esistono più componenti significative.

Il modello è stato validato mediante il metodo di Cross Validation. Nello specifico, è stata utilizzata la tecnica del “leave one out” dove, dati n oggetti, si calcolano n modelli ottenuti andando ad escludere un oggetto alla volta. Così facendo ogni modello è costruito su $n-1$ oggetti ed applicato sull’oggetto escluso dal modello. Dato un generico dataset, lo si divide in n parti e si prende a turno una parte come *test set esterno (evaluation set)* e le rimanenti $n-1$ parti come *training set*. Con il training set si costruisce un modello matematico che viene poi applicato al test set.

usando il 75% dei campioni come training set e il restante 25% come evaluation set, così facendo ogni gruppo di campioni ha svolto sia il ruolo di calibrazione che di verifica del modello.

I parametri di un modello PLS che ne descrivono la bontà sono:

- ✓ *Numero di fattori considerati*: il numero di variabili combinate in modo controllato ed usate per avere determinate risposte dal modello;
- ✓ *Root Mean Square Error (RMSE)*: è l’errore di calibrazione andando a misurare la differenza tra la risposta ottenuta dal modello e la risposta sperimentale usata per creare il modello stesso. Viene calcolato sia in fase di calibrazione (RMSEC) che in fase di validazione (RMSECV). Quest’ultimo permette di valutare l’errore sul cross test per mezzo di una convalida incrociata per la scissione dei dati, ossia va a valutare le prestazioni in caso di campioni incogniti;

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{calc} - y_{obs})^2}{n}}$$

✓ *RSQUARE*: è la dispersione dei dati valutabile mediante la pendenza della retta.

La regressione PLS quindi non massimizza l'informazione delle variabili esplicative tanto bene come la PCA, ma svolge un ruolo migliore nello spiegare la risposta.

3.3.3 Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA)

Spesso si ha la necessità di sviluppare un modello PLS che sulla base delle informazioni multicanale (spettro) possa attribuire il campione di misura ad :

- 1) una ed una sola delle classi predeterminate (classificazione);
- 2) una delle classi predeterminate o a nessuna di esse (modellamento). In questo caso se il campione non è attribuito alla classe si indica come outlier.

In questi casi viene utilizzato Partial least Square Discriminate Analysis o PLS-DA come modello di analisi multivariata.

L'algoritmo PLS-DA permette di esaminare qualitativamente i campioni in esame stabilendo per ognuno di essi l'appartenenza a una determinata classe. La PLS-DA non è altro che un'analisi di regressione PLS in cui la variabile risposta è categorica in quanto non ammette variabili risposta differenti dalle classi di appartenenza coinvolte che in questo caso specifico sono due: i bianchi e bianchi fortificati con analita.

Nel PLS-DA viene introdotta, dunque, una matrice dummy Y , che rappresenta un vettore risposta, e viene espressa in funzione di una matrice indipendente X secondo la relazione

$$Y=f(X)$$

Questa matrice è costituita da un numero di colonne pari al numero di classi considerate e un numero di righe pari al numero di campioni in esame. Il compito di tale matrice è di codificare l'appartenenza o meno dei campioni in esame a una data classe mediante un codice binario. Considerando un generico dataset costituito da tre campioni appartenenti a tre classi differenti, la matrice è data dai vettori dummies

$$Y_1= [1,0,0]$$

$$Y_2= [0,1,0]$$

$$Y_3= [0,0,1]$$

Dove 1 rappresenta l'appartenenza a una determinata classe mentre 0 la non appartenenza a quella classe.

Il modello di classificazione viene realizzato in base alla regola di classificazione probabilistica di Bayes: tra tutte le possibili superfici di separazione viene individuata la superficie che porti ad assegnare, di volta in volta, il campione alla classe di appartenenza commettendo il minimo errore di classificazione.

L'efficienza del modello di classificazione realizzato è valutata considerando diversi parametri:

- ✓ *Sensibilità*: permette di valutare il numero di campioni correttamente predetti dal modello, infatti, è pari al rapporto tra il numero di campioni assegnati ad una classe e il numero totale di campioni appartenenti alla classe;
- ✓ *Specificità*: valuta il numero di campioni di altre classi correttamente classificati come non appartenenti a quella data classe dal modello. E' sempre data dal rapporto tra il numero di campioni assegnati ad una classe e il numero totale di campioni appartenenti alla classe;
- ✓ Root Mean Square Error (RMSE) che rappresenta l'errore di classificazione del modello.

Così come nel PLS, anche nella PLS-DA, il modello include una fase di calibrazione (training) ed una di test di validazione, e per entrambe le fasi, può essere determinata la percentuale di corretta classificazione calcolando gli errori residui.

3.4 Protocollo analitico (metodo di NIR-metodo PLS-DA,PLS)

Gli spettri acquisiti con MicroNIR sono stati processati con il programma Unscrambler X eseguendo prima un'analisi dei dati mediante PCA per identificare delle eventuali correlazioni tra gli spettri dei filtri campionati.

L'analisi esplorativa, dopo opportuno pretrattamento dei dati, ha permesso di ottenere gli scores plots ovvero dei grafici in grado di mostrare la presenza o meno di clusters. Ogni punto nello scores plot rappresenta lo spettro di un campione ottenuto con il MicroNIR

mentre gli assi sono le componenti principali ottimali che consentono di differenziare i campioni.

Come accennato nei paragrafi precedenti, per poter determinare i membri appartenenti ad una specifica classe occorre introdurre una matrice dummy: tale matrice permette di codificare l'appartenenza o meno dei campioni a una determinata classe usando un codice binario. In questo caso, al fine di mettere a punto il modello di classificazione viene utilizzato un algoritmo PLS-DA attraverso il quale i campioni vengono processati come 0 oppure 1 per codificare l'appartenenza alla classe dei bianchi o alla classe di *Analiti* (PCB, IPA o PCDD/F).

Gli stessi campioni, oltre ad essere analizzati mediante PLS-DA, sono stati processati mediante l'algoritmo PLS al fine di poter quantificare i diversi livelli di concentrazione considerati.

Analogamente ai plot ottenuti con la PCA, gli scores plot ottenuti mediante l'algoritmo PLS mostrano dei punti che rappresentano gli spettri acquisiti mediante MicroNIR per ogni campione mentre gli assi sono i fattori predittivi, che spiegano la varianza di X e la covarianza tra le matrici X e Y. Con il metodo PLS è stata ottenuta così una retta relativa alle y predette ossia relative alla quantità di *Analita* calcolate dall'algoritmo rispetto alle x osservate, vale a dire le quantità caricate su filtro per ogni range considerato.

4. Risultati e discussioni

Il metodo sperimentale si basa sull'acquisizione dello spettro del bianco e successivamente del bianco fortificato con concentrazioni note di *Analita* mediante MicroNIR. Dal confronto degli spettri registrati, è possibile individuare similarità e differenze tra i campioni in esame. Il bianco è stato ottenuto ponendo un filtro in fibra di vetro sotto aspirazione per un tempo pari a 15 minuti in un ambiente non controllato in modo da simulare l'aria ambiente.

Inizialmente è stato acquisito lo spettro del filtro non campionato (*bianco filtro*) (Fig.18) e del bianco (*bianco campione*), ovvero un filtro campionato nelle modalità precedentemente indicate, per osservare quale fosse il profilo spettrale della matrice (Fig. 17). Gli spettri così registrati sono stati confrontati con lo spettro dello standard certificato dell'*analita* di interesse per constatare quale fosse il profilo dello standard e quali fossero le bande caratteristiche per identificare qualitativamente la classe in esame in un range di lunghezze d'onda compreso tra i 908 nm e 1676 nm.

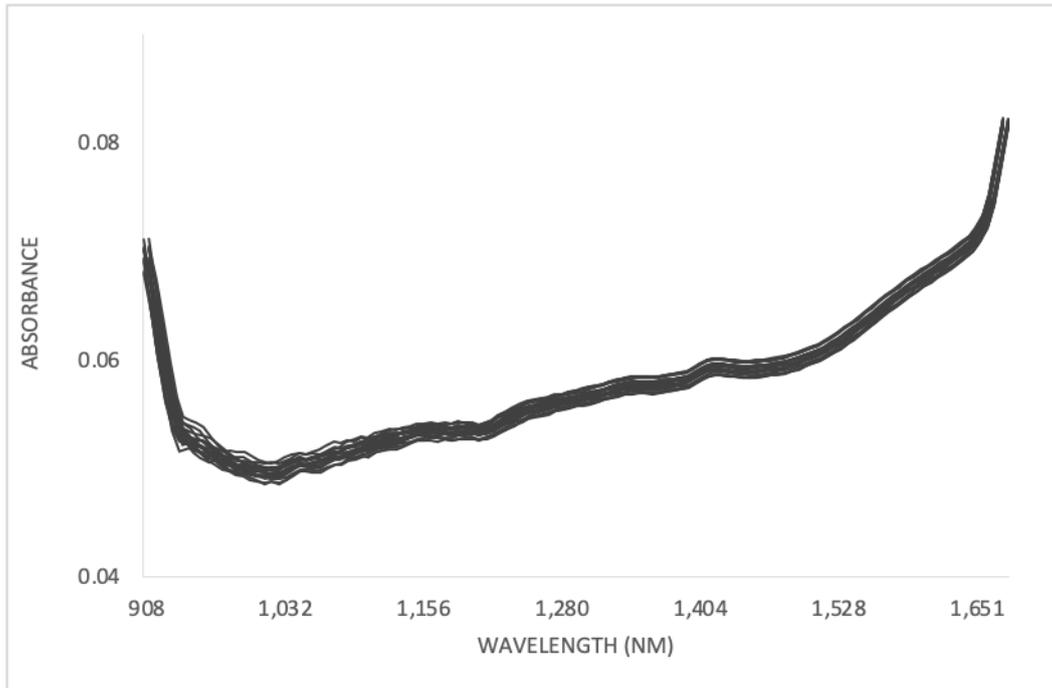


FIGURA 17 – SPETTRO BIANCO CAMPIONE

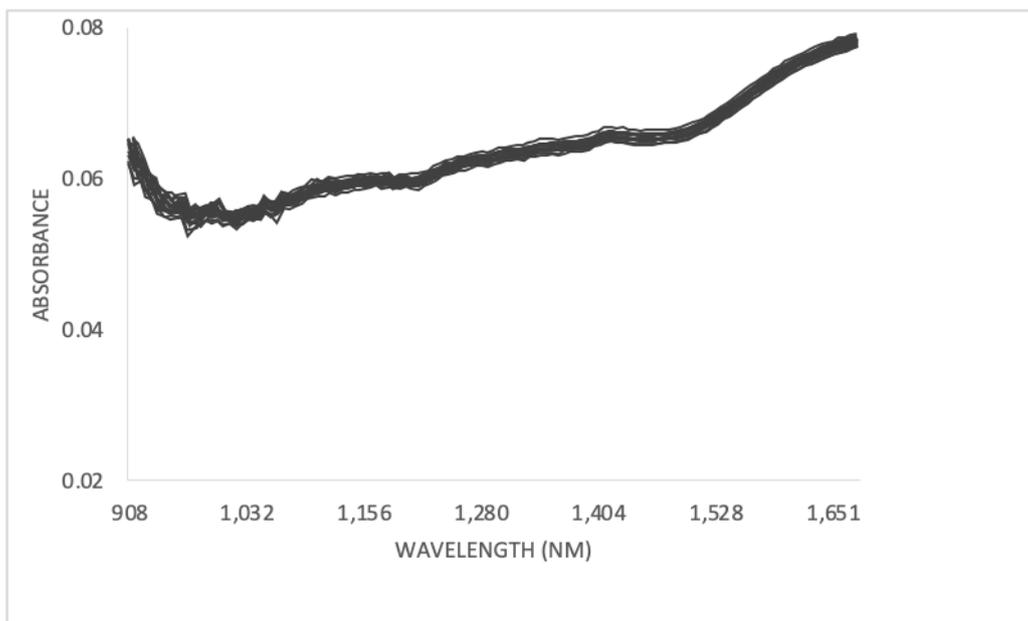


FIGURA 18- SPETTRO BIANCO FILTRO (FILTRO NON CAMPIONATO)

Per l'ottimizzazione della procedura di deposizione della soluzione di *Analita* è stata individuata la quantità di 40 μ l come volume sufficiente a garantire un'omogenea

distribuzione sul filtro. In aggiunta, è stato considerato l'effetto della matrice filtro andando a deporre le diverse quantità di *Analita* sui diversi filtri e su un unico filtro, andando ad eseguire una fortificazione in matrice. Tale procedura si è resa necessaria al fine di investigare l'indipendenza statistica della risposta strumentale in funzione del filtro ed al contempo, ha permesso di sviluppare e convalidare la possibilità di ottimizzare un metodo analitico attraverso la fortificazione in matrice sullo stesso filtro, indipendentemente dalla matrice e quindi dal particolare tipo di ambiente che costituisce la matrice a seguito di roghi, incendi ed altri fenomeni a rilascio di contaminanti.

La scelta del solvente è stata fatta sulla base di diverse considerazioni: la capacità di solubilizzare gli analiti e la velocità di evaporazione. In un primo momento è stato utilizzato *n-esano*, poi sostituito con *acetone* dopo averne verificato l'equivalenza. L'utilizzo di acetone ha consentito di ridurre i tempi di stoccaggio dei filtri prima dell'acquisizione degli spettri da 2 ore a 30 minuti. La matrice (filtro + analiti aggiunti) deve essere asciutta prima di poter procedere all'analisi strumentale.

Per simulare il processo di campionamento sono stati montati i filtri su una pompa aspirante con un flusso di 3,5 L/min per un tempo pari a 15 minuti.

Sono stati quindi acquisiti gli spettri:

- Bianco filtro (non montato sulla pompa aspirante)
- Bianco campione
- Filtri fortificati a concentrazioni diverse di analita

Il data set è stato completato con gli spettri delle soluzioni standard certificate degli analiti di interesse, dalle quale sono state fatte le diluizioni per la fortificazione dei filtri.

Questo step ha consentito di individuare le regioni spettrale più significative per le diverse classi di analiti, per la caratterizzazione e la differenziazione dei campioni, al fine di incrementare la sensibilità del metodo.

Per ogni campione sono stati acquisiti un minimo di 9 spettri.

Per la costruzione della retta di calibrazione in matrice sono state utilizzate concentrazioni differenti per IPA, PCB e PCDD/F, andando a testare per ciascuna classe diversi intervalli di concentrazione. In particolare sono stati investigati dei range di concentrazione estesi e successivamente per ciascuna classe, dei range di concentrazione più ristretti al fine di migliorare le capacità predittive dei modelli. Anche in questo caso, per ogni aggiunta di analita su filtro sono stati acquisiti almeno 9 spettri mediante microNIR.

Nello specifico,

- ✓ per i PCB è stato considerato il range 0,1 -10 pg e sono stati utilizzati due range di concentrazione ristretti:

Range 1 → 1 – 5 - 10 pg PCB

Range 2 → 0,1 – 0,5 – 1,0 pg PCB

- ✓ per gli IPA è stato considerato il range da 0,05 a 1,0 µg e sono stati utilizzati tre range di concentrazione ristretti:

Range → 0,1 – 0,5 – 0,1 µg IPA

Range → 0,001-0,05 – 0,1 µg IPA

Range → 0,0001 – 0,0005 - 0,001 µg IPA

- ✓ per le PCDD/F è stato utilizzato un unico range di concentrazione:

Range → 0,5 – 1 – 5 - 10 pg PCDD/F

4.1 Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento PCB nell'aria ambiente

4.1.1 Ottimizzazione analisi MicroNIR

Le prove sono state eseguite su un filtro in fibra di vetro fortificato con quantità crescenti di PCB e montato su una pompa aspirante della portata di circa 3.5 L/min per un tempo pari a 15 min per ciascun campione.

Le diluizioni sono state fatte a partire da uno standard 100 mg/L della *o2si Smart Solution* contenente 28 PCB di cui 12 PDB-DL. Lo spettro di questa soluzione sono mostrati in figura 19.

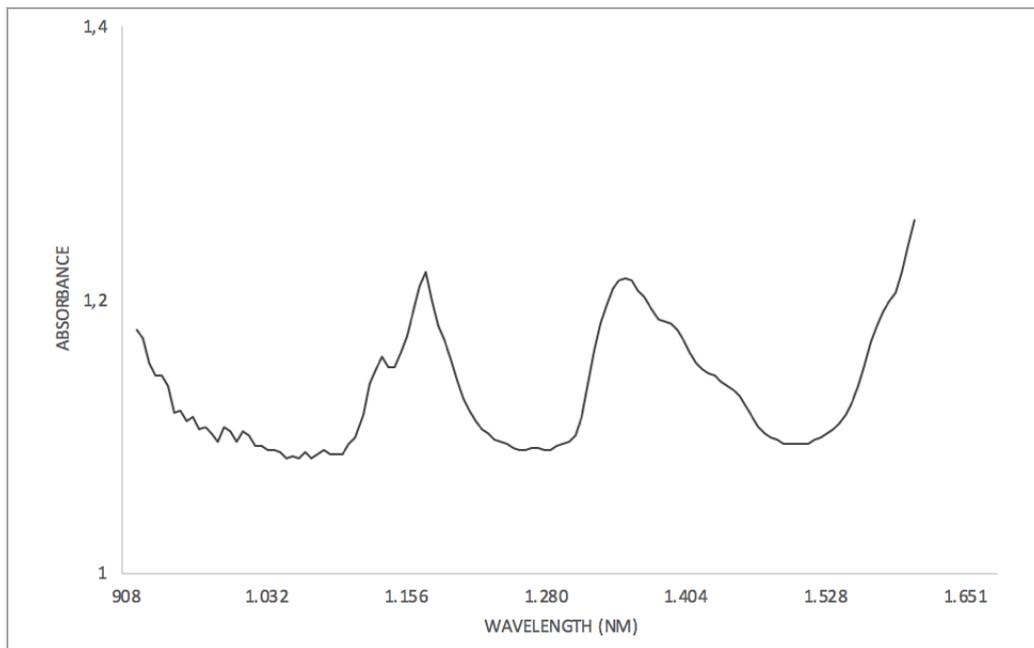


FIGURA 19 – SPETTRO SOLUZIONE STANDARD 100 MG/L PCB

Individuate le concentrazioni di interesse (range da 0,1 a 10 pg di PCB), sono stati fortificati i campioni e acquisiti gli spettri. È stato considerato l'effetto della matrice filtro andando a deporre le diverse quantità di analita prima sui diversi filtri e poi su un unico filtro.

Per ogni livello di concentrazione sono stati acquisiti 9 spettri.

Gli spettri relativi alle due prove effettuate secondo le due modalità, sono riportate in figura 20 e 21. Colori diversi corrispondono a concentrazioni di PCB differenti.

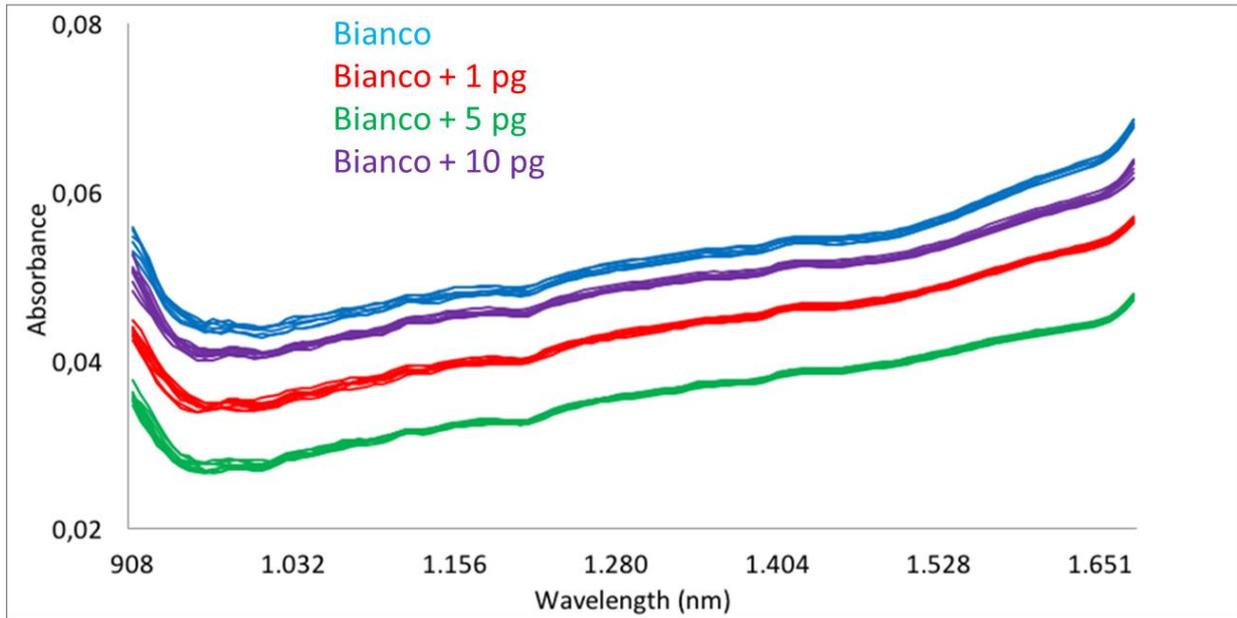


FIGURA 20 – SPETTRI 4 FILTRI DIFFERENTI PROVE PCB

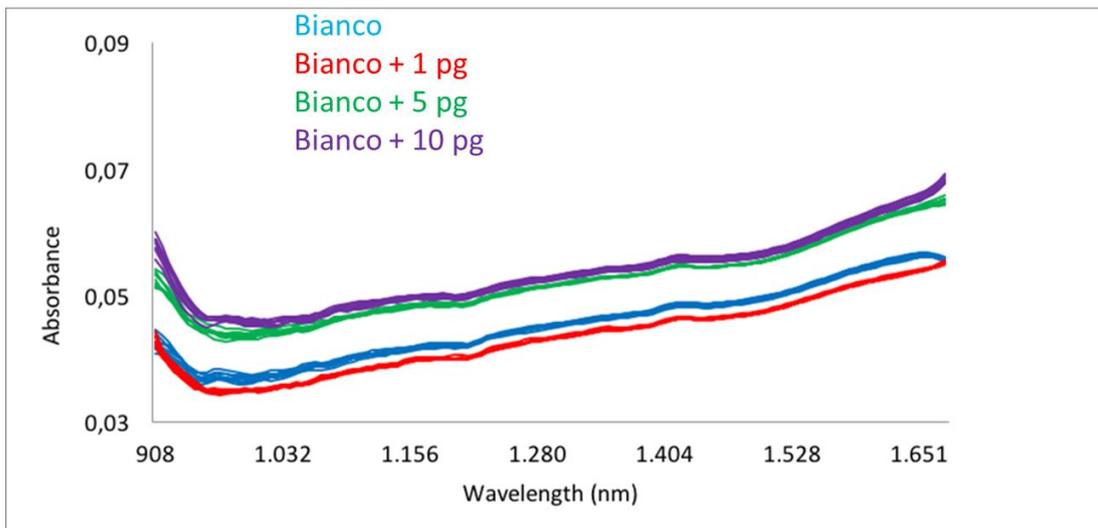


FIGURA 21 - SPETTRI UNICO FILTRO PROVE PCB

Gli spettri acquisiti con MicroNIR sono stati processati con il programma Unscrambler X eseguendo prima un'analisi dei dati mediante PCA per identificare delle eventuali correlazioni. L'analisi esplorativa, dopo opportuno pretrattamento dei dati, ha permesso di ottenere gli scores plots riportati in Figura 22 -23.

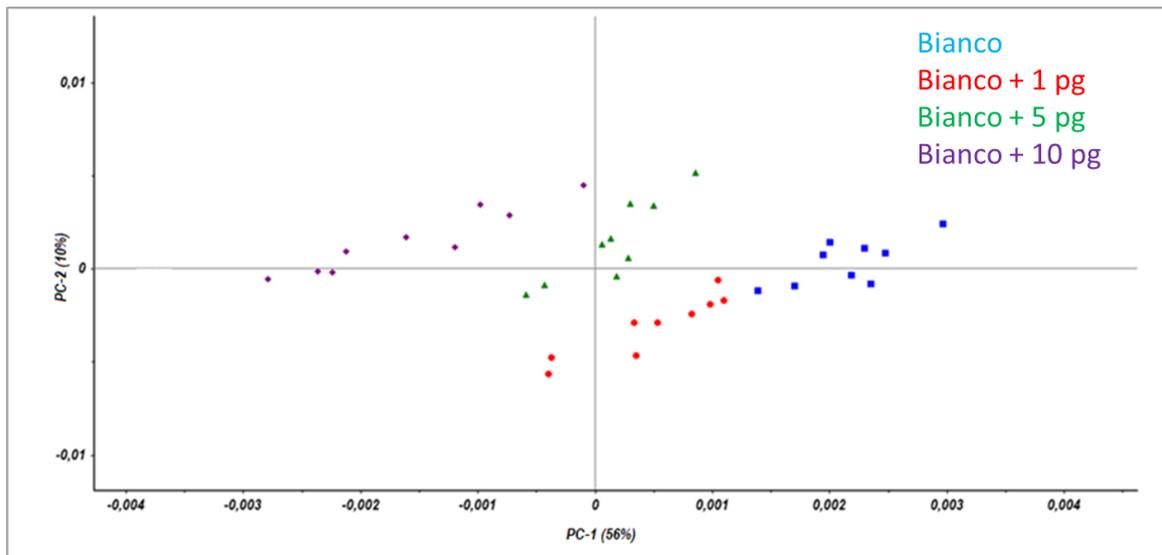


FIGURA 22 – PCA SPETTRI OTTENUTI DAL CARICAMENTO DI 4 FILTRI PROVE PCB

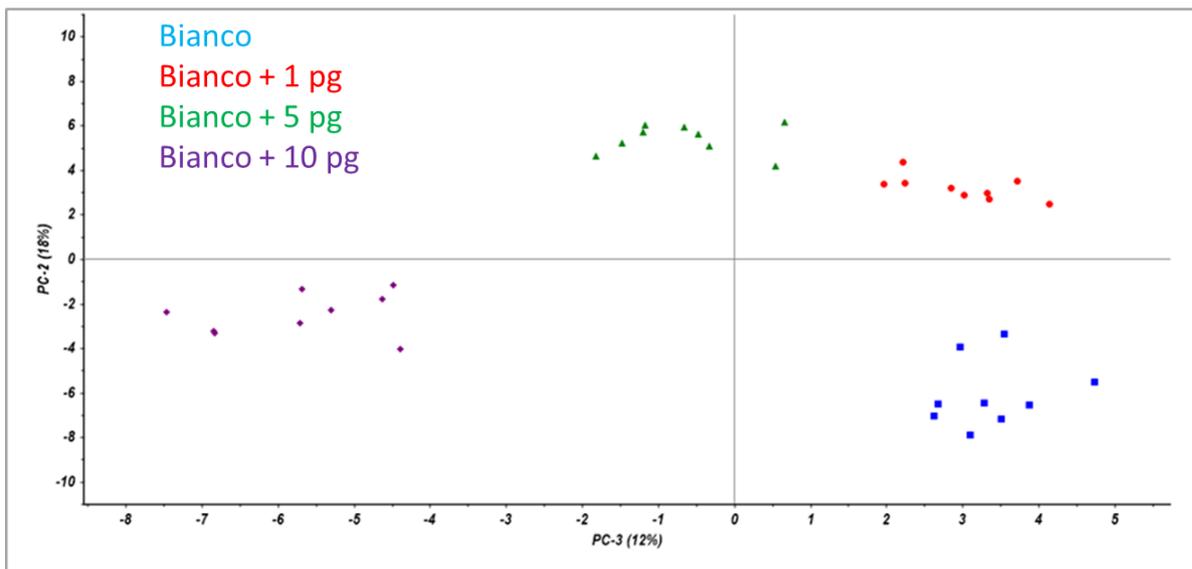


FIGURA 23 - PCA SPETTRI OTTENUTI DAL CARICAMENTO DI 1 FILTRO PROVE PCB

In entrambi i plot sono presenti sempre quattro raggruppamenti. In particolare i campioni possono essere differenziati in funzione della presenza/assenza di PCB. Si possono individuare due raggruppamenti, uno relativo ai bianchi e un altro corrispondente ai bianchi fortificati. In particolare, lo spazio delle componenti principali PC1-PC2, nel primo caso, e PC1-PC3 nel secondo, ha permesso di visualizzare una varianza complessiva dei dati del 66 % e del 51%, rispettivamente.

In questo modo è stato messo a punto il protocollo analitico con cui eseguire l'analisi dei PCB su membrana filtrante mediante MicroNIR/Chemometrics, infatti, questi primi risultati indicano come l'analisi spettroscopica nel Vicino Infrarosso seguita da analisi esplorativa dei dati possa essere considerata come un promettente strumento di indagine analitica.

4.1.2 Modello di predizione PLS-DA

Sulla base dei risultati ottenuti si è deciso di procedere con la realizzazione di un modello di classificazione per poter identificare la presenza/assenza di PCB.

Al fine di mettere a punto il modello di classificazione mediante PLS-DA, sono state effettuate quattro prove a cinque livelli di concentrazione: 0,1pg - 0,5 pg - 1 pg - 5 pg - 10 pg. Il numero di classi coinvolte sono state due: i bianchi e bianchi fortificati con PCB.

I campioni sono stati processati come **0** oppure **1** per codificare l'appartenenza alla classe dei bianchi o alla classe dei PCB.

Tale modello PLS-DA è stato validato mediante il metodo di Cross Validation usando il 75% dei campioni come training set e il restante 25% come evaluation set. Il modello validato è stato utilizzato per predire i campioni del test set esterno, bianchi e due campioni fortificati processati come campioni incogniti per valutare le capacità predittive del modello di classificazione.

Per realizzare il modello PLS-DA è stato considerato un numero ottimale di variabili latenti in modo da avere il minimo errore di classificazione sia in calibrazione che validazione, mediante Cross Validation.

Per valutare la bontà di tale modello, sono stati i seguenti parametri:

- ✓ Sensibilità (%);
- ✓ Specificità (%);
- ✓ Root Mean Square Error (%).

La sensibilità e specificità del modello consentono di valutare rispettivamente il numero di veri positivi e falsi positivi, mentre il Root Mean Square Error rappresenta l'errore di classificazione (Tab. 20).

	BIANCHI			PCB		
	Calibrazione	Validazione	Predizione	Calibrazione	Validazione	Predizione
Sensibilità (%)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Specificità (%)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
RMSE (%)	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09

TABELLA 20 - PARAMETRI VALUTATIVI DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE PLS-DA;

I risultati riportati in tabella 20, evidenziano le grandi potenzialità di questo nuovo approccio. I campioni in esame sono stati correttamente assegnati alla relativa classe di appartenenza, con una sensibilità e specificità pari al 100% e un errore di classificazione pari a 0,09 pg.

Dunque, questo nuovo metodo analitico risulta essere un ottimo metodo di screening per la determinazione di PCB in aria.

4.1.3 Modello di predizione PLS

Gli stessi campioni, oltre ad essere analizzati mediante PLS-DA, sono stati processati mediante l'algoritmo PLS al fine di poter quantificare i diversi livelli di concentrazione considerati. Anche in questo caso la validazione è stata eseguita con il metodo di Cross Validation dove il 75% dei campioni rappresentava il training set mentre il restante 25% il test set esterno con cui verificare le capacità predittive del modello stesso.

Per diminuire l'errore e per avere una buona predizione dei campioni in esame, sono state considerate 5 variabili latenti per la costruzione del modello.

Per valutarne la bontà sono stati considerati:

- ✓ RMSE;
- ✓ R²;
- ✓ pendenza della retta;

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,88	0,79
R ²	0,94	0,88
RMSE	1,13	1,56

TABELLA 21 – PARAMETRI MODELLO PLS

Ciò che è emerso dai risultati mostrati in tabella 21 è che considerando un range troppo vasto (0.1-10 pg), il modello presenta delle prestazioni soddisfacenti che suggeriscono le potenzialità di tale approccio per la determinazione di inquinanti emergenti. Tuttavia, al fine di implementare le performances del metodo, è stata investigata la capacità predittiva dei modelli all'interno di range di concentrazioni più ristretti. A tal fine il range iniziale è stato suddiviso in due per cercare di migliorare le prestazioni della metodica.

Range 1 → 1 – 5 - 10 pg PCB

Range 2 → 0,1 – 0,5 – 1,0 pg PCB

Dividendo questo intervallo di concentrazione in due parti ed effettuando due calibrazioni separate sono stati ottenuti risultati migliori.

Inizialmente, è stato preso in considerazione il primo range di calibrazione (*range 1*). Gli spettri acquisiti sono stati valutati qualitativamente mediante l'Analisi delle Componenti Principali e il modello PLS è stato messo a punto considerando cinque fattori predittivi. La scelta del numero ottimale di variabili latenti è uno step fondamentale per la costruzione del modello, perché consentono di andare a minimizzare l'errore in termini di RMSEC e RMSECV.

I parametri ottenuti, attraverso i quali è stata valutata la capacità predittiva del modello, sono riportati in Tabella 22:

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,98	0,87
R²	0,99	0,95
RMSE	0,47	1,15

TABELLA 22 – PARAMETRI PLS RELATIVI AL RANGE 1 (1 – 5 – 10 pg PCB)

I risultati presenti nella tabella mettono in evidenza come il modello di predizione realizzato sia soddisfacente in termini di accuratezza, sia nella fase di calibrazione che di validazione, per i diversi livelli di concentrazione di PCB. I valori di R² sono pari a 0.99 nel processo di calibrazione, ad indicare che è presente una buona correlazione perché più il valore di R² è vicino a 1 e maggiore è la correlazione tra i dati.

Il Root Mean Square Error (RMSE), l'errore generato dalla discrepanza tra valore vero e valore predetto, è inferiore a 1 pg durante la calibrazione del modello. Ciò dimostra che il nuovo algoritmo commette un basso errore per la quantificazione dei campioni durante la calibrazione del modello.

Nella fase di validazione, questo parametro consente di valutare se la calibrazione è stata eseguita correttamente e, nello specifico, è possibile osservare un RMSE maggiore del RMSEC ma comunque sempre intorno a 1 pg. Ultimo fattore preso in considerazione per valutare l'efficienza di questo nuovo approccio analitico è la sensibilità. Analiticamente la sensibilità viene valutata in relazione alla pendenza della retta di calibrazione, pertanto più il valore risulta essere vicino all'unità, maggiore sarà la sensibilità del modello stesso.

Considerando i valori ottenuti, il modello in esame risulta essere sensibile, ripetibile e riproducibile.

A tal proposito, a conferma di quanto sperimentato, si è deciso di processare dei campioni noti come incogniti al fine di verificare le capacità predittive del modello.

Campione Incognito	Quantità caricata	Valore Predetto
Campione 1	5,0 pg	4,10 ± 0,21
Campione 2	5,0 pg	4,08 ± 0,20

TABELLA 23 – RISULTATI RELATIVI AL CAMPIONE INCOGNITO CON MODELLO VALIDATO PER IL RANGE 1

I risultati riportati in tabella 23, sono concordi tra loro e dimostrano l'applicabilità del modello grazie al suo potere predittivo.

Stesso approccio è stato seguito anche con il secondo range (*Range 2*). Gli spettri acquisiti sono stati valutati qualitativamente mediante PCA e il modello PLS è stato messo a punto considerando cinque fattori predittivi. I valori restituiti dal modello sono mostrati in Tab.

24.

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,98	0,92
R²	0,99	0,96
RMSE	0,04	0,12

TABELLA 24 – PARAMETRO MODELLO PLS RELATIVI AL RANGE 2 (0,1 -0,5 -1,0 PG PCB)

Anche in questo caso si conferma quanto detto per il range 1.

I risultati presenti evidenziano come il modello di predizione sia soddisfacente in termini di accuratezza sia nella fase di calibrazione che di validazione anche per quantità più basse di PCB.

La bontà del modello è stata testata processando dei campioni a concentrazione nota come incogniti. I risultati sono mostrati in tabella 25.

Campione Incognito	Quantità caricata	Valore Predetto
Campione 3	0,5 pg	0,38 ± 0,02
Campione 4	0,5 pg	0,39 ± 0,02

TABELLA 25 – RISULTATI RELATIVI AL CAMPIONE INCOGNITO CON MODELLO VALIDATO PER IL RANGE 2

I campioni incogniti vengono ben predetti, i valori, oltre ad essere concordi tra loro, mostrano inoltre una deviazione standard bassa soprattutto se si considera le quantità di analita considerate.

L'analisi di campioni incogniti va a confermare che il nuovo approccio potrebbe diventare un alternativo e promettente protocollo per il monitoraggio di contaminanti ambientali, in quanto risulta essere un metodo sensibile, efficace, robusto, ripetibile e riproducibile.

4.2 Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento IPA nell'aria ambiente

4.2.1 Ottimizzazione analisi MicroNIR

Le prove sono state eseguite su un filtro in fibra di vetro fortificato con quantità crescenti di IPA e montato su una pompa aspirante della portata di circa 3.5 L/min per un tempo pari a 15 min per ciascun campione.

Le diluizioni sono state fatte a partire da una Mix PAH 10 µg/ml della LGC Reference Material. Lo spettro di questa soluzione sono mostrati in fig. 24

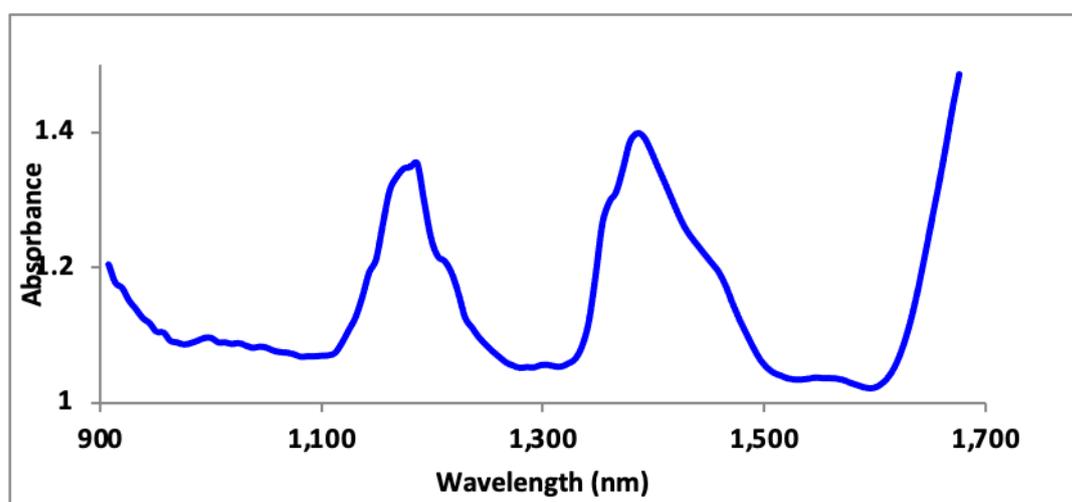


FIGURA 24 – SPETTRO SOLUZIONE STANDARD IPA IN ACETONE

In questo caso abbiamo lavorato con concentrazione dell'ordine dei microgrammi poichè i limiti di legge per aria ambiente sono differenti tra IPA e PCB.

Individuate le concentrazioni di interesse (range da 0,05 a 1,0 μg di IPA), sono stati fortificati i campioni e acquisiti gli spettri a costituire il data set su cui effettuare l'analisi esplorativa. Per ogni livello di concentrazione sono stati acquisiti differenti spettri come riportato in tab 26. (Fig. 25)

CAMPIONE	n° spettri
Bianchi	54
Bianchi + 0,0001 μg	18
Bianchi + 0,0005 μg	18
Bianchi + 0,001 μg	36
Bianchi + 0,05 μg	18
Bianchi + 0,1 μg	36
Bianchi + 0,5 μg	18
Bianchi + 1,0 μg	18

TABELLA 26 – CONCENTRAZIONI E NUMERO DEGLI SPETTRI ACQUISITI PER LE PROVE CON IPA

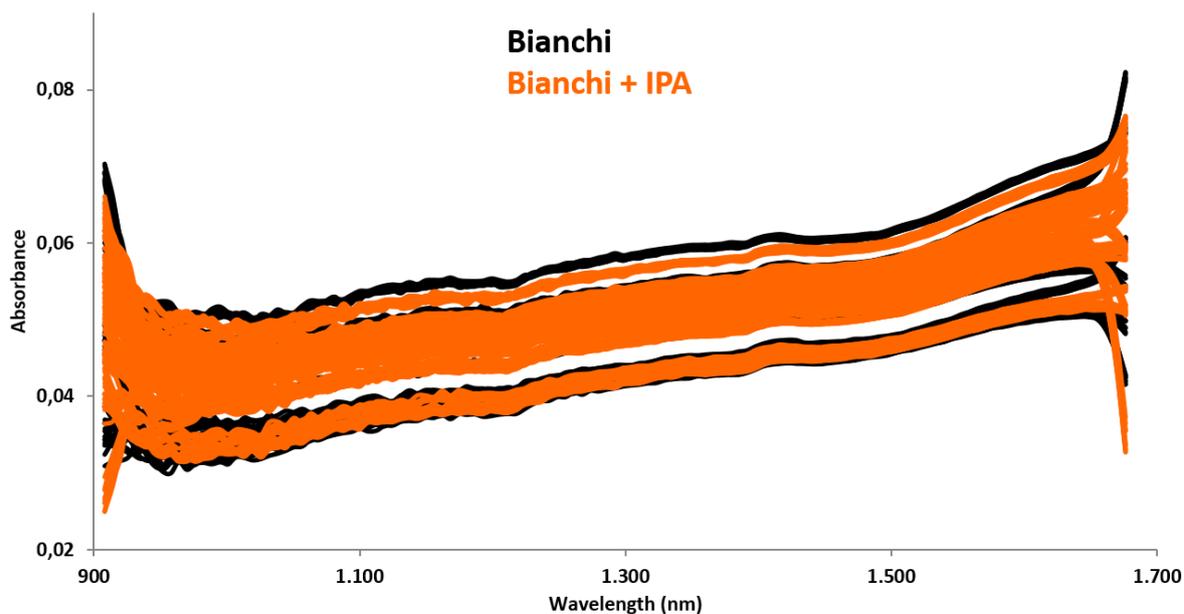


FIGURA 25 – SPETTRI DEL BIANCO E DEI FILTRI FORTIFICATI CON IPA

Gli spettri acquisiti con MicroNIR sono stati processati con il programma Unscrambler X eseguendo prima un'analisi dei dati mediante PCA per la realizzazione di un modello di presenza/assenza. L'analisi esplorativa, dopo opportuno pretrattamento dei dati, ha permesso di ottenere gli scores plots riportati in figura 26.

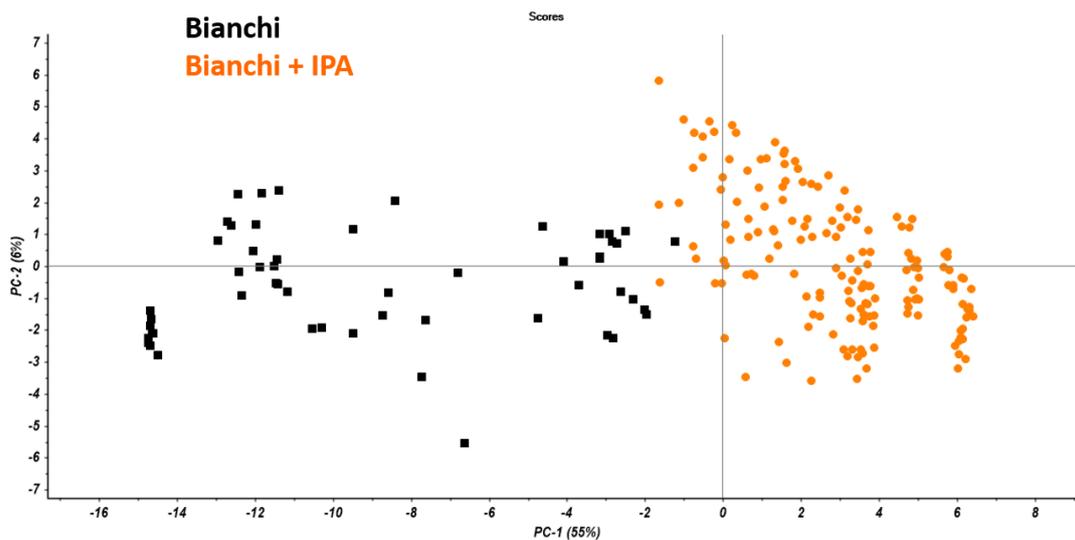


FIGURA 26- PCA SPETTRI BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI CON IPA

I campioni vengono differenziati in funzione della presenza/assenza di IPA. Si possono individuare due raggruppamenti, uno relativo ai bianchi e un altro corrispondente ai bianchi fortificati. In particolare, lo spazio delle componenti principali PC1-PC2, ha permesso di visualizzare una varianza complessiva dei dati del 61 % .

In questo modo è stato messo a punto il protocollo analitico con cui eseguire l'analisi degli IPA su membrana filtrante mediante MicroNIR/Chemometrics. Questi primi risultati indicano come l'analisi spettroscopica nel Vicino Infrarosso seguita da analisi esplorativa dei dati possa essere considerata come un promettente strumento di indagine analitica.

4.2.2 Modello di predizione PLS-DA

Sulla base dei risultati ottenuti si è deciso di procedere con la realizzazione di un modello di classificazione per poter identificare la presenza/assenza di IPA.

Il numero di classi coinvolte sono state due: i bianchi e bianchi fortificati con IPA.

I campioni sono stati processati come 0 oppure 1 per codificare l'appartenenza alla classe dei bianchi o alla classe dei IPA.

Tale modello PLS-DA è stato validato mediante il metodo di Cross Validation usando il 75% dei campioni come training set e il restante 25% come evaluation set. Il modello validato è stato utilizzato per predire i campioni del test set esterno, bianchi e due campioni fortificati processati come campioni incogniti per valutare le capacità predittive del modello di classificazione.

Per realizzare il modello PLS-DA è stato considerato un numero ottimale di variabili latenti in modo da avere il minimo errore di classificazione sia in calibrazione che validazione mediante Cross Validation.

Per valutare la bontà di tale modello di classificazione, sono stati considerati come parametri:

- ✓ Sensibilità;
- ✓ Specificità;
- ✓ Root Mean Square Error.

La sensibilità e specificità del modello consentono di valutare il numero di veri positivi e falsi positivi rispettivamente. Il Root Mean Square Error (RMSE) rappresenta l'errore di classificazione.

	BIANCHI			IPA		
	Calibrazione	Validazione	Predizione	Calibrazione	Validazione	Predizione
Sensibilità (%)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,38	79,01
Specificità (%)	100,00	98,18	60,00	100,00	100,00	100,00
RMSE	0,12	0,15	0,18	0,12	0,15	0,14

TABELLA 27 - PARAMETRI VALUTATIVI DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE PLS-DA;

I risultati riportati in tabella 27 evidenziano le grandi potenzialità di questo nuovo approccio. I campioni in esame sono stati correttamente assegnati alla relativa classe di appartenenza con una sensibilità e specificità pari al 100% in fase di calibrazione. Questi valori diminuiscono in fase di predizione ma comunque risultano essere accettabili.

Anche l'errore di classificazione è buono, rimanendo sempre al di sotto di $< 1 \mu\text{g}$ di IPA.

Sulla base dei risultati ottenuti il modello rappresenta un valido metodo di screening per la determinazione di IPA in aria.

4.2.3 Modello di predizione PLS

La creazione di un modello ha sempre delle finalità predittive. Sia che la predizione di una risposta serva solo per uno screening orientativo, sia che abbia lo scopo di ricercare un preciso valore quantitativo, l'applicazione del modello richiede la valutazione delle sue prestazioni predittive. La procedura di validazione diventa quindi un elemento

imprescindibile per andare a valutare la capacità predittiva del modello. In questa fase infatti il modello viene via via modificato al fine di ottimizzare il suo potere predittivo per renderlo indipendente da possibili oscillazioni dei dati o piccole variazioni delle condizioni iniziali.

Gli stessi campioni, quindi, oltre ad essere analizzati mediante PLS-DA, sono stati processati mediante l'algoritmo PLS al fine di poter quantificare i diversi livelli di concentrazione considerati. Anche in questo caso la validazione è stata eseguita con il metodo di Cross Validation dove il 75% dei campioni rappresentava il training set mentre il restante 25% il test set esterno con cui verificare le capacità predittive del modello stesso (fig. 27 e 28).

Per diminuire l'errore e per avere una buona predizione dei campioni in esame sono state considerate 7 variabili latenti per la costruzione di tale modello in un range di concentrazione tra 0,05 e 1 μ g di IPA.

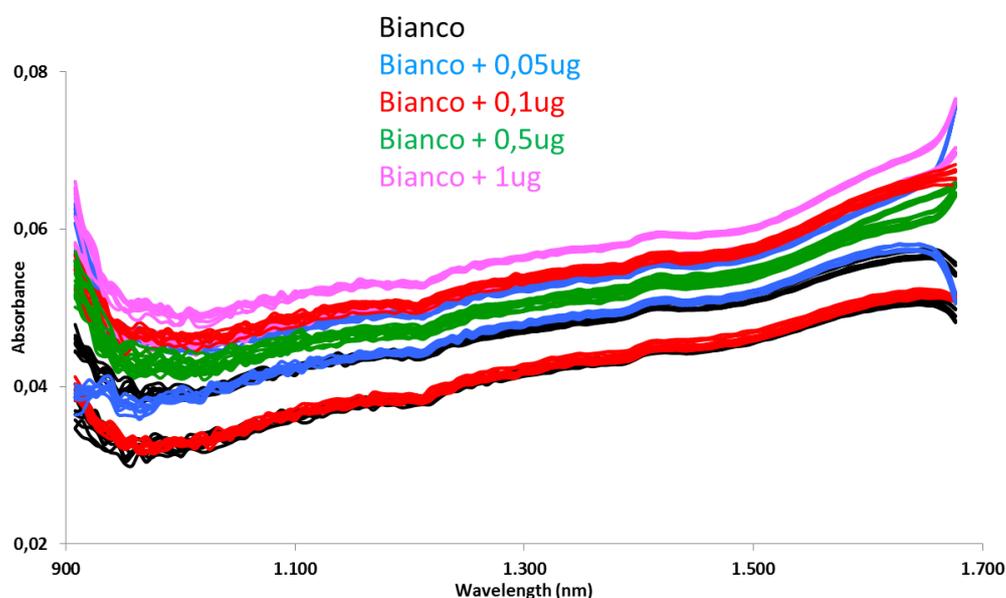


FIGURA 27 – SPETTRI DI ASSORBIMENTO BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI CON IPA (RANGE ESTESO 0,05 -1,0 μ g IPA)

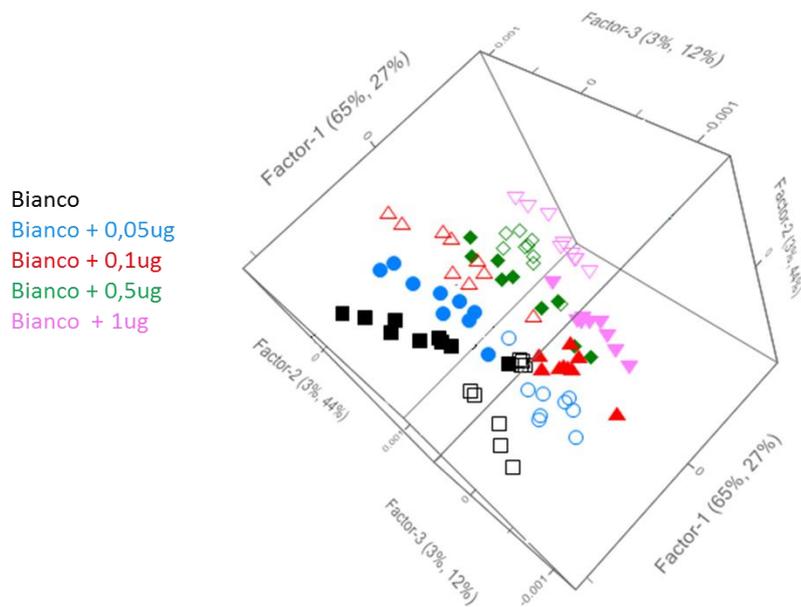


FIGURA 28 - SCORES PLOT TRIDIMENSIONALE RANGE ESTESO 0,05 -1,0 μg IPA

Per valutarne la bontà sono stati considerati:

- ✓ RMSE;
- ✓ R^2 ;
- ✓ pendenza della retta (slope);
- ✓ accuratezza;
- ✓ precisione.

I dati sono riportati nella seguente tabella (Tab. 28).

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,99	0,94
R^2	0,99	0,97
RMSE	0,02	0,09
ACCURATEZZA (%)	95,00	89,94
PRECISIONE (%)	78,06	73,91

TABELLA 28 – VALORI MODELLO PLS PER IPA (0,05 – 1,0 μg IPA)

Attraverso le prove di validazione e calibrazione condotte, è stato possibile calcolare anche i valori di LOD (Limit Of Detection) e LOQ, (Limit Of Quantification) del modello. Questi parametri rappresentano rispettivamente la concentrazione più bassa che può essere rivelata e quantificata con una sufficiente probabilità statistica. Per il Range considerato è stato calcolato un LOD di 0,27 µg e un LOQ pari a 0,90 µg di IPA.

Anche in questo caso, un'ulteriore prova a conferma della capacità predittiva del modello è stata fatta processando un campione a concentrazione nota come incognito.

I valori restituiti dal modello sono abbastanza buoni anche in termini di errore (tab. 29).

Campione Incognito IPA	Quantità caricata	Valore Predetto (µg)
Campione 1	0,05 µg	0,02 ± 0,03
Campione 2	0,50 µg	0,49 ± 0,12
Campione 3	0,50 µg	0,51 ± 0,04

TABELLA 29 - RISULTATI RELATIVI AL CAMPIONE INCOGNITO CON MODELLO VALIDATO PER IL RANGE ESTESO (0,05 – 1,0 µg IPA)

Tenendo conto delle prove precedentemente fatte per la classe PCB, si è deciso di procedere per gli IPA scomponendo l'intervallo di concentrazione considerato (0,0001 – 1,0 µg) in tre range al fine di migliorare le prestazioni del modello:

Range ALTO → 0,1 – 0,5 – 0,1 µg IPA

Range INTERMEDIO → 0,001-0,05 – 0,1 µg IPA

Range BASSO → 0,0001 – 0,0005 - 0,001 µg IPA

Dividendo questo intervallo in tre parti ed effettuando tre calibrazioni separate, sono stati ottenuti risultati migliori, mettendo in evidenza come il modello di predizione realizzato sia buono in termini di accuratezza sia nella fase di calibrazione che di validazione per i diversi livelli di concentrazione di IPA.

Inizialmente, è stato preso in considerazione il primo intervallo di calibrazione, il *range ALTO*. Gli spettri acquisiti sono stati valutati qualitativamente mediante l'Analisi delle Componenti Principali e il modello PLS è stato messo a punto considerando 7 fattori predittivi (fig. 29 e 30). La scelta del numero ottimale di variabili latenti è uno step fondamentale per la costruzione del modello perché consentono di andare a minimizzare l'errore in termini di RMSEC e RMSECV.

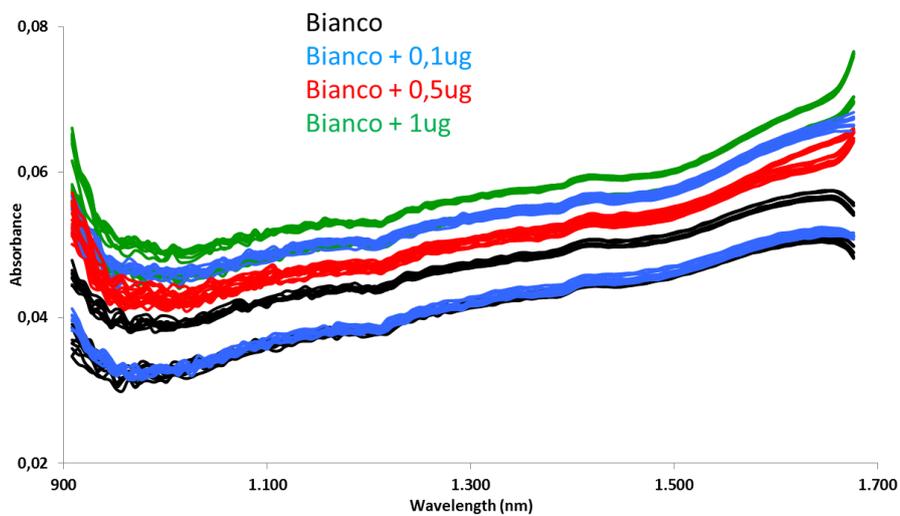


FIGURA 29 - SPETTRI DI ASSORBIMENTO BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI CON IPA (RANGE ALTO 0,1 -1,0 μg IPA)

Bianco
 Bianco + 0,1ug
 Bianco + 0,5ug
 Bianco + 1ug

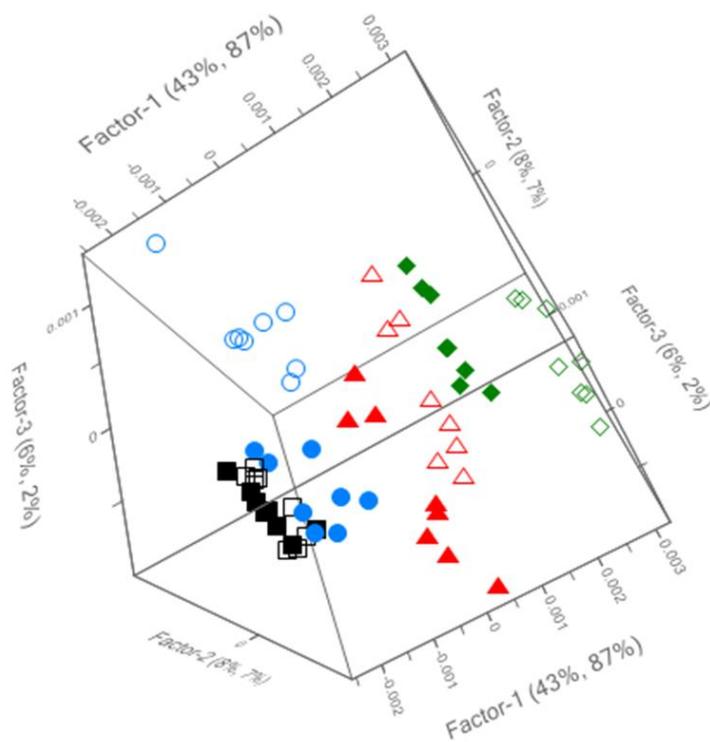


FIGURA 30 - SCORES PLOT TRIDIMENSIONALE RANGE ALTO 0,1 -1,0 µG IPA

I valori ottenuti, che hanno consentito di valutare la capacità predittiva del modello, sono riportati in tabella 30:

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,99	0,97
R²	0,99	0,98
RMSE	0,03	0,07
ACCURATEZZA (%)	99,01	96,48
PRECISIONE (%)	84,09	68,94

TABELLA 30 – PARAMETRI PLS RELATIVI AL RANGE ALTO (0,1 – 1,0 µG IPA)

I risultati mettono in evidenza come il modello di predizione realizzato sia soddisfacente in termini di accuratezza sia nella fase di calibrazione che di validazione, per i diversi

livelli di concentrazione di IPA. I valori di R^2 sono pari a 0.99 nel processo di calibrazione, ad indicare che è presente una buona correlazione .

Il Root Mean Square Error (RMSE), l'errore generato dalla discrepanza tra valore vero e valore predetto, è inferiore a <0.1 pg durante la calibrazione e la validazione del modello a dimostrazione che l'algoritmo commette un basso errore per la quantificazione dei campioni durante la calibrazione del modello.

Per questo Range sono stati calcolati un LOD e LOQ pari rispettivamente a 0,06 e 0,024 μg di IPA.

La conferma della capacità predittiva del modello è stata eseguita processando un campione a concentrazione nota come incognito.

Campione Incognito	Quantità caricata	Valore Predetto
Campione 1	0,50 μg	0,49 \pm 0,03 μg
Campione 2	0,50 μg	0,50 \pm 0,04 μg

TABELLA 31 – RISULTATI RELATIVI AL CAMPIONE INCOGNITO CON MODELLO VALIDATO PER IL RANGE ALTO

Come è possibile osservare in tabella 31, i campioni incogniti vengono ben predetti mostrando, inoltre, risultati concordi tra loro.

Stesso approccio è stato seguito anche con il secondo intervallo, il *Range Intermedio* (0,001-0,05 – 0,1 μg IPA).

Gli spettri acquisiti sono stati valutati qualitativamente mediante PCA e il modello PLS è stato messo a punto considerando 7 fattori predittivi (Fig. 31 e 32).

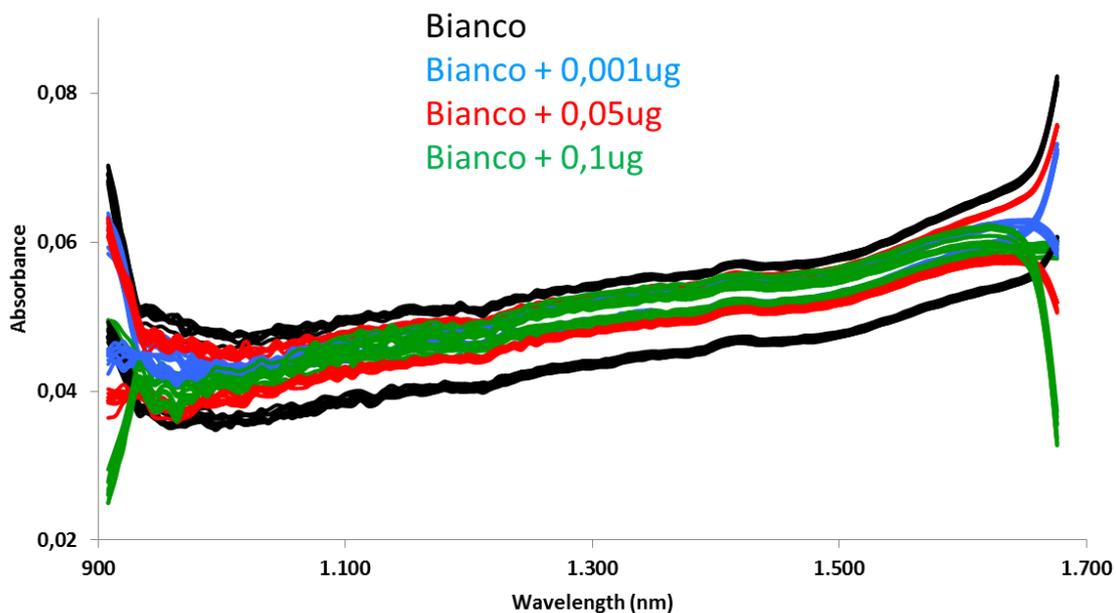


FIGURA 31 - SPETTRI DI ASSORBIMENTO BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI CON IPA (RANGE INTERMEDIO 0,001 - 0,1 μG

IPA)

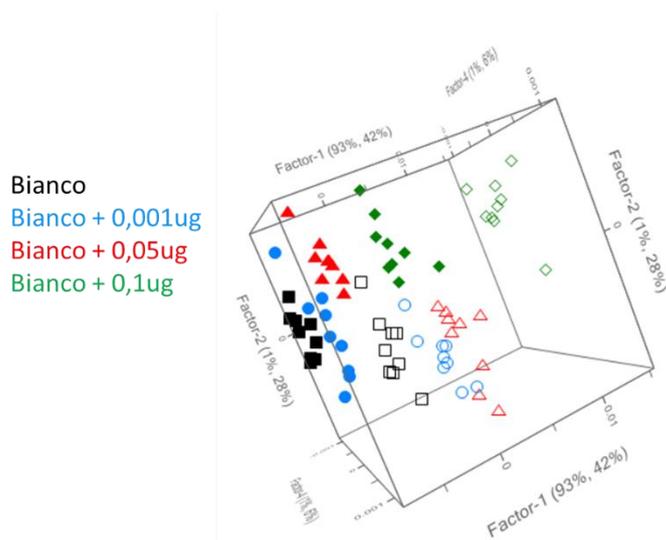


FIGURA 32 - SCORES PLOT TRIDIMENSIONALE RANGE INTERMEDIO 0,001 - 0,1 μG IPA

In tabella 32 vengono riportati i valori dei parametri considerati per valutare la capacità predittiva per il modello.

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,98	0,91
R^2	0,99	0,96
RMSE	0,005	0,01
ACCURATEZZA (%)	94,38	91,35
PRECISIONE (%)	76,10	51,48

TABELLA 32 – PARAMETRI PLS RELATIVI AL RANGE INTERMEDIO 0,001 - 0,1 µg IPA

Le prove effettuate hanno consentito di calcolare per questo range un limite di rilevazione (LOD) pari a 0,02 µg e un limite di quantificazione (LOQ) di 0.09 µg di IPA.

I risultati presenti nelle tabelle mettono in evidenza come il modello di predizione realizzato sia soddisfacente in termini di accuratezza sia nella fase di calibrazione che di validazione per i diversi livelli di concentrazione di IPA. I valori di R^2 sono pari a 0.99 nel processo di calibrazione e 0,96 nella validazione. Rispetto al *Range Alto* si osserva una diminuzione dei valori di precisione, sia per quanto riguarda la calibrazione che la validazione.

Il Root Mean Square Error (RMSE), l'errore generato dalla discrepanza tra valore vero e valore predetto, è anche in questo caso inferiore a <0,1 pg durante la calibrazione e la validazione del modello.

La conferma della capacità predittiva del modello è stata fatta processando un campione a concentrazione nota come incognito.

Campione Incognito	Quantità caricata	Valore Predetto
Campione 1	0,05 µg	0,043 ± 0,009 µg
Campione 2	0,05 µg	0,047 ± 0,013 µg

TABELLA 33 – RISULTATI RELATIVI AL CAMPIONE INCOGNITO CON MODELLO VALIDATO PER IL RANGE INTERMEDIO

Come è possibile osservare in tabella 33, i campioni incogniti vengono ben predetti mostrando, inoltre, risultati concordi tra loro.

Nella scelta del terzo range si è deciso di considerare concentrazioni più basse rispetto all'intervallo esteso di partenza in modo da verificare la risposta del modello a quantità molto basse di analita. Nel *Range Basso* si considera un intervallo di concentrazione che va da 0,0001 a 0,001 µg IPA.

Gli spettri acquisiti sono stati valutati qualitativamente mediante l'analisi delle Componenti Principali e il modello PLS è stato messo a punto considerando 7 fattori predittivi (fig. 33 e 34).

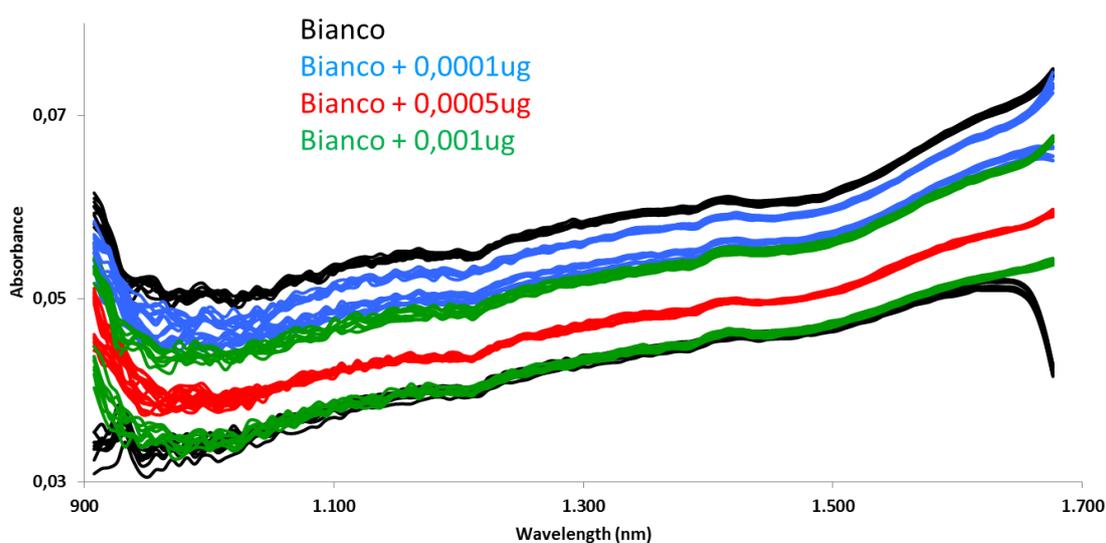


FIGURA 33 - SPETTRI DI ASSORBIMENTO BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI CON IPA (RANGE BASSO 0,0001 - 0,001 µg IPA)

Bianco
 Bianco + 0,0001ug
 Bianco + 0,0005ug
 Bianco + 0,001ug

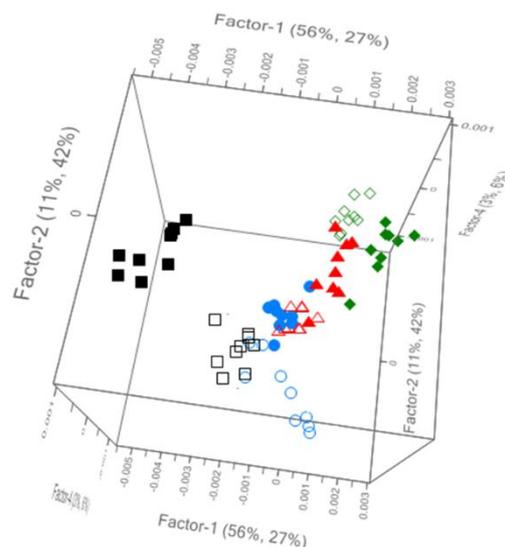


FIGURA 34 - SCORES PLOT TRIDIMENSIONALE RANGE BASSO 0,0001 - 0,001 μg IPA

I parametri ottenuti che hanno consentito di valutare la capacità predittiva del modello sono riportati in tabella 34.

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,98	0,91
R^2	0,99	0,96
RMSE	0,00003	0,00004
ACCURATEZZA (%)	96,1	98,8
PRECISIONE (%)	87,8	41,9

TABELLA 34 - PARAMETRI PLS RELATIVI AL RANGE BASSO 0,0001 - 0,001 μg IPA

Anche per il *range Basso* i risultati sono buoni in termini di accuratezza sia nella fase di calibrazione che di validazione per i diversi livelli di concentrazione di IPA. I valori di R^2 rimangono stabili, ad indicare che è presente una buona correlazione. Rispetto al *range intermedio* la precisione aumenta in fase di calibrazione ma diminuisce ancora nella validazione.

Il Root Mean Square Error (RMSE), è molto basso sia durante la calibrazione che la validazione del modello, il nuovo algoritmo commette quindi un basso errore per la quantificazione dei campioni durante la calibrazione.

Il modello inoltre restituisce un valore di LOD pari a $8,5 \cdot 10^{-5}$ e LOQ uguale a $2,8 \cdot 10^{-4}$.

Processando un campione a concentrazione nota come incognito è stata valutata la capacità predittiva del modello.

Campione Incognito	Quantità caricata	Valore Predetto
Campione 1	0,0005 µg	0,0005 ± 0,0001 µg
Campione 2	0,0005 µg	0,0005 ± 0,0001 µg

TABELLA 35 - RISULTATI RELATIVI AL CAMPIONE INCOGNITO CON MODELLO VALIDATO PER IL RANGE BASSO

I campioni incogniti vengono ben predetti e con risultati concordi tra loro (tab. 35).

4.3 Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento PCDD/F nell'aria ambiente

4.3.1 Ottimizzazione analisi MicroNIR

Le prove sono state eseguite su un filtro in fibra di vetro fortificato con quantità crescenti di PCDD/F e montato su una pompa aspirante della portata di circa 3.5 L/min per un tempo pari a 15 min per ciascun campione.

Le diluizioni sono state fatte a partire da uno Standard Mix *della Sigma Aldrich* contenente 7 PCDD e 10 PCDF. Lo spettro di questa soluzione sono mostrati in fig. 35

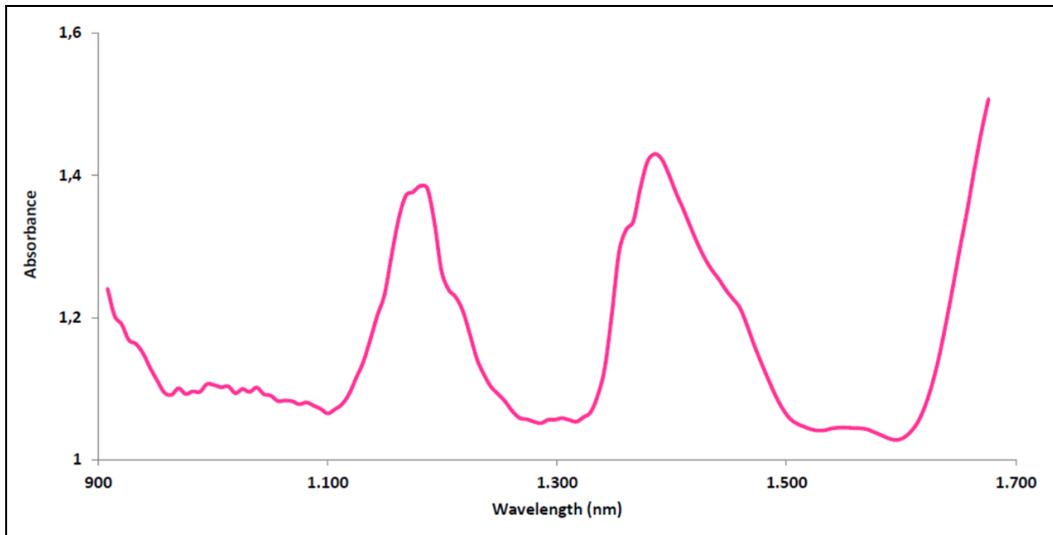


FIGURA 35 – SPETTRO SOLUZIONE STANDARD PCDD/F IN ACETONE

In questo caso abbiamo lavorato con concentrazione dell'ordine dei picogrammi come per i PCB, in accordo con i valori soglia suggeriti.

Individuate le concentrazioni di interesse (range da 0,5 a 10,0 pg di PCDD/F), sono stati fortificati i campioni e acquisiti gli spettri a costituire il data set su cui effettuare l'analisi esplorativa. Per ogni livello di concentrazione sono stati acquisiti differenti spettri come riportato in tabella 36.

CAMPIONE	n° spettri
Bianchi	72
Bianchi + 0,5 pg	18
Bianchi + 1 pg	54
Bianchi + 5 pg	36
Bianchi + 10 pg	36

TABELLA 36 - CONCENTRAZIONI E NUMERO DEGLI SPETTRI ACQUISITI PER LE PROVE CON PCDD/F

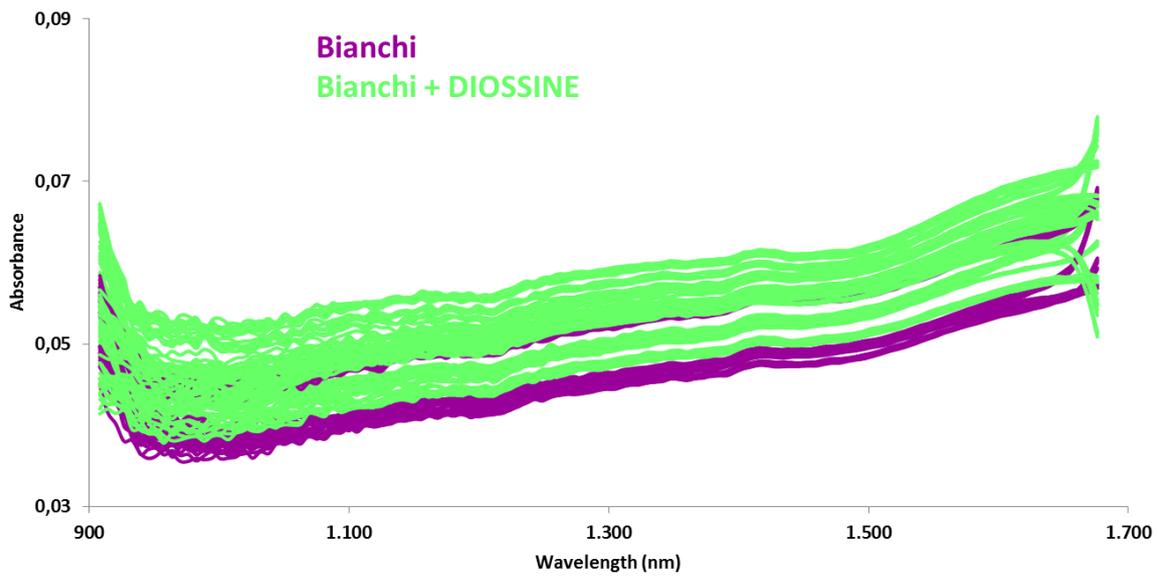


FIGURA 36 – SPETTRI DEL BIANCO E DEI FILTRI FORTIFICATI PCDD/F

Gli spettri acquisiti con MicroNIR sono stati processati con il programma Unscrambler X eseguendo prima un'analisi dei dati mediante PCA per la realizzazione di un modello di presenza/assenza. L'analisi esplorativa, dopo opportuno pretrattamento dei dati, ha permesso di ottenere gli scores plots riportati in figura 37.

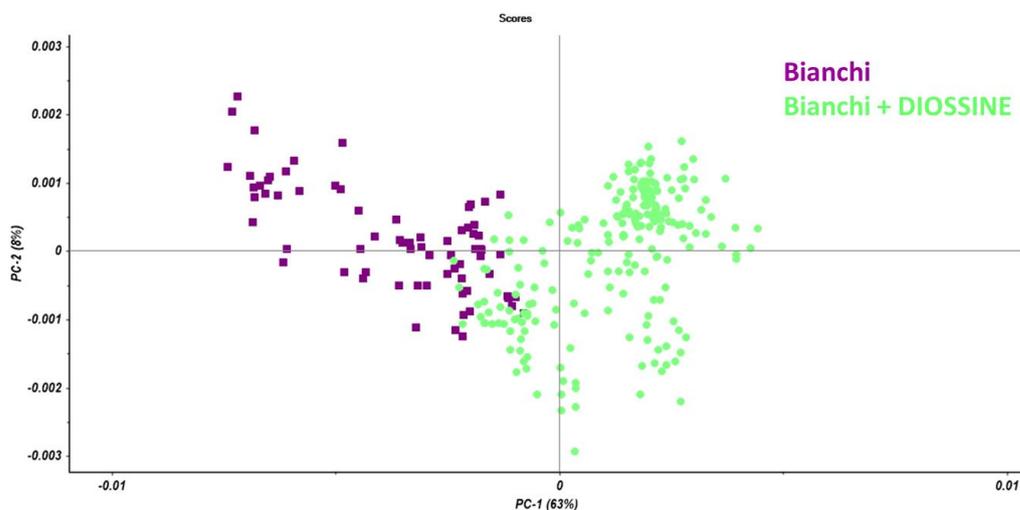


FIGURA 37- PCA SPETTRI BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI PCDD/F

I campioni vengono differenziati in funzione della presenza/assenza di PCDD/F. Si possono individuare due raggruppamenti, uno relativo ai bianchi e un altro corrispondente ai bianchi fortificati. In particolare, lo spazio delle componenti principali PC1-PC2, ha permesso di visualizzare una varianza complessiva dei dati del 71 % .

In questo modo è stato messo a punto il protocollo analitico con cui eseguire l'analisi di questi analiti su membrana filtrante mediante MicroNIR/Chemometrics.

4.3.2 Modello di predizione PLS-DA

Sulla base dei risultati ottenuti si è deciso di procedere con la realizzazione di un modello di classificazione per poter identificare la presenza/assenza di PCDD/F.

Il numero di classi coinvolte sono state due: i bianchi e bianchi fortificati con PCDD/F.

I campioni sono stati processati come 0 oppure 1 per codificare l'appartenenza alla classe dei bianchi o alla classe dei PCDD/F.

Tale modello PLS-DA è stato validato mediante il metodo di Cross Validation usando il 75% dei campioni come training set e il restante 25% come evaluation set.

Per realizzare il modello PLS-DA è stato considerato un numero ottimale di variabili latenti in modo da avere il minimo errore di classificazione sia in calibrazione che validazione mediante Cross Validation.

La bontà del modello di classificazione è stata valutata attraverso:

- ✓ Sensibilità;
- ✓ Specificità;

✓ Root Mean Square Error.

La sensibilità e specificità del modello consentono di valutare il numero di veri positivi e falsi positivi rispettivamente mentre il Root Mean Square Error rappresenta l'errore di classificazione.

	BIANCHI			PCDD/F		
	Calibrazione	Validazione	Predizione	Calibrazione	Validazione	Predizione
Sensibilità (%)	100,00	97,18	100,00	100,00	99,54	80,56
Specificità (%)	100,00	98,57	79,41	100,00	99,08	100,00
RMSE	0,16	0,19	0,20	0,16	0,19	0,18

TABELLA 37 - PARAMETRI VALUTATIVI DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE PLS-DA;

I risultati riportati in Tabella 37 evidenziano che i campioni in esame, sia bianchi che bianchi fortificati, sono correttamente assegnati alla relativa classe di appartenenza con una sensibilità e specificità pari al 100% in fase di calibrazione. Questi valori diminuiscono in fase di predizione ma comunque risultano essere accettabili.

Anche l'errore di classificazione è buono, rimanendo sempre al di sotto di < 1 pg di PCDD/F.

Sulla base dei risultati ottenuti il modello rappresenta un valido metodo di screening per la determinazione di PCDD/F in aria.

4.3.3 Modello di predizione PLS

Al modello di presenza/assenza mediante PLS-DA è seguita un'elaborazione dei dati mediante PLS al fine di ottimizzare il modello di quantificazione e valutarne le potenzialità predittive.

Allo stesso modo di quanto descritto precedentemente, anche in questo caso la validazione è stata eseguita con il metodo di Cross Validation dove il 75% dei campioni rappresentava il training set mentre il restante 25% il test set esterno con cui verificare le capacità predittive del modello stesso.

Per diminuire l'errore e per avere una buona predizione dei campioni in esame sono state considerate 7 variabili latenti per la costruzione di tale modello in un range di concentrazione tra 0, 5 e 10 pg di PCDD/F (fig. e 38).

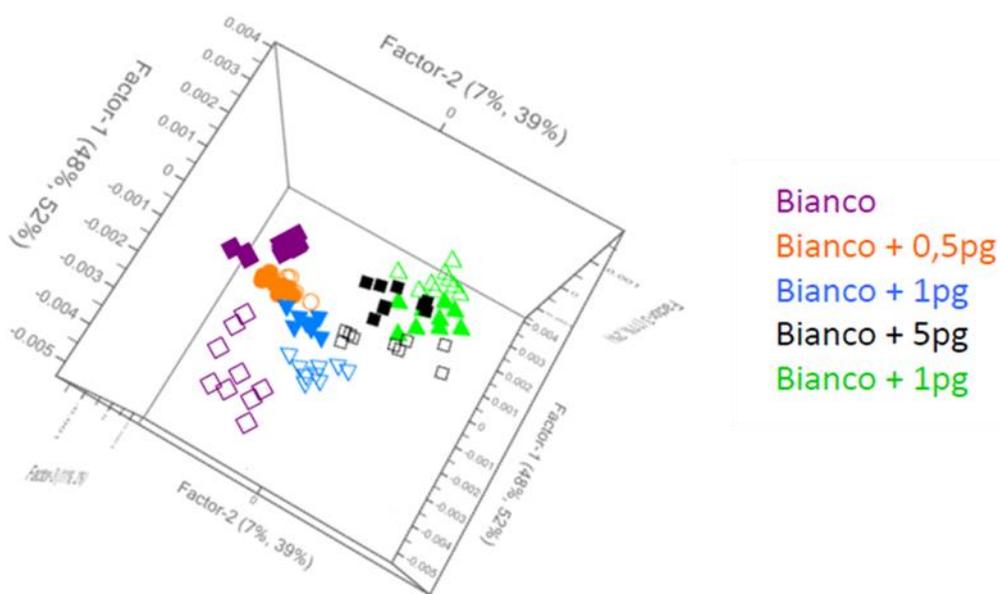


FIGURA 38 - SCORES PLOT TRIDIMENSIONALE RANGE ESTESO 0,5 -10 PG PCDD/F

Per valutarne la bontà sono stati considerati:

- ✓ RMSE;
- ✓ R²;
- ✓ pendenza della retta (slope);
- ✓ accuratezza;
- ✓ precisione.

I dati sono riportati nella tabella sottostante (Tab. 38).

	Calibrazione	Validazione
Slope	0,99	0,97
R²	0,99	0,99
RMSE	0,27	0,60
ACCURATEZZA (%)	96,00	96,7
PRECISIONE (%)	68,5	63,3

TABELLA 38 – VALORI MODELLO PLS PER IPA (0,05 – 1,0 µg IPA)

Il modello restituisce un valore di LOD e LOQ rispettivamente di 0,28 e 0,62 pg di PCDD/F.

Le capacità predittive sono state testate processando dei campioni a concentrazione nota come incogniti (tab. 39).

Campione Incognito PCDD/F	Quantità caricata	Valore Predetto
Campione 1	1,0 pg	1,08 ± 0,52
Campione 2	1,0 pg	0,99 ± 0,89
Campione 3	5,0 pg	4,96 ± 0,11
Campione 4	5,0 pg	5,03 ± 0,52

TABELLA 39 - RISULTATI RELATIVI AL CAMPIONE INCOGNITO CON MODELLO VALIDATO PER IL RANGE ESTESO (0, 5 – 10,0 PG PCDD/F)

I risultati delle prove condotte sono buoni sia in termini di concordanza di valori che di errore.

4.4 Ottimizzazione di un metodo NIR/Chemometrics per il rilevamento e la discriminazione di PCB, IPA e PCDD/F nell'aria ambiente

I modelli validati per le singole classi di analiti e i risultati ottenuti sia in termini di classificazione che di predizione, hanno dimostrato le potenzialità di questo nuovo approccio per la determinazione di microinquinanti organici in aria ambiente.

Al fine di poterne verificare la reale applicabilità su campioni ambientali, sono state eseguite ulteriori prove per vedere se il modello fosse in grado di discriminare non solo le singole classi di analiti dai bianchi ma anche di poterle distinguere tra di loro se presenti simultaneamente.

Su un unico filtro sono state effettuate delle aggiunte di tutti e tre gli analiti di interesse: IPA, PCB, e PCDD/F. Gli spettri acquisiti con il NIR sono stati processati con il programma Unscrambler X eseguendo prima un'analisi dei dati mediante PCA, per identificare delle eventuali correlazioni. L'analisi esplorativa, dopo opportuno pretrattamento dei dati, ha permesso di ottenere gli scores plots riportato in figura 39 e 40.

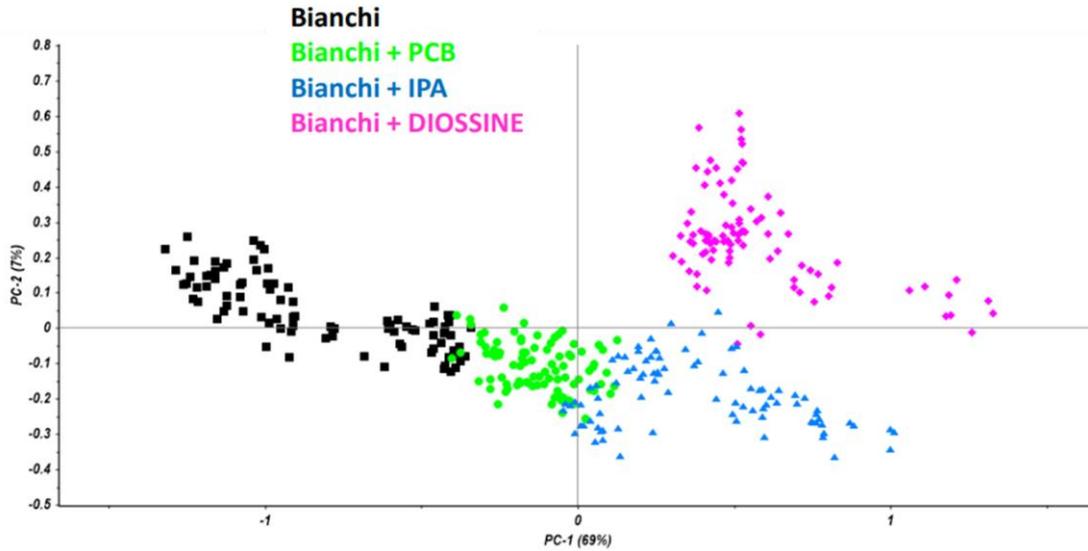


FIGURA 39 - PCA SPETTRI BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI CON IPA, PCB E PCDD/F

Si osserva che i campioni possono essere differenziati in funzione della presenza/assenza di PCB, IPA e PCDD/F ma, ancora più interessante, è possibile individuare altri tre raggruppamenti, riconducibili alle altrettante classi di aneliti con cui è stato fortificato il filtro. Gli stessi spettri sono stati quindi processato mediante l' algoritmo PLS-DA per la realizzazione di un modello di classificazione.

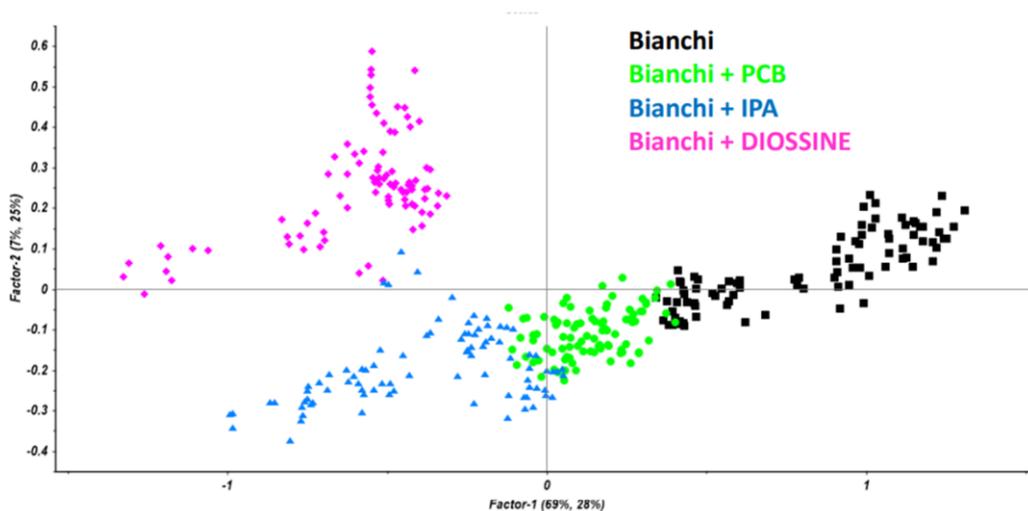


FIGURA 40 - SCORES PLOT BIANCO E CAMPIONI FORTIFICATI CON IPA, PCB E PCDD/F

Per valutare la bontà del modello di classificazione, sono stati considerati come parametri:

- ✓ Sensibilità;
- ✓ Specificità;
- ✓ Root Mean Square Error.

La sensibilità e specificità del modello consentono di valutare il numero di veri positivi e falsi positivi rispettivamente. Il Root Mean Square Error (RMSE) rappresenta l'errore di classificazione. I risultati sono riportati nelle seguenti tabelle (Tab. 40, 41, 42).

	SENSIBILITA' (%)		
	Calibrazione	Validazione	Predizione
Bianchi	91,8	78,6	100,0
PCB	85,7	69,4	100,0
IPA	93,9	98,0	60,0
PCDD/F	85,7	83,7	100,0

TABELLA 40 – VALORI DI SENSIBILITA' DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE PLS-DA

	SPECIFICITA' (%)		
	Calibrazione	Validazione	Predizione
Bianchi	98,9	97,5	100,0
PCB	93,3	82,9	100,0
IPA	97,8	95,7	100,0
PCDD/F	100,0	100,0	100,0

TABELLA 41 - VALORI DI SPECIFICITA' DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE PLS-DA

	RMSE		
	Calibrazione	Validazione	Predizione
Bianchi	0,25	0,29	0,28
PCB	0,26	0,30	0,25
IPA	0,21	0,23	0,22
PCDD/F	0,18	0,19	0,20

TABELLA 42 - VALORI DI ERRORE DI CLASSIFICAZIONE DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE PLS-DA

Ad ulteriore conferma delle prove condotte singolarmente per ogni classe, anche in questo caso i risultati riportati nelle tabelle 40, 41 e 42 evidenziano le grandi potenzialità di questo nuovo approccio. I campioni in esame sono stati correttamente assegnati alla relativa classe di appartenenza, con una specificità e sensibilità pari al 100%, o comunque molto vicina, in fase di calibrazione e di predizione e con un buon errore di classificazione. Sulla base dei risultati ottenuti il modello rappresenta un valido metodo di screening per la determinazione di microinquinanti organici come IPA, PCB e PCDD/F in aria.

CONCLUSIONI

I fenomeni di combustioni incontrollate di rifiuti e impianti di trattamento e/o deposito rifiuti sono diventati negli anni un problema ambientale e sanitario sempre più frequente ed attuale. Solo nel Lazio, da gennaio 2014 a giugno 2020 sono stati 47 i casi di incendi per i quali l'Arpa Lazio è intervenuta con attività di monitoraggio ambientale.

Ad ARPA spetta il ruolo, non banale, di garantire adeguati livelli di conoscenza dello stato dell'ambiente e della sua possibile evoluzione. Le informazioni che è in grado di produrre, nell'immediato, non sono talvolta sufficientemente dettagliate ed esaustive da poter dare indicazioni certe e rassicurazioni ai cittadini. I tempi necessari a dare risposte di carattere analitico sui microinquinanti pericolosi, non sono quindi spesso compatibili con i tempi decisionali che le Autorità Competenti hanno, per la gestione delle emergenze ambientali a tutela della popolazione.

È anche vero che, per una corretta interpretazione dei risultati, è utile avere a disposizione serie storiche di dati con i quali fare confronti, poiché la contaminazione potrebbe essere pre-esistente all'evento emergenziale. Tuttavia, l'onerosità delle determinazioni analitiche e la disponibilità di dati relativi per lo più a brevi archi temporali, pongono dei limiti ad un'interpretazione organica ed integrata degli eventi quali ad esempio gli incendi. Una predisposizione di specifiche campagne di monitoraggio protratte nel tempo potrebbe rappresentare una buona base di partenza per le Agenzie di Protezione Ambientale. Ciò consentirebbe la creazione di archivi storici di dati contenenti anche concentrazioni di

fondo, ovvero determinate in condizioni non alterate, dei principali contaminanti ambientali.

L'utilizzo di strumentazione da campo, di facile gestione e relativamente economia, come un MicroNIR, rappresenta una buona base di partenza per rendere più efficiente ed efficace il contributo di ARPA nella gestione delle emergenze ambientali. Altro aspetto da non sottovalutare è la possibilità di impiego di questo approccio analitico per effettuare delle campagne di monitoraggio ad hoc per microinquinanti organici. Ciò consentirebbe di incrementare delle banche dati con valori di fondo di analiti la cui determinazione, ad oggi, nei laboratori delle Agenzie per costi, tempi, ma soprattutto numero di campioni che i laboratori si troverebbero a gestire, non sarebbe facilmente realizzabile.

Attraverso l'acquisizione degli spettri IR, seguita da un'analisi chemiometrica dei dati, è stato possibile dimostrare fin da subito le potenzialità di tale approccio analitico come metodo di screening qualitativo per IPA, PCB, e PCDD/F.

Per la classe dei PCB, IPA e PCDD/F i dati restituiti dal modello mostrano che ogni campione viene correttamente assegnato alla propria classe di appartenenza con una selettività e specificità del 100% o comunque di poco inferiore.

Le successive fasi di calibrazione e validazione, attraverso l'algoritmo PLS, hanno permesso di verificare il modello anche dal punto di vista quantitativo. Questo nuovo protocollo restituisce ottimi risultati in termini di errore, accuratezza e precisione, inoltre, la verifica del potere predittivo, attraverso l'analisi di campioni a concentrazione nota processati come incogniti, risulta promettente. La scomposizione dell'intervallo di

concentrazione in più range ristretti consente, inoltre, di migliorare palesemente le performance del protocollo analitico in questione.

Tuttavia, alcune considerazioni sono d'obbligo.

Sebbene questo nuovo approccio possa trovare evidenti consensi dal punto di vista qualitativo di screening Presenza/Assenza, possono essere sollevati leciti dubbi sull'approccio quantitativo. È vero che i modelli validati hanno un'ottima risposta in termini di capacità predittiva con valori concordi ed errori bassi, è altrettanto vero però che la risposta è influenzata dal set analitico utilizzato per la calibrazione del modello.

Mentre con il tradizionale approccio analitico (metodi EPA) è possibile andare ad identificare i singoli analiti, in questo caso la discriminazione non è altrettanto immediata.

Questo rappresenta un aspetto limitante soprattutto per la determinazione di quei composti per i quali esiste un TEF (PCB-DL e PCDD/F) e che devono pertanto essere quantificati separatamente, al fine di poter calcolare la TEQ relativa.

L'approccio analitico realizzato in questo studio, allo stato attuale, non consentirebbe una adeguata comparazione dei valori restituiti dal modello, con i risultati analitici dei metodi EPA. Sarebbe necessario eseguire delle prove di validazione e calibrazione con i singoli analiti di ogni classe di interesse, e valutare successivamente la risposta del modello. Solo in questo caso avrebbe senso un confronto dei risultati analitici.

È evidente che questo nuovo protocollo analitico, almeno in questa prima fase della sperimentazione, presenta delle limitazioni, tuttavia, non sarebbe corretto non evidenziare le innumerevoli potenzialità che tale approccio potrebbe avere, in seguito ad una più dettagliata e mirata ricerca.

Per lo scopo che ha avuto fin dall'inizio questo lavoro di dottorato, ovvero lo sviluppo di un protocollo analitico che consentisse una riduzione dei tempi e dei costi associata alla gestione dei campioni, le sperimentazioni condotte hanno permesso di centrare l'obbiettivo.

L'utilizzo di strumentazione da campo come il MicroNir, consente di ridurre al minimo i campionamenti attraverso un incremento della raccolta dei dati su campo. Inoltre, la messa a punto di un metodo validato di screening fornisce informazioni che possono poi essere confermate, in un secondo tempo, in fase di laboratorio, riducendo i tempi ed i costi associati alla gestione dei campioni negativi.

A tal proposito, è vero che il fattore tempo è prioritario nel caso di una emergenza ambientale, ma passa in secondo piano nella scala delle priorità di un laboratorio che utilizza tali metodiche anche per le istituzionali analisi di routine. L'iter analitico adottato dai laboratori comporta uso di composti chimici (marcati e nativi) pericolosi e tossici, nonché quantità considerevoli di solventi organici di per sé nocivi. L'esposizione dei lavoratori a tali sostanze e lo smaltimento dei rifiuti, sono ulteriori aspetti che vanno a gravare sulla gestione di un laboratorio di analisi.

Come è stato evidenziato più volte in questo lavoro, la spettroscopia NIR ha il vantaggio di essere una tecnica non distruttiva che non prevede l'uso di solventi chimici o di reagenti per la preparazione del campione, il che la renderebbe particolarmente apprezzata nell'ambito di una chimica analitica ambientale più verde.

Il perfezionamento di questo nuovo protocollo analitico consentirebbe di ridurre l'impatto ambientale dei laboratori senza necessariamente dover rinunciare alle prestazioni

analitiche. Tuttavia, il lavoro della chimica analitica ambientale è caratterizzato dalla necessità di utilizzare metodi ufficiali sperimentati e validati. Anche se si è dimostrato di poter lavorare in maniera più rispettosa dell'ambiente, ARPA Lazio è accreditata secondo la norma internazionale UNI EN ISO 17025:2019 come laboratorio Multisito dal 2004 e deve pertanto garantire una certificazione del dato analitico, che ad oggi la spettroscopia nel vicino infrarosso non assicura in pieno.

Questo progetto può quindi rappresentare una buona base di partenza per un più dettagliato lavoro di sperimentazione, finalizzato a rendere tale protocollo adatto agli standard di qualità necessariamente richiesti nei laboratori accreditati.

In conclusione, sulla scia del crescente senso di responsabilità nei confronti dell'ambiente, credo che puntare sulla ricerca e sull'innovazione tecnologica, per avere sistemi sempre più performanti in termini di rapidità e semplicità di applicazione, nonché a basso impatto ambientale, è un obiettivo che tutte le Agenzie si dovrebbero prefiggere.

Bibliografia

- [1] <http://www.senato.it/leg/17/BGT/Schede/docnonleg/35644.htm>
- [2] https://brescia.corriere.it/notizie/cronaca/18_gennaio_18/rifiuti-lombardia-incendio-mese-brescia-inquinare-business-41aecdc0-fc64-11e7-80a4-a8d109924739.shtml?refresh_ce-cp
- [3] https://www.difesa.it/Content/Pagine/Piano_azione_contrasto_roghi_rifiuti.aspx
- [4] Liem AK1, Fürst P, Rappe C., 2000. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food AdditContam.* 2000 Apr;17(4):241-59.
- [5] Danae Costopoulou, Irene Vassiliadou, Dimitrios Chrysafidis, Kyriaki Bergele, Eleni Tzavara, Vassilios Tzamtzis, Leondios Leondiadis, 2010. Determination of PCDD/F, dioxin-like PCB and PAH levels in olive and olive oil samples from areas affected by the fires in summer 2007 in Greece.
- [6] Vassiliadou, I., Papadopoulos, A., Costopoulou, D., Vasiliadou, S., Christoforou, S., Leondiadis, L., 2009. Dioxin contamination after an accidental fire in the municipal landfill of Tagarades, Thessaloniki, Greece. *Chemosphere* 74, 879–884.
- [7] Adeolu O. Aderemi#1, Adebayo A. Otitoloju, 2012. An Assessment of Landfill Fires and Their Potential Health Effects- a Case Study of a Municipal Solid Waste Landfill in Lagos, Nigeria
- [8] Martens, D., Balta-Brouma, K., Brotsack, R., Michalke, B., Schramel, P., Klimm, C., Henkelmann, B., Oxynos, K., Schramm, K.W., Diamadopoulos, E., Kettrup, A., 1998. Chemical impact of uncontrolled solid waste combustion to the vicinity of the Kouroupitos ravine, Crete, Greece. *Chemosphere* 36, 2855–2866.
- [9] Derek Muir & Ed Sverko. Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: a critical appraisal. *An al Bioanal Chem* (2006) 386:769–789.
- [10] Linee Guida SNPA – Consultazione Pubblica 2021. Linee guida SNPA per la gestione delle emergenze derivanti da incendi. Delibera del Consiglio SNPA. Seduta del 18-05-2021 Doc. n.107/21. <https://www.snpambiente.it/2021/07/28/linee->

guida-snpa-per-la-gestione-delle-emergenze-derivanti-da-incendi-aperta-la-consultazione-pubblica/

- [11] http://www.cluin.org/char1_tech.cfm
- [12] EPA - Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response. <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response#pops>
- [13] Ballschmiter K., Hackenberg R., Jarman W. M., Looser R. Man-made chemicals found in remote areas of the world: The experimental definition for POPs. Environmental Science and Pollution Research International Volume: 9 Issue 4 (2002) ISSN: 0944-1344 Online ISSN: 1614-7499.
- [14] Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukawa, R. (1994). Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. Sci. Total Environ., 154: 163-177.
- [15] European Commission, Environment, Chemicals - Persistent Organic Pollutants (POPs). https://ec.europa.eu/environment/chemicals/international_conventions/index_en.htm
- [16] PASQUALE SPEZZANO ENEA UTS Protezione e Sviluppo dell'Ambiente e del Territorio, Tecnologie Ambientali. Inquinanti organici persistenti. ENERGIA, AMBIENTE E INNOVAZIONE 5/04
- [17] Giuseppe Viviano, Paolo Mazzoli e Gaetano Settimo, 2006. Microinquinanti organici e inorganici nel comune di Mantova: studio dei livelli ambientali. Rapporti ISTISAN 06/43 - ISSN 1123-3117
- [18] EFSA, 2008. Relazione annuale 2008. <https://www.efsa.europa.eu/it/corporate/pub/ar08>
- [19] Vitozzi, L. ISS. Effetti biologici degli IPA, 5.1 Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione degli IPA. https://www.iss.it/documents/20126/45616/V_Parte_Rapp_91_27_Compresso.pdf/6024fff0-0327-2c3f-80ef-a54698ebe0d4?t=1581103358675
- [20] Beatrice Bocca, Riccardo Crebelli, Edoardo Menichini, 2003. Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. Rapporti ISTISAN 03/22 - ISSN 1123-3117.

- [21] Robertson, Larry W. and Hansen, Larry G., "PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects" (2001). Medicine and Health Sciences. 8. https://uknowledge.uky.edu/upk_medicine_and_health_sciences/8
- [22] De Boer, J., Stronck, C. J. N., Non-ortho and mono-ortho substituted chlorobiphenyls and chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in marine and freshwater fish and shellfish from the Netherlands. *Chemosphere* 26, 1823–1842 (1993).
- [23] APAT, 2006. Diossine Furani e PCB. Quaderni - Laboratorio/2006. ISBN: 88-448-0173-6.
<https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/quaderni/laboratorio/diossine-furani-e-pcb>
- [24] Baird, C., Cann, M., *Chimica Ambientale*, Zanichelli (2006).
- [25] Fiedler, H. Dioxins and Furans (PCDD/PCDF). July 2005 *ChemInform* 34(26):495-495. DOI: 10.1007/10751132_6. In book: *Persistent Organic Pollutants*.
- [26] Ulaszewska, M. M., Zuccato, E., Capri, E., Iovine, R., Colombo, A., Rotella, G., Generoso, C., Grassi, P., Melis, M., Fanelli, R. The effect of waste combustion on the occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk in Italy. *Chemosphere* 82 (2011) 1–8.
- [27] Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., van Leeuwen, F. X., Liem, A. K., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental health perspectives* 106, 775–92 (1998).
- [28] Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R. E., The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 93, 223–41 (2006).
- [29] Srinivas N. Pentyala, Mario Rebecchi, Supriya Mishra, Aleef Rahman, Rachel Stefan, Jeanette Rebecchi and Prasada Rao S. Kodavanti. Polychlorinated Biphenyls:

In situ Bioremediation from the Environment. *Environ. Pollut. Ecol. Hum. Hlth.* 249-262, (2011).

- [30] Fiedler, H., 2007. National dioxins/furans release inventories under Stockholm Convention on POPs. *Chemosphere*, 67(9), (2007)
- [31] Hites, R.A. 2010. Dioxins: An overview and history†. *Environ. Sci. Technol.* 45(1). (2010).
- [32] Roger K. Gilpin, Daniel J. Wagel, Joseph G. Solch. Production, Distribution, and Fate of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans, and Related Organohalogenes in the Environment. *Dioxins and health / [edited by] Arnold Schecter, Thomas A. Gasiewicz* – 2nd ed. (2003). Chapter 2 – pag. 55.
- [33] Piazza, R., Giuliani, S., Bellucci, L. G., Mugnai, C., Cu, N. H., Nhon, D. H., Vecchiato, M., Romano, S., Frignani, M., PCDD/Fs in sediments of Central Vietnam coastal lagoons: in search of TCDD. *Marine pollution bulletin* 60, 2303–2310 (2010).
- [34] Haifeng Li, Wenbin Liu, Chen Tanga Rongrong Lei, Xiaolin Wu, Lirong Gao, Guijin Su. Emissions of 2,3,7,8-substituted and non-2,3,7,8-substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from secondary aluminum smelters. *Chemosphere Volume 215*, January 2019, Pages 92-100.
- [35] Tze Chean Ooi, Liming Lu. Formation and mitigation of PCDD/Fs in iron ore sintering. *Chemosphere Volume 85*, Issue 3, October 2011, Pages 291-299.
- [36] Rappe, C., Sources of PCDDs and PCDFs. Introduction. reactions, levels, patterns, profiles and trends. *Chemosphere* 25, 41–44 (1992).
- [37] K. Srogi. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: A review. February 2008 *Environmental Chemistry Letters* 6(1):1-28
- [38] MOE Japan, 2005. Dioxins. Ministry of the Environment Japan, Government of Japan.
- [39] Nguyen, H.M., Tu, B.M., Watanabe, M., Kunisue, T., Monirith, I., Tanabe, S., Sakai, S., Subramanian, A., Sasikumar, K., Pham, H.V., Bui, C.T., Tana, T.S., Prudente, M.S., 2003. Open dumping site in Asian developing countries: a potential source of polychlorinated dibenz-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environ. Sci. Technol.* 37 (8), 1493–1502.

- [40] Booth, S., J. Hui, Z. Alojado, V. Lam, W. Cheung, D. Zeller, D. Steyn, and D. Global deposition of airborne dioxin. *Mar Pollut Bull.* 2013.
- [41] Mokhtar, M.M., Taib, R.M., Hassim, M.H., 2014. Measurement of PCDD/Fs emissions from a coal-fired power plant in Malaysia and establishment of emission factors. *Atmos. Pollut. Res.* 5 (3), 388–397.
- [42] Barbas, B., de la Torre, A., Sanz, P., Navarro, I., Artinano, B., Martinez, M.A., 2018. Gas/particle partitioning and particle size distribution of PCDD/Fs and PCBs in urban ambient air. *Sci. Total Environ.* 624, 170–179.
- [43] Everaert K. e Baeyens J. (2002) The formation and emission of dioxins in large scale thermal processes. *Chemosphere* 46: 439-448.
- [44] Lasagni M., Collina E., Piccinelli E., Anzano M. N., Piazzalunga A., Pitea D. Kinetic Modeling of the Formation and Destruction of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxin and Dibenzofuran from Fly Ash Native Carbon at 300 °C. *Environmental Science & Technology* 2013, 47 (9) , 4349-4356. <https://doi.org/10.1021/es304902f>
- [45] Altarawneh, M., Dlugogorski, B.Z., Kennedy, E.M., Mackie, J.C., 2009. Mechanisms for formation, chlorination, dechlorination and destruction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs). *Prog. Energy Combust. Sci.* 35 (3), 245–274.
- [46] Šyc M., Horák J., Hopan F., Krpec K., Tomšej T., Ocelka T., Pekárek V. Effect of fuels and domestic heating appliance types on emission factors of selected organic pollutants. *Environ Sci Technol.* 2011 Nov 01; 45(21):9427-34.
- [47] Collina E., Lasagni M., Piccinelli E., Pitea D. Sul meccanismo di formazione e distruzione di Policlorodibenzo-p-diossine e policlorodibenzo-p-furani nei processi termici. *Ingegneria dell’Ambiente* Vol. 4 n. 1/2017.
- [48] Lenoir D., Wehrmeier A., Schramm K.-W. et al. (1998) Thermal formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and – furans: Investigation on relevant pathways. *Environ. Eng. Sci.* 15: 37-47.
- [49] Stanmore B. (2004). The formation of dioxins in combustion systems. *Combust. Flame* 136: 398-427.
- [50] ISPRA, Rapporti 342/2021. Italian Emission Inventory 1990-2019. Informative Inventory Report 2021. April 2021.

- [51] Altarawneh M., Dlugogorski B. Z. Mechanisms of transformation of polychlorinated diphenyl ethers into polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere* 114 (2014) 129–135.
- [52] Mengmei Zhang, Alfons Buekens & Xiaodong Li (2017) Open burning as a source of dioxins, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47:8, 543-620, DOI:10.1080/10643389.2017.1320154.
- [53] Iino, F., Imagawa, T., Takeuchi, M., and Sadakata, M. (1999). De novo synthesis mechanism of polychlorinated dibenzofurans from polycyclic aromatic hydrocarbons and the characteristic isomers of polychlorinated naphthalenes. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1038–1043.]
- [54] Kannan V. M., Gopikrishna V. G., Saritha V. K., Krishnan K. P., Mohan M. PCDD/Fs, dioxin-like, and non-dioxin like PCBs in the sediments of high Arctic fjords, Svalbard. *Mar Pollut Bull.* 2022 Jan 4;174:113277. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.113277.
- [55] Degrendele C., Okonski K., Melymuk L., Landlová L., Kukučka P., Čupr P., Klánová J. Size specific distribution of the atmospheric particulate PCDD/Fs, dl-PCBs and PAHs on a seasonal scale: Implications for cancer risks from inhalation. *Atmospheric Environment Volume 98*, December 2014, Pages 410-416.
- [56] Zagolin L., Marson G., Patti S. Livelli di tossicità di diossine, furani e PCB dioxin like in aria ambiente nel Veneto. October 2018. *Ingegneria dell'Ambiente* 5(3):187 DOI:10.32024/ida.v5i3.p03.
- [57] Settimo, G.; Soggiu, M.E.; Inglessis, M.; Marsili, G.; Avino, P. Persistent Organic Pollutants and Metals in Atmospheric Deposition Rates around the Port-Industrial Area of Civitavecchia, Italy. *Appl. Sci.* 2021, 11, 1827. <https://doi.org/10.3390/app11041827>.
- [58] Turrio-Baldassarri, L.; Battistelli, C.A.; di Domenico, A.; Iamiceli, A.L.; Iacovella, N.; Mazzoli, P.; Settimo, G.; Viviano, G. A study on PCDD and PCDF contamination in a case of public concern. *Organohalogen Compd.* 2002, 59, 181–184.
- [59] Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione dell'Ambiente Valle d'Aosta (ARPAVDA). Monitoraggio delle Deposizioni Atmosferiche—Periodo 2010; ARPA VDA, Air Laboratory: Saint-Christophe, Italy, 2010. Available online: https://www.arpa.vda.it/images/stories/ARPA/aria/datiQA/deposimetri/relazione_deposimetri_2010.pdf

- [60] Rossini, P.; Guerzoni, S.; Molinaroli, E.; Rampazzo, G.; De Lazzari, A.; Zancanaro, A. Atmospheric bulk deposition to the lagoon of Venice part I. Fluxes of metals, nutrients and organic contaminants. *Environ. Int.* 2005, 31, 959–974.
- [61] Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione dell’Ambiente Umbria (ARPA Umbria). *Qualità dell’Aria in Umbria: Valutazioni e Analisi di Microinquinanti*; ARPA Umbria: Terni, Italy, 2015. Available online: <https://www.arpa.umbria.it/MC-API/Risorse/StreamRisorsa.aspx?guid=6497cd9c-7cfa-4e82-85cf-e30d0c6fbfec>
- [62] Menichini, E.; Barbera, S.; Merli, F.; Settimo, G.; Viviano, G. Atmospheric bulk deposition of carcinogenic PAHs in a rural area in southern Italy. *Polycycl. Aromat. Compd.* 2006, 26, 253–263.
- [63] Settimo, G.; Viviano, G. Atmospheric depositions of persistent pollutants: Methodological aspects and values from case studies. *Ann. Ist. Super. Sanità* 2015, 51, 298–304.
- [64] Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione dell’Ambiente Puglia (ARPA Puglia). *Il Monitoraggio della Qualità dell’Aria Taranto; Aggiornamento all’Anno 2019 (2008–2019)*; ARPA Puglia, Dap Taranto Servizi Territoriali Polo Microinquinanti Organici: Taranto, Italy, 2019. Available online: http://www.arpa.puglia.it/c/document_library/getfile?uuid=5e6a8e07-73ce-41d5-84c3-f6400a5bdea6&groupId=13883
- [65] Korhonen, M.; Kiviranta, A.; Ketola, R. Bulk deposition of PAHs, PCBs and HCHs in Finland in summer seasons 1993–1996. *Toxicol. Environ. Chem.* 1998, 66, 37–45.
- [66] OSPAR Commission. Pilot Study and Intercomparison Exercise on Atmospheric Inputs of PAHs. Available online: <https://www.ospar.org/documents?v=6925> (accessed on 18 February 2021).
- [67] Ollivon, D.; Blanchoud, H.; Motelay-Massei, A.; Garban, B. Atmospheric deposition of PAHs to an urban site, Paris, France. *Atmos. Environ.* 2002, 36, 2891–2900.
- [68] Garban, B.; Blanchoud, H.; Motelay-Massei, A.; Chevreuil, M.; Ollivon, D. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: Trends from urban to remote sites. *Atmos. Environ.* 2002, 36, 5395–5403.
- [69] Fiedler, H.; Buckley-Golder, D.; Coleman, P.; King, K.; Petersen, A. Compilation of EU dioxin exposure and health data: Environmental levels. *Organohalogen Compd.* 1999, 43, 141–144.

- [70] Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione dell’Ambiente Valle d’Aosta (ARPAVDA). Risultati della Campagna di Monitoraggio delle Deposizioni Atmosferiche Totali Condotta nel Periodo Giugno 2006–Luglio 2007; ARPA VDA, Air Laboratory: Saint-Christophe, Italy, 2008. Available online: https://www.arpa.vda.it/images/stories/ARPA/aria/datiQA/deposimetri/relazione_deposimetri_2006_2007.pdf
- [71] Bove, B.; Cattani, G.; Cusano, M.C.; De Luca, S.; Dellatte, E.; di Domenico, A.; Fochi, I.; Fulgenzi, A.R.; Iacovella, N.; Inglessis, M.; et al. PCDD, PCDF, and PCB baseline levels in air near a waste incineration plant site in southern Italy. *Organohalogen Compd.* 2005, 67, 2083–2085.
- [72] Desmedt, M.; Roekens, E. New policy in Flanders to link environmental levels of PCDD/F and dioxin-like PCBs to health. *Organohalogen Compd.* 2011, 73, 2042–2045.
- [73] Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. Literaturstudie zur Ermittlung des Depositionswertes von Dioxinen, Furanen und Dioxinähnlichen PCB; Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg: Karlsruhe, Germany, 2004; Available online: <http://www4.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/14558/>
- [74] Kirchner, M.; Freie, K.P.; Denner, M.; Ratz, G.; Jakobi, G.; Korner, W.; Ludewig, E.; Schaub, M.; Schramm, K.-W.; Weiss, P.; et al. Air concentrations and deposition of chlorinated dioxins and furans (PCDD/F) at three high alpine monitoring stations: Trends and dependence on air masses. *Atmos. Environ.* 2020, 223, 117199.
- [75] Vikelsoe, J.; Hovmand, M.; Andersen, H.V. PCDD/F in deposition, spruce throughfall and air in Denmark. *Organohalogen Compd.* 2003, 61, 454–457.
- [76] Oxbol, A.; Schleicher, O.; Fuglsang, K.; Jensen, A.A.; Borg-Jensen, K.; Schilling, B. Dioxin deposition around a danish municipal incinerator. *Organohalogen Compd.* 2002, 57, 369–372.
- [77] Air Rhône-Alpes. Programme de Suiveillance des Dioxines, Furanes, & Metaux Lourds. 2015. Available online: https://www.atmo-uvergnerhonealpes.fr/sites/ra/files/atoms/files/surveillancedioxines_metaux_lourds-synthese_2013-2014.pdf
- [78] Caserini, S., Cernuschi, S., Giugliano, M., Grosso, M., Lonati, G., Mattaini, P., 2004. Air and soil dioxin levels at three sites in Italy in proximity to MSW incineration plants. *Chemosphere* 54 (9), 1279–1287.

- [79] Sharifah Mazrah Sayed Mohamed Zain, Mohd Talib Latif, Nor Hafizah Baharudin, Zurahanim Fasha Anual, Norfazrin Mohd Hanif, Md Firoz Khan. Atmospheric PCDDs/PCDFs levels and occurrences in Southeast Asia: A review. *Science of the Total Environment* 783 (2021) 146929.
- [80] ARPA Lombardia – Maggio 2020. Basi tecniche per la definizione delle azioni di ARPA Lombardia durante eventi emergenziali relativi a incendi. https://www.snambiente.it/wp-content/uploads/2020/07/LG-INCENDI_ARPA_LOMBARDIA.pdf
- [81] Menichini E., Iacovella N., Monfredini F., Turrio-Baldassarri L. Atmospheric pollution by PAHs, PCDD/Fs and PCBs simultaneously collected at a regional background site in central Italy and at an urban site in Rome. *Chemosphere* 69 (2007) 422–434.
- [82] ARPAV, Dicembre 2009. Microinquinanti Organici in provincial di Venezia – Livelli in aria ambiente ed emissioni in atmosfera. https://www.arpa.veneto.it/arpav/chi-e-arpav/file-e-allegati/dap-venezias/aria/Indagine_diossine.pdf/view
- [83] ISPRA. DIOSSINE, FURANI E POLICLOROBIFENILI Indagine ambientale nella Regione Campania. Quaderni - Laboratorio 1/2012.
- [84] Schecter A., Birnbaum L., Ryan J. J., Constable J. D. Dioxins: An overview. *Environmental Research - Volume 101, Issue 3, July 2006, Pages 419-428.*
- [85] Caserini, S., Cernuschi, S., Giugliano, M., Grosso, M., Lonati, G., Mattaini, P., 2004. Air and soil dioxin levels at three sites in Italy in proximity to MSW incineration plants. *Chemosphere* 54 (9), 1279–1287.
- [86] López A., Coscollà C., Hernández C. S., Pardo O., Yusà V. Dioxins and dioxin-like PCBs in the ambient air of the Valencian Region (Spain): Levels, human exposure, and risk assessment. *Chemosphere*. 2021 Mar;267:128902. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128902. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33189398.
- [87] Trinh MM, Tsai CL, Hien TT, Thuan NT, Chi KH, Lien CG, Chang MB. Atmospheric concentrations and gas-particle partitioning of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs around Hochiminh city. *Chemosphere*. 2018 Jul;202:246-254. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.087. Epub 2018 Mar 16. PMID: 29571145.
- [88] Wang MS, Chen SJ, Huang KL, Lai YC, Chang-Chien GP, Tsai JH, Lin WY, Chang KC, Lee JT. Determination of levels of persistent organic pollutants (PCDD/Fs, PBDD/Fs, PBDEs, PCBs, and PBBs) in atmosphere near a municipal solid waste

incinerator. *Chemosphere*. 2010 Aug;80(10):1220-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.007. Epub 2010 Jul 2. PMID: 20598339.

- [89] De Vos J., Gorst-Allman P., Rohwer E. Establishing an alternative method for the quantitative analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by comprehensive two dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for developing countries. *J Chromatogr A*. 2011 May 27;1218(21):3282-90. doi: 10.1016/j.chroma.2011.03.050. Epub 2011 Apr 12. PMID: 21489545.
- [90] Pongpiachan, S., Wiriwutikorn, T., Phetsomphou, P., Jieam, K., Vongxay, K., Choviran, K., Sbrilli, A., Gobbi, M., Centeno, C., 2019. Data relating to emissions of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from industrial boilers. *Data in Brief* 22, 286–295.
- [91] ACCREDIA. Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova. RT – 08 Revisione 5 del 15-12-2021. <https://www.accredia.it/app/uploads/2021/12/RT-08-rev.05-Prescrizioni-per-laccreditamento-dei-laboratori-di-prova.pdf>
- [92] Report by an EC Working Group on Guidance for the Demonstration of Equivalence. January 2010. Guide to the demonstration of equivalence of ambient air monitoring methods.
- [93] Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Second Edition. Compendium Method TO-9A - Determination Of Polychlorinated, Polybrominated And Brominated/Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins And Dibenzofurans In Ambient Air. Center for Environmental Research Information Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, OH 45268 January 1999.
- [94] Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Second Edition. Method TO-4A: Determination of Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Ambient Air Using High Volume Polyurethane Foam (PUF) Sampling Followed by Gas Chromatographic/Multi-Detector Detection (GC/MD). Center for Environmental Research Information Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, OH 45268 January 1999.
- [95] Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Second Edition. Method TO-13A: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass

Spectrometry (GC/MS). Center for Environmental Research Information Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, OH 45268 January 1999.

- [96] Risoluti R., Gullifa G., Battistini A., Materazzi S., "Lab-on-Click" Detection of Illicit Drugs in Oral Fluids by MicroNIR-Chemometrics, *Analytical Chemistry* 91,2019: 6435-6439;][Correia R., Tosato F., Domingos E., Rodrigues R.T.R., Aquino L.F. M., Filgueiras P.R., Lacerda Jr. V., Romão W., Portable near infrared spectroscopy applied to quality control of Brazilian coffee, *Talanta* 176,2018: 59-68;]
- [97] Aodhagan O' Reilly, Rory Coffey, Aoife Gowen & Enda Cummins (2015) Evaluation of near-infrared chemical imaging for the prediction of surface water quality parameters, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95:5, 403-418, DOI: 10.1080/03067319.2015.1025222
- [98] Gowen A. A., Tsuchisaka Y., O'Donnell C., Tsenkova R. Investigation of the Potential of Near Infrared Spectroscopy for the Detection and Quantification of Pesticides in Aqueous Solution. *American Journal of Analytical Chemistry*, Vol.2 No.8A, 2011.
- [99] Maria de Fátima. Development of analytical methods in nir spectroscopy for the characterization of sludge from wastewater treatment plants for agricultural use. Centro de Engenharia Biológica e Química, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal.
- [100] Valeria Ancona V., Leone N., Galeone C., Uricchio V. F., Leone A. P., Corbelli V. Applicazione della spettroscopia vis-NIR per la predizione del contenuto di metalli pesanti nei suoli: il caso studio dell'Area di Crisi Ambientale di Taranto. June 2020. Conference: Hub tecnologica Campania - Remtech Expo· At: Napoli · Volume: *Il contributo dell'innovazione scientifica ed amministrativa verso la riforma del settore delle bonifiche*.
- [101] Galeone C., Ancona V., Bagnuolo C., Leone N. Potential of vis-NIR reflectance spectroscopy for the prediction of soil PCBs content in a historically contaminated site of the SIN of Taranto (Southern Italy). September 2019. DOI:10.13140/RG.2.2.14640.51203. Conference: Soil and Plant System Sciences (SPSS 2019).
- [102] Haruna Gado Yakubu, Zoltan Kovacs, Tamas Toth & George Bazar (2020) The recent advances of near-infrared spectroscopy in dairy production—a review,

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI:
10.1080/10408398.2020.1829540.

- [103] Geladi P., Kowalski B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* Volume 185, 1986, Pages 1-17.