UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ED INNOVAZIONE TECNOLOGICA

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Metodo accurato e robusto per l'analisi GC-MS del volatiloma di piante

Relatrice:

Prof.ssa Valentina Gianotti

Correlatore:

Emilio Guerrieri, PhD

Candidata:

Marysol Ferretti

Anno Accademico 2024 -2025

Indice

Introduzione …… 2

Obbiettivi del lavoro …… 7

Sezione teorica …… 13

1. Stato dell'arte …… 14
2. Contesto teorico …… 19

2.1 Analiti …… 19
2.2 Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa …… 31
2.3 Validazione del metodo analitico …… 37

Bibliografia …… 41

Sezione sperimentale …… 44

1. Materiali e metodi …… 45

1.1 Materiali …… 45
1.2 Metodi …… 46

2. Risulti e discussione …… 53

Bibliografia …… 67

Conclusioni e prospettive future …… 69

INTRODUZIONE

Le piante rappresentano uno dei sistemi biologici più complessi dal punto di vista biochimico e metabolico. La loro natura sessile le ha costrette, nel corso dell'evoluzione, a sviluppare un insieme estremamente articolato di vie metaboliche e strategie di comunicazione con l'ambiente biotico e abiotico circostante. La capacità di adattarsi a condizioni mutevoli e di difendersi da erbivori, patogeni e stress ambientali è strettamente connessa alla diversità metabolica e alla trasmissione di segnali chimici a breve e lunga distanza (1).

Dal punto di vista metabolico, le piante sintetizzano una gamma di composti straordinariamente ampia: si stima che l'intero regno vegetale produca da 100.000 a oltre 1.000.000 di metaboliti distinti. Tale diversità supera di gran lunga quella osservata nella maggior parte degli altri organismi e riflette un'evoluzione molecolare guidata da duplicazioni e perdite geniche, variazioni strutturali del genoma e selezione naturale, ma anche da pressioni antropiche legate alla domesticazione delle specie coltivate. Ciascuna specie produce solo un sottoinsieme di metaboliti, variabile sia in senso qualitativo che quantitativo. I metaboliti primari – come zuccheri, aminoacidi e acidi organici – sono essenziali per crescita e sviluppo, mentre i metaboliti secondari, o specializzati, rivestono un ruolo centrale nelle interazioni ecologiche, in particolare nella difesa da erbivori e patogeni e nella tolleranza agli stress ambientali (2).

Un aspetto cruciale, accanto alla produzione di metaboliti, è la capacità delle piante di comunicare, che può avvenire con due modalità principali: aerea o sotterranea (3,4). La comunicazione sotterranea delle piante si basa principalmente sulla segnalazione chimica attraverso gli essudati radicali, una vasta gamma di composti organici, tra cui metaboliti secondari e molecole di segnalazione, che vengono rilasciati dalle piante nella rizosfera, la zona influenzata chimicamente, biologicamente e fisicamente dalla crescita e dall'attività delle radici (4). Oltre agli essudati solubili, è stato dimostrato che anche le radici possono rilasciare composti organici volatili (root VOCs), benché la loro natura e rilevanza ecologica siano ancora poco conosciute. Un caso

emblematico è quello del mais: le radici danneggiate dalle larve del coleottero *Diabrotica virgifera virgifera* emettono il sesquiterpene (E)-β-cariofillene, che attira i nematodi entomopatogeni *Heterorhabditis megidis*, migliorando l'efficacia della difesa indiretta belowground (5). Questo lavoro ha rappresentato la prima identificazione di un segnale volatile sotterraneo indotto dall'attacco di un erbivoro e ha aperto la strada allo studio del ruolo dei VOC radicali nelle interazioni multitrofiche. Attualmente non sappiamo quanti e quali VOC vengano rilasciati in modo sistematico dalle radici delle diverse specie vegetali, né se tali segnali possano dominare o integrarsi con altri mediatori chimici della rizosfera, ma è verosimile che rappresentino una componente significativa e finora sottostimata delle reti di comunicazione sotterranea. Parallelamente, i funghi micorrizici arbuscolari formano vaste reti miceliari comuni, collegano tra loro piante conspecifiche vicine facilitando lo scambio di nutrienti come fosforo e azoto, e trasmettono segnali sistemici legati a stress biotici e abiotici. Il trasferimento bidirezionale di acqua, nutrienti, metaboliti secondari, ormoni, RNA messaggeri e proteine avviene anche nelle associazioni parassitiche attraverso gli austori ed il micelio sotterraneo che collega più individui vegetali (6) con effetti diretti sia sulla fisiologia sia dell'ospite che del parassita.

Rispetto alla comunicazione radicale, la comunicazione aerea avviene invece quasi esclusivamente tramite l'emissione VOC di un complesso di composti organici volatili (volatile organic compounds, VOCs) prodotti dalle piante e fiori, definito volatiloma, che rappresenta una componente essenziale della loro ecologia chimica e costituisce un'estensione dinamica del metabolismo secondario. Esso comprende una vasta gamma di molecole a basso peso molecolare, lipofile e altamente reattive, provenienti da vie biosintetiche differenti (Figura 1) – tra cui la via del mevalonato (MVA), la via del metileritritolo fosfato (MEP) e la lipossigenasi (LOX) e dello shikimato (o PAL) – e caratterizzate da un'elevata plasticità fenotipica e variabilità genotipica. Il risultato è un bouquet chimico composito che riflette lo stato fisiologico della pianta e la sua interazione con l'ambiente circostante. Il volatiloma, infatti, non

è una semplice emanazione metabolica, ma un vero e proprio linguaggio chimico che consente alle piante di interagire con organismi benefici o dannosi, oltre che con piante conspecifiche o eterospecifiche.

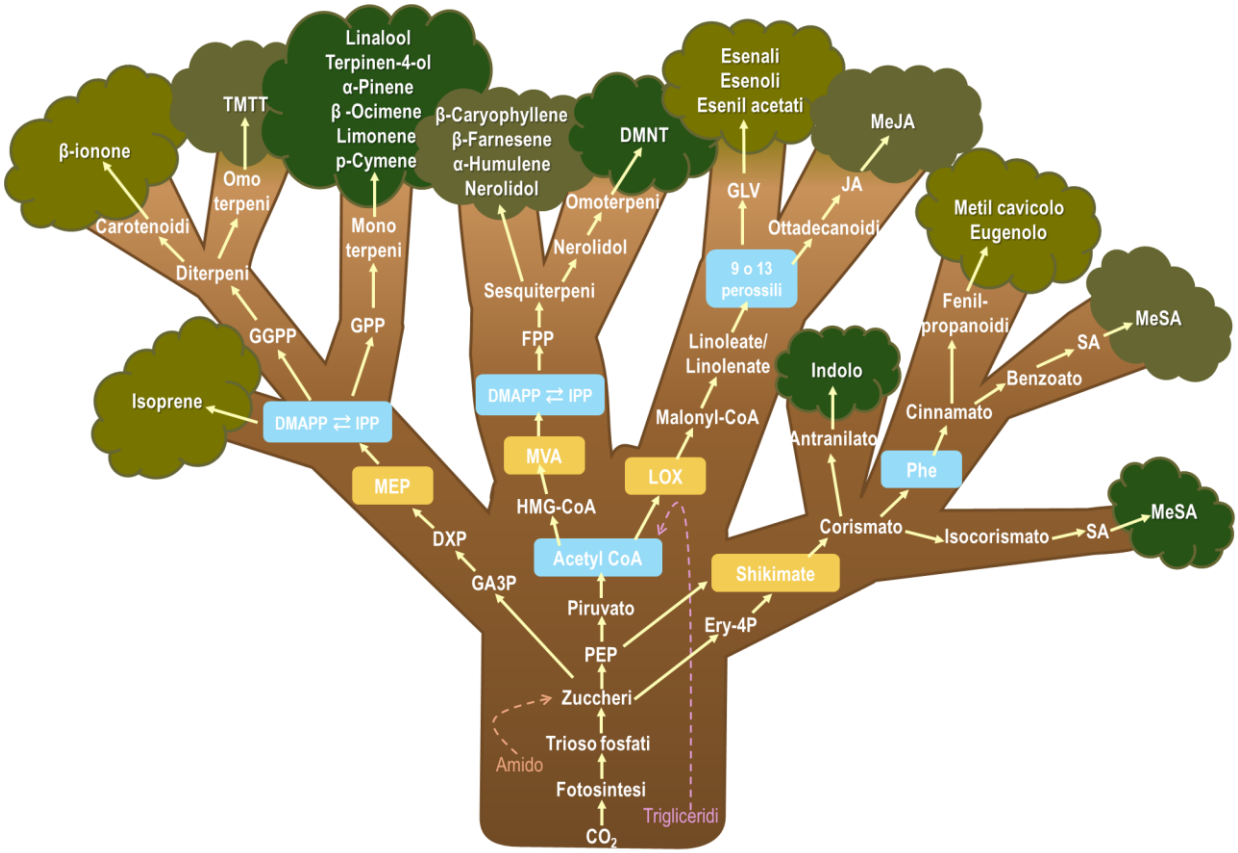


Figura 1. Albero delle vie biosintetiche dei composti organici volatili nelle piante (significato sigle: DMAPP dimetilallil pirofosfato, IPP isopentenil pirofosfato, MEP metieritritolo fosfato, DXP 1-deoss-D-xilulosio-5-fosfato, GA3P gliceraldeide-3-fosfato, PEP fosfoenolpiruvato, MVA mevalonato, HMG-CoA 3-idrossi-3-metilglutaril coeanzima A, GGPP geranilgeranil pirofosfato, GPP geranil pirofosfato, FPP farnesil pirofosfato, LOX lipossigenasi, GLV green leaf volatiles, JA acido jasmonico, MeJA metil jasmonato, Ery-4P eritrosio-4-fosfato, Phe fenilalanina, SA acido salicilico, MeSA metil salicilato)

Dal punto di vista funzionale, i VOCs svolgono un ruolo centrale in processi ecologici fondamentali: attraggono impollinatori e dispersori di semi, mediano la comunicazione tra individui della stessa specie o tra specie differenti, regolano interazioni simbiotiche con microrganismi benefici e partecipano a complesse reti di segnalazione all'interno della comunità vegetale. A queste funzioni "cooperative" si affiancano però attività difensive altrettanto

importanti. I VOCs possono essere emessi in modo costitutivo, contribuendo alla definizione del profilo chimico della specie o varietà, oppure in modo indotto, in seguito a stimoli ambientali. Nel primo caso, i composti rappresentano una sorta di firma metabolica stabile, potenzialmente utile a scoraggiare fitofagi generalisti; nel secondo, la loro biosintesi viene rapidamente attivata da segnali di pericolo quali l'attacco di insetti erbivori, le infezioni microbiche o condizioni di stress abiotico come siccità, alte temperature o esposizione a ozono troposferico (7).

Considerando le strategie difensive, il volatiloma contribuisce con due strategie principali: difesa diretta e difesa indiretta. Le difese dirette derivano dall'attività tossica, deterrente o antimicrobica dei composti stessi nei confronti di erbivori e patogeni. Ad esempio, aldeidi e alcoli a sei atomi di carbonio, noti come *green leaf volatiles*, sono prodotti immediatamente in seguito a danno tissutale e hanno un effetto repellente sugli insetti fitofagi, oltre a ostacolare la proliferazione di microrganismi patogeni. Le difese indirette, invece, si basano sull'attrazione di nemici naturali degli insetti dannosi, come parassitoidi e predatori, che percepiscono i VOCs come segnali di disponibilità di ospiti o prede (8). È il caso dell'emissione di (E)-β-cariofillene dalle radici di mais danneggiate da larve di coleotteri, che richiama nematodi entomopatogeni, o della produzione di omoterpeni come TMTT e DMNT, capaci di attrarre predatori di afidi e tripidi (7). La funzione difensiva del volatiloma si estende anche alla modulazione della suscettibilità varietale. Differenze qualitative e quantitative nei profili volatili tra genotipi di una stessa specie possono tradursi in una diversa efficacia nell'interazione con patogeni e vettori. Nell'olivo, ad esempio, specifiche combinazioni di terpeni e alcoli hanno mostrato effetti attrattivi o repellenti verso *Philaenus spumarius*, il principale vettore di *Xylella fastidiosa*, suggerendo che il bouquet volatiloide possa costituire una barriera preventiva all'infezione. Inoltre, il rilascio di alcuni VOCs, come limonene, cis-3-esenolo o canfora, è stato associato a una ridotta preferenza degli insetti vettori e quindi a una minore probabilità di trasmissione del patogeno (9).

Un ulteriore aspetto di grande interesse è rappresentato dalla modulazione del volatiloma da parte dei trattamenti colturali e delle condizioni fisiologiche della pianta. È stato dimostrato che diversi stimoli biotici e abiotici, come danno meccanico, infezioni, ma anche pratiche agronomiche, possano alterare in modo significativo la qualità e la quantità dei VOCs emessi. Ad esempio, in *Juglans regia* (noce) è stato osservato che i profili volatili di foglie e corteccia differiscono sensibilmente e che la concentrazione relativa di terpeni e alcoli varia in funzione delle condizioni ambientali e dello stato fisiologico della pianta, influenzando così la risposta degli insetti fitofagi (10). Analogamente, studi su colture arboree e fruttifere hanno mostrato che diversi trattamenti possono indurre l'emissione di specifici composti: nelle arance, ad esempio, infestazioni da larve del dittero *Ceratitis capitata*, residui dell'attività larvale, infezioni fungine o la sovramaturazione del frutto portano a profili volatili distinti, caratterizzati dall'aumento di composti come limonene, acetofenone, linalolo, nonanale, decanale ed eugenolo, che risultano altamente attrattivi per i parassitoidi della mosca come *Diachasmimorpha longicaudata* (11). In un'ottica ancora più integrata, anche i microorganismi simbionti radicali — come le micorrize o i funghi del genere *Trichoderma* — sono in grado di influenzare il profilo volatile della pianta ospite, suggerendo che la comunicazione "sottosuolo–soprasuolo" sia mediata da scambi metabolici reciproci (12). Questi dati indicano che il volatiloma non è qualcosa di statico, ma piuttosto un sistema dinamico fortemente condizionato dalle pratiche di gestione e dalle pressioni ambientali, con ricadute dirette sia sull'ecologia chimica della pianta che sul suo stato sanitario.

Nel complesso, il volatiloma si configura come un sistema multifunzionale, in grado di integrare esigenze fisiologiche, comunicative e difensive della pianta. La sua plasticità consente una risposta rapida e adattativa alle sfide ambientali, modulando le interazioni trofiche e la resilienza dell'organismo vegetale in ecosistemi complessi. Comprendere le dinamiche del volatiloma non solo arricchisce la conoscenza dei meccanismi di difesa delle piante, ma offre anche

prospettive applicative in ambito agronomico e biotecnologico, ad esempio nello sviluppo di strategie di protezione delle colture basate sulla manipolazione e sull'uso diretto dei composti volatili.

Obbiettivi del progetto

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum L.*) rappresenta una delle colture orticole di maggior rilievo a livello globale, sia per il consumo fresco, sia per l'industria di trasformazione. La produzione mondiale si attesta su oltre cento milioni di tonnellate annue, distribuite su milioni di ettari, con una notevole importanza economica e alimentare. Dal punto di vista sistematico appartiene alla famiglia delle *Solanaceae*, che include altre colture di primaria importanza come patata, peperone, melanzana e tabacco, caratterizzate da un'elevata diversità morfologica e biochimica. Il pomodoro è una pianta erbacea perenne nei climi di origine, ma comunemente coltivata come annuale nelle regioni temperate. Presenta un apparato radicale fascicolato che si sviluppa prevalentemente nei primi 60–70 cm di suolo, fusti e foglie ricoperti di tricomi ghiandolari che secernono sostanze volatili responsabili del tipico odore "di pomodoro", fiori gialli autofecondanti e frutti carnosi, botanicamente classificabili come bacche, ricchi in acqua, zuccheri, acidi organici, pigmenti e vitamine (Figura 2).



Figura 2. La pianta di pomodoro (12)

La lunga storia di domesticazione e miglioramento genetico ha portato alla selezione di un'ampia gamma di cultivar differenziate per forma, dimensione, resa, resistenza a patogeni e adattamento a diversi ambienti di coltivazione. Il pomodoro, inoltre, ha assunto un ruolo centrale come pianta modello per studi di genetica e genomica: grazie al suo genoma relativamente compatto e facilmente manipolabile, è stato impiegato per indagare i meccanismi di regolazione genica, le basi molecolari della resistenza a stress biotici e abiotici e i processi di maturazione del frutto (13).

Accanto alla sua importanza agronomica e scientifica, il pomodoro è anche una delle colture maggiormente esposte a danni da insetti fitofagi. Tra questi, la tignola del pomodoro *Phthorimaea (P. absoluta* (Meyrick, Lepidoptera: Gelechiidae) rappresenta oggi il parassita chiave a livello mondiale (Figura 3). Originaria del Sud America, la specie si è rapidamente diffusa in Europa, Africa, Medio Oriente e Asia, assumendo un ruolo di grave emergenza fitosanitaria. Le larve di *P. absoluta* penetrano all'interno delle foglie, scavando gallerie (mine) che riducono la superficie fotosintetica; attaccano inoltre fusti e frutti, causando cali produttivi che possono raggiungere il 100% in assenza di misure di controllo. Il danno diretto è aggravato da quello indiretto: le lesioni favoriscono l'ingresso di patogeni opportunisti e compromettono la qualità merceologica dei frutti.



Figura 3. Larva matura di Phthorimaea absoluta su foglia pomodoro (14)

La gestione tradizionale dell'insetto si è basata principalmente su trattamenti insetticidi, ma questa strategia mostra evidenti limiti. Le larve, infatti, si sviluppano protette all'interno dei tessuti vegetali, riducendo l'efficacia dei trattamenti. Inoltre, l'uso intensivo e spesso non razionale di prodotti chimici ha favorito l'evoluzione di ceppi resistenti a molteplici classi di insetticidi, inclusi piretroidi, organofosfati e diamidi. Di conseguenza, negli ultimi anni si è resa sempre più necessaria l'adozione di strategie di lotta integrata (IPM, Integrated Pest Management), che combinano pratiche agronomiche (rotazioni

colturali, eliminazione dei residui infestati), mezzi di controllo fisico (reti, trappole), controllo biologico e un uso più mirato e sostenibile dei prodotti di sintesi (15).

Tra gli approcci innovativi di difesa, il controllo biologico mediante parassitoidi riveste un ruolo di crescente interesse. In particolare, i parassitoidi oofagi del genere *Trichogramma* hanno dimostrato un'elevata efficacia contro *P. absoluta*. Questi imenotteri depongono le proprie uova all'interno delle uova dell'insetto ospite, impedendo lo sviluppo della larva e interrompendo così il ciclo vitale del fitofago. Tra le specie più promettenti, *Trichogramma achaeae* (Figura 4) è stato ampiamente studiato e viene già commercializzato per i rilasci in serra, mostrando buoni risultati nel contenimento delle popolazioni della tignola.



Figura 4. Trichogramma achaeae in atto di parassitizzare un uovo di P. absoluta (16)

La capacità dei parassitoidi di localizzare l'ospite si fonda su un sofisticato meccanismo di percezione dei segnali chimici (semiochemicals). Questi possono avere origine sia dall'insetto fitofago (ad esempio, i feromoni sessuali rilasciati dagli adulti) sia dalla pianta stessa, che in seguito a danno da alimentazione larvale modifica il proprio profilo di emissione di composti organici volatili. Si parla in questo caso di HIPVs (herbivore-induced plant volatiles), ovvero VOCs rilasciati in risposta all'attacco di erbivori, che agiscono come "segnali di soccorso" capaci di attrarre predatori e parassitoidi. Dal punto di vista chimico-ecologico, ogni pianta è caratterizzata da un profilo di

emissione basale di composti organici volatili, derivanti dal metabolismo primario e secondario. In seguito a un'infestazione da parte di fitofagi, tale profilo subisce modificazioni qualitative e quantitative, con la comparsa o l'incremento di specifici composti diagnostici, come limonene, α-pinene, β-phellandrene e metilsalicilato. Strumenti analitici come la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC–MS) consentono di identificare e quantificare questi composti, permettendo di associare specifici cambiamenti del volatiloma all'attacco di *T. absoluta*. I parassitoidi, a loro volta, sono in grado di discriminare tra piante sane e infestate proprio grazie a queste variazioni del profilo chimico, migliorando così l'efficienza di ricerca dell'ospite (17).

In questo contesto si colloca il presente lavoro (schematizzato in Figura 5), che si propone di indagare le variazioni nel volatiloma del pomodoro in condizioni sperimentali differenti, con particolare attenzione al confronto tra piante colonizzate e non dal simbionte radicale *Trichoderma*. L'obiettivo è quello di identificare e quantificare un set di composti selezionati tra i VOCs emessi, al fine di valutare se l'interazione con il parassitoide si rifletta in modificazioni chimiche apprezzabili.

Per studiare tali dinamiche è necessario disporre di strumenti analitici in grado di fornire dati quantitativi affidabili sui VOCs emessi. La gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC–MS) rappresenta la tecnica di elezione per questo tipo di studi, in virtù della sua sensibilità, specificità e capacità di separare e identificare miscele complesse di composti a basse concentrazioni. Tuttavia, la sola disponibilità della strumentazione non garantisce risultati solidi: in un ambito come quello del volatiloma vegetale, in cui piccole variazioni nella composizione possono avere conseguenze ecologiche significative, è indispensabile che il metodo impiegato sia sottoposto a un processo rigoroso di ottimizzazione e validazione. Validare un metodo analitico significa dimostrarne l'accuratezza, la precisione, la linearità e la robustezza, assicurando che le differenze osservate nei profili volatili siano realmente

attribuibili a condizioni biologiche differenti e non a fluttuazioni strumentali o a errori di campionamento. In questo senso, la validazione non rappresenta un aspetto accessorio, ma costituisce il fondamento che rende i dati prodotti comparabili e interpretabili, consentendo di trarre conclusioni solide sulle relazioni tra pianta, fitofago e parassitoide. L'attenzione alla qualità del dato chimico-analitico è quindi parte integrante dello studio delle interazioni biologiche, e permette di colmare il divario tra osservazioni ecologiche e quantificazione sperimentale dei segnali chimici che le mediano.

L'interesse di questa ricerca non risiede solo nell'aspetto metodologico, legato allo sviluppo e alla validazione di un protocollo analitico, ma soprattutto nella possibilità di acquisire nuove conoscenze sulla modulazione del volatiloma del pomodoro e sul ruolo dei VOCs nella mediazione delle interazioni multitrofiche. Comprendere se e in che misura l'attività di un parassitoide influenzi il bouquet volatiloide della pianta può contribuire a chiarire i meccanismi di comunicazione chimica coinvolti nel biocontrollo e suggerire futuri sviluppi in ambito agronomico. In tale prospettiva, lo studio si colloca in una linea di ricerca che integra approcci di ecologia chimica e chimica analitica, con l'obiettivo ultimo di favorire strategie di difesa più sostenibili e rispettose dell'ambiente.

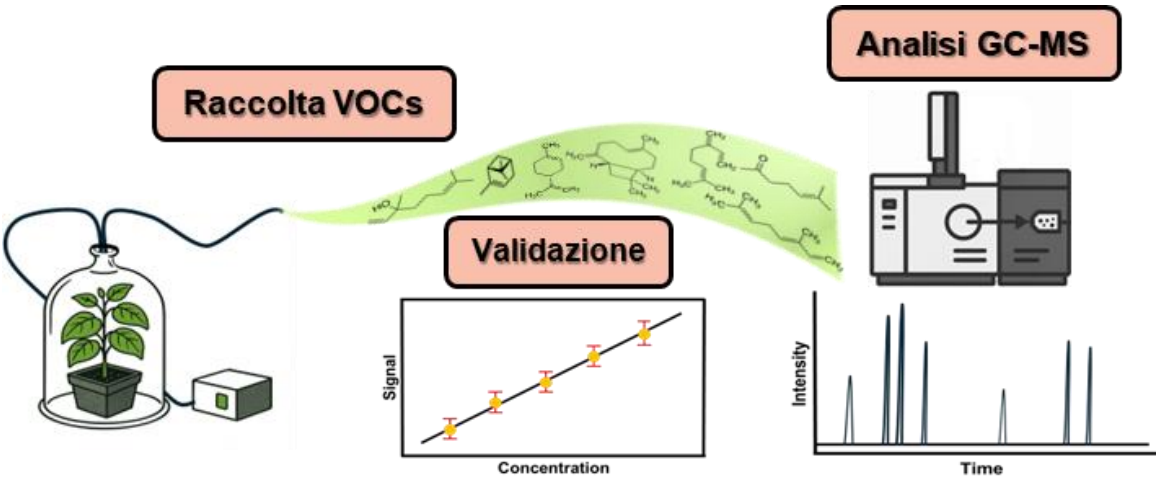


Figura 5. Schematizzazione del progetto

SEZIONE TEORICA

1. STATO DELL'ARTE

L'analisi dei composti organici volatili emessi dalle piante richiede approcci metodologici in grado di affrontare la complessità chimica di questi metaboliti, caratterizzati da concentrazioni molto basse, elevata volatilità, polarità variabile e talvolta notevole reattività. Le fasi cruciali sono il campionamento e la rivelazione analitica, e la loro scelta condiziona profondamente il profilo chimico che si ottiene. Il campionamento (Figura 6) può essere condotto in modalità statica, come nel caso della microestrazione in fase solida (SPME), in cui una fibra rivestita con polimeri adsorbe i volatili presenti nello spazio di testa e li trasferisce poi al gascromatografo mediante desorbimento termico. Questa tecnica è semplice, priva di solventi e adatta ad analisi qualitative e quantitative di composti anche a basse concentrazioni, ma ha una capacità limitata e non consente reiniezioni. Le modalità dinamiche, invece, prevedono il passaggio controllato di aria pulita attraverso una camera di campionamento e la raccolta dei composti su materiali adsorbenti solidi. In questo caso è possibile gestire il volume di aria campionato e ottenere quantità maggiori di analita, ma bisogna prestare attenzione a fenomeni di breakthrough, perdite per reazioni indesiderate o accumulo di acqua (18).

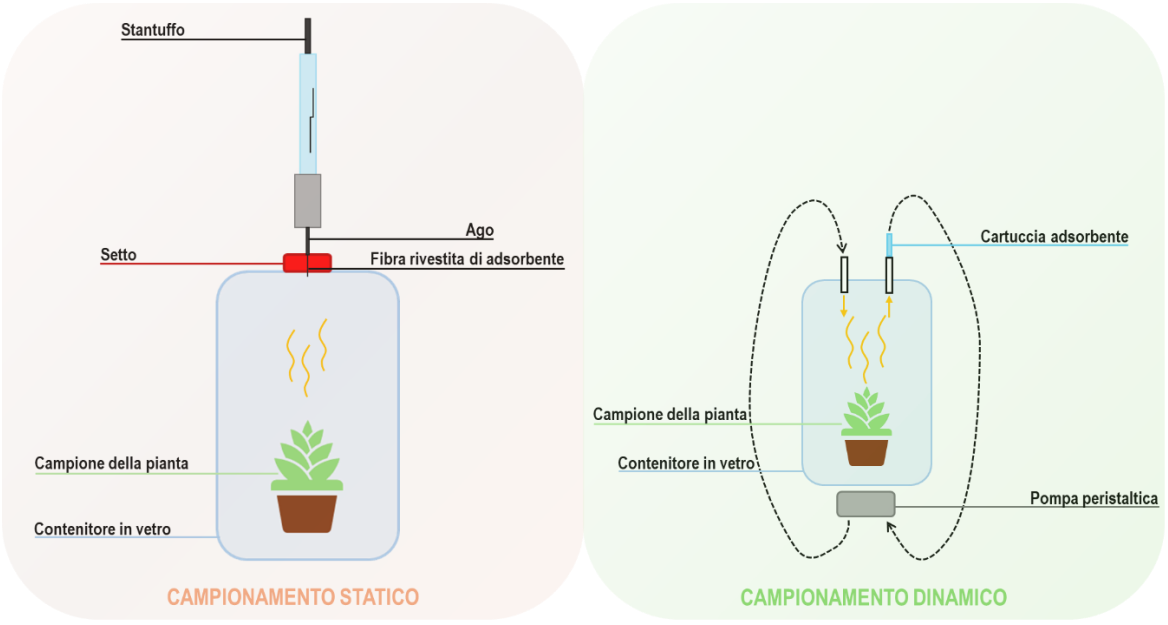


Figura 6. Esempio di campionamento in modalità statica e dinamica

La scelta del sorbent è cruciale: il Tenax® (Poly(2,6-diphenylphenylene oxide)) (Figura X), grazie alla sua stabilità termica e inerzia chimica, è molto usato per idrocarburi e terpeni a media volatilità, ma mostra limiti per composti più leggeri e polari, che possono sfuggire senza essere trattenuti. Il Porapak P (Polystyrene divinylbenzene, copolimer) (Figura 7) ha una capacità di ritenzione più ampia e trattiene anche aldeidi e alcoli, ma risulta più sensibile all'umidità e può introdurre contaminanti se non condizionato adeguatamente (19). In diversi studi, la combinazione di più materiali adsorbenti nello stesso tubo è stata la soluzione per ampliare la finestra di cattura e ridurre le perdite selettive, anche se aumenta la complessità del desorbimento e del trattamento del campione. La letteratura segnala in maniera concorde che la scelta dell'adsorbente determina in modo rilevante quali classi di VOC vengono rappresentate, e quindi influenza direttamente la comparabilità dei dati raccolti con tecniche diverse (20).

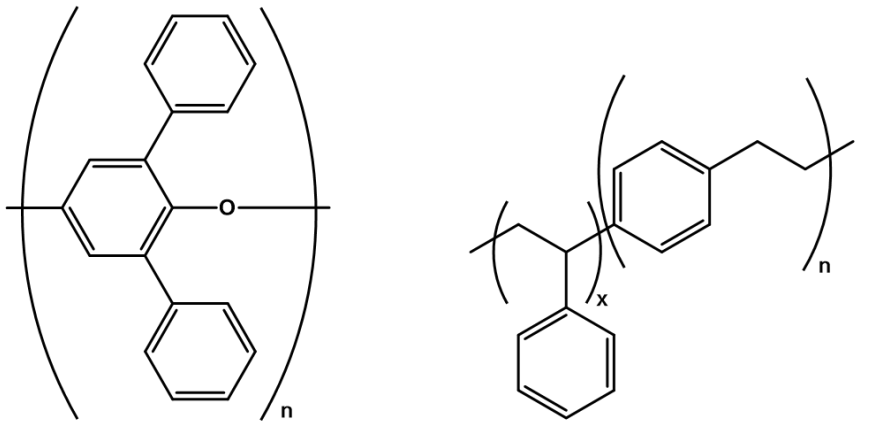


Figura 7. Strutture chimiche di Tenax® e Porapak

Una volta raccolti i composti volatili, l'analisi può essere condotta *offline* o *online*. I metodi *offline* si basano su campioni concentrati che vengono successivamente desorbiti e analizzati in GC, tipicamente con spettrometria di massa (MS) o rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Figura 8).

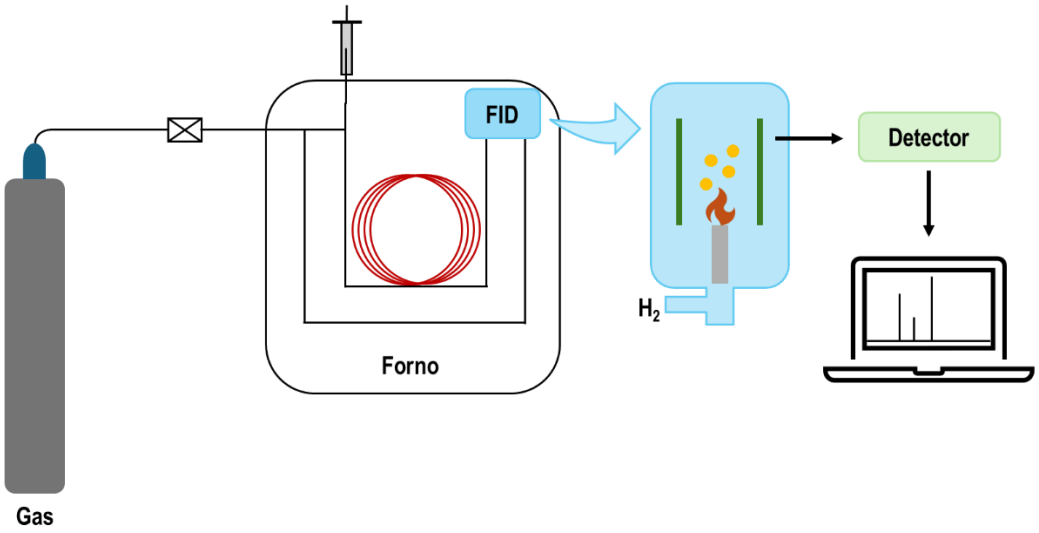


Figura 8. Schematizzazione di un GC-FID

Questo approccio garantisce la massima qualità dei dati per l'identificazione e permette la conferma con librerie di spettri e indici di ritenzione, ma introduce un ritardo temporale e potenziali alterazioni chimiche dei composti durante lo stoccaggio (18). Le tecniche *online*, come la proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS, Figura 9) o la selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), forniscono dati in tempo reale con sensibilità nell'ordine dei ppbv (parti per milione in volume) o anche inferiore e con risoluzione temporale al secondo, rendendo possibile il monitoraggio dinamico delle emissioni vegetali. Tuttavia, queste tecniche non separano gli isomeri e hanno una capacità limitata di identificazione strutturale, per cui il loro uso ottimale è in combinazione con analisi cromatografiche (19). Anche i gascromatografi portatili con rivelatori FID o MS vengono utilizzati per monitoraggi rapidi in campo, pur con prestazioni cromatografiche inferiori rispetto agli strumenti da laboratorio (20).

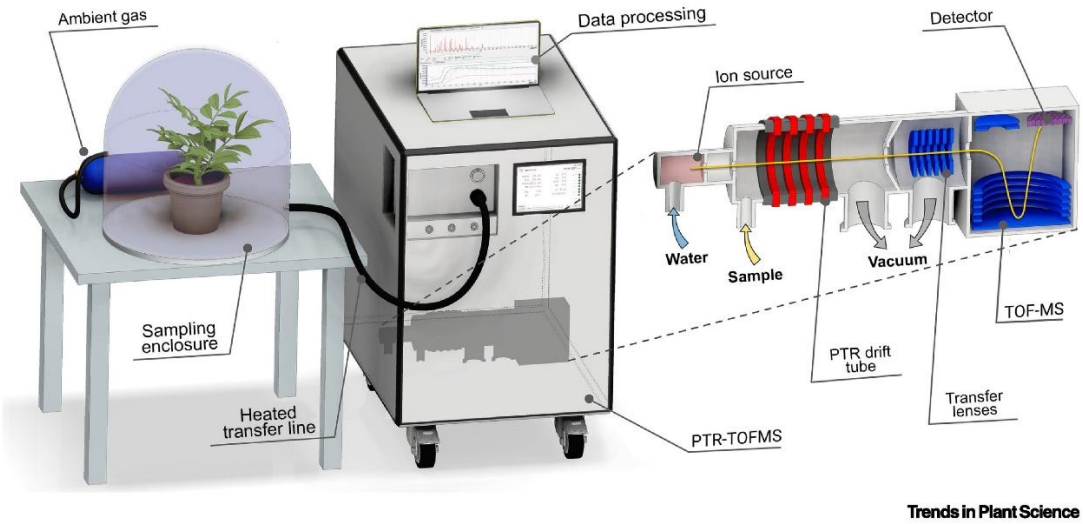


Figura 9. Rappresentazione grafica del PTR-MS (21)

La separazione cromatografica rimane il cuore dell'analisi: colonne capillari a fase apolare sono comunemente usate per idrocarburi e terpeni, mentre fasi polari facilitano la risoluzione di aldeidi e alcoli. In campioni ad elevata complessità, la gascromatografia bidimensionale accoppiata a spettrometria di massa a tempo di volo (GCxGC-TOF-MS) consente di risolvere coeluzioni e distinguere composti isomerici che in GC monodimensionale sarebbero indistinguibili (19).

Per quanto riguarda i rivelatori, la spettrometria di massa rappresenta la scelta più diffusa perché permette identificazione e quantificazione dei VOC, con la possibilità di operare in full scan o in modalità SIM per aumentare la sensibilità su target specifici (18). Tuttavia, la quantificazione può risultare meno robusta in presenza di interferenze di matrice o coeluzioni non completamente risolte. In questi casi il FID costituisce un'alternativa valida: non fornisce informazioni strutturali, ma è caratterizzato da una risposta universale per i composti organici, da un ampio intervallo di linearità e da un'elevata riproducibilità. La sua semplicità e robustezza lo rendono particolarmente adatto alla quantificazione di composti noti per i quali si dispone di standard. Studi comparativi hanno mostrato che, a fronte di una sensibilità inferiore rispetto alla MS per alcuni ossigenati polari, il FID garantisce una maggiore affidabilità nei dati quantitativi, con una risposta meno suscettibile alle variazioni di matrice e

una precisione spesso superiore (20). Non a caso, in molte applicazioni sul volatiloma vegetale viene impiegata la configurazione GC–FID/MS, che combina la capacità di identificazione della MS con l'accuratezza quantitativa del FID (22).

Un approccio ancora diverso è rappresentato dalla gascromatografia accoppiata a elettroantennografia (GC–EAG), in cui l'eluito cromatografico è diviso tra un rivelatore chimico e all'EAG, tecnica di rivelazione usata in entomologia chimica per misurare la risposta elettrica dell'antenna di un insetto quando viene esposta a composti volatili. In questo modo si individuano non solo i composti presenti, ma quelli effettivamente percepiti dal sistema olfattivo dell'insetto, spesso minoritari ma di grande rilevanza ecologica. Questa tecnica è stata usata con successo per selezionare *semiochemicals* candidati come attrattivi o repellenti, integrando dati chimici e biologici in maniera unica (18).

Nel complesso, lo stato dell'arte mostra che non esiste una tecnica universale per lo studio del volatiloma vegetale. Le modalità statiche e dinamiche offrono soluzioni diverse a seconda della matrice e degli obiettivi, i materiali adsorbenti vanno scelti in funzione delle classi chimiche d'interesse, e l'integrazione di strumenti di rivelazione diversi consente di ottenere un quadro più completo. La GC–MS resta la tecnica di riferimento per l'identificazione strutturale, ma la GC–FID garantisce prestazioni superiori per una quantificazione accurata e robusta, mentre approcci complementari come la GC–EAG o le tecniche online come PTR–MS permettono di estendere l'analisi al legame con la risposta biologica e al monitoraggio in tempo reale.

2. CONTESTO TEORICO

In questo capitolo verranno illustrati i concetti alla base dello studio oggetto della tesi, con un particolare focus sulle caratteristiche chimico-fisiche delle molecole determinate, la strumentazione utilizzata e le nozioni di chemiometria e statistica utilizzati al fine di interpretare il dato ottenuto e validare il metodo proposto.

2.1. Analiti

L'emissione di molecole volatili da parte delle piante di pomodoro riguarda una moltitudine specie tra cui alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni, esteri. Tra questi, al fine di avere una popolazione rappresentativa del profilo volatile, sono stati scelti quindici analiti (Figura 10), le cui caratteristiche verranno presentate di seguito, e che vengono riassunti in Tabella 1, reperite dalla libreria NIST (National Institute of Standards and Technology) (23).

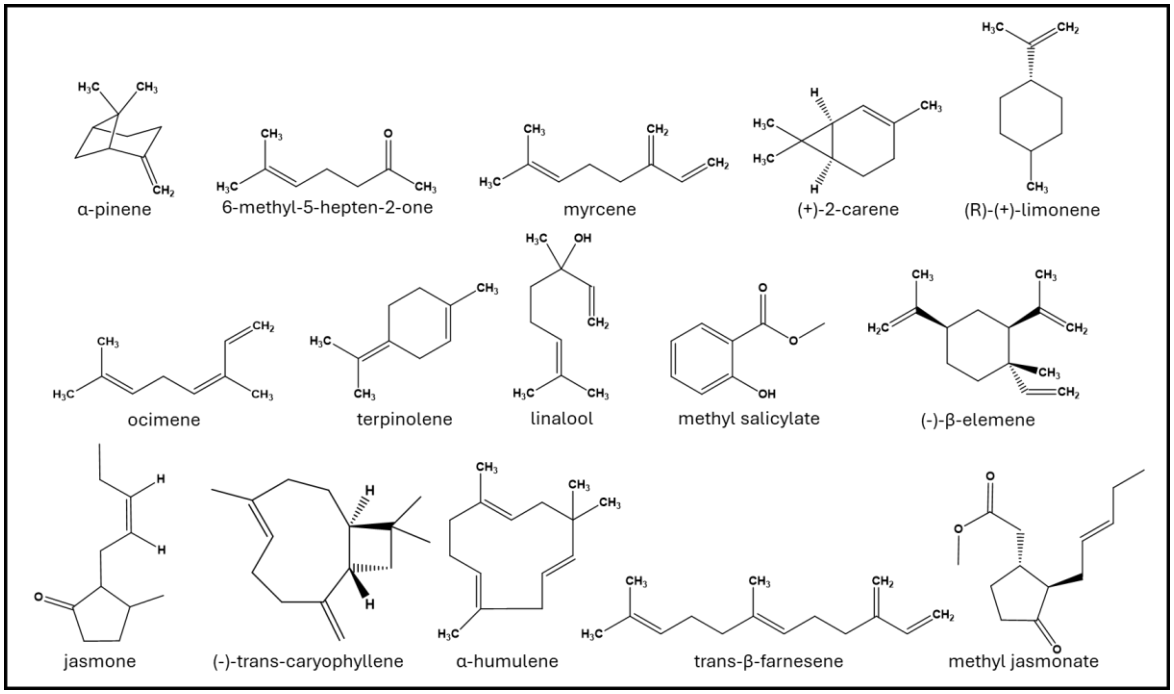


Figura 10. Strutture chimiche degli analiti

α-pinene

L'α-pinene è un monoterpene biciclico con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e peso molecolare 136,24 g/mol. La struttura presenta due anelli fusi, di cui uno con un doppio legame, e due centri chirali che danno origine a due enantiomeri otticamente attivi. A temperatura ambiente si presenta come liquido volatile, con punto di ebollizione di circa 155 °C, densità pari a 0,858 g/mL a 20 °Ce tensione di vapore circa 4,75 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 11) mostra un picco molecolare a m/z 136, accompagnato da frammenti caratteristici a m/z 93 e 41, attribuibili alla frammentazione del sistema biciclico e alla perdita di gruppi metilici.

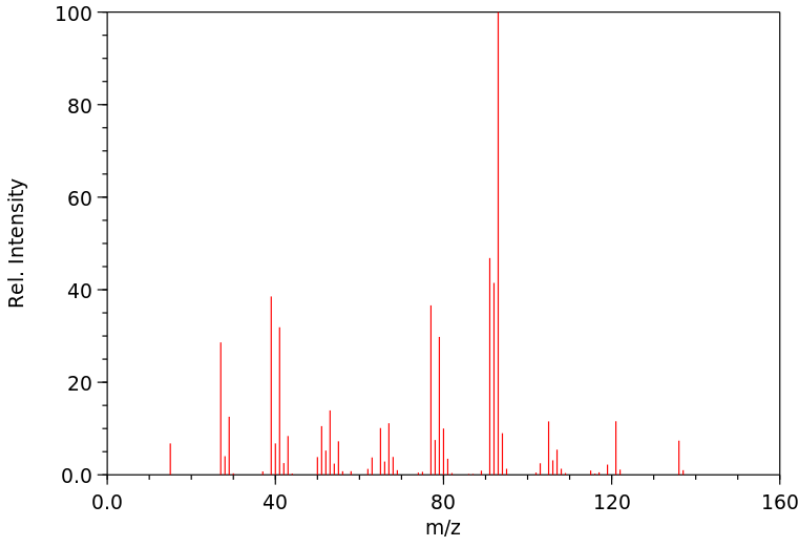


Figura 11. Spettro di massa (modalità EI) dell' α-pinene

6-methyl-5-hepten-2-one

Composto carbonilico con formula molecolare $C_8H_{14}O$ e peso molecolare 126,20 g/mol. Chetone insaturo lineare con doppio legame al C-5 e gruppo metilico al C-6. Punto di ebollizione circa 155 °C, densità 0,857 g/mL e tensione di vapore di circa 1,3 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 12) mostra picco molecolare a m/z 126, con frammenti maggioritari a m/z 98 (perdita di CO) e m/z 57 (rottura della catena laterale).

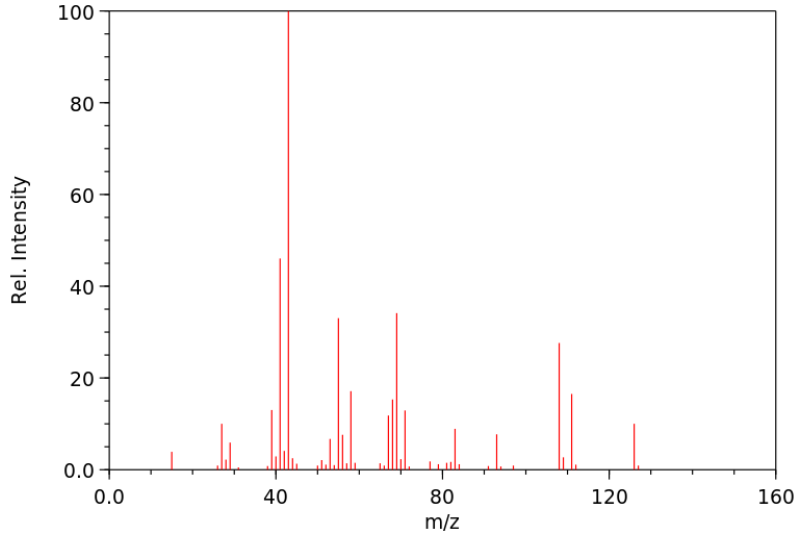


Figura 12. Spettro di massa (modalità EI) del 6-methyl-5-hepten-2-one

Myrcene

Monoterpene aciclico con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e peso molecolare 136,24 g/mol. Contiene due doppi legami coniugati lungo la catena lineare. Liquido volatile con punto di ebollizione circa 166 °C, densità 0,796 g/mL e tensione di vapore circa 5,5 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 13) presenta picco molecolare a m/z 136 e frammenti maggioritari a m/z 93 e m/z 41, associati alla perdita di gruppi metilici.

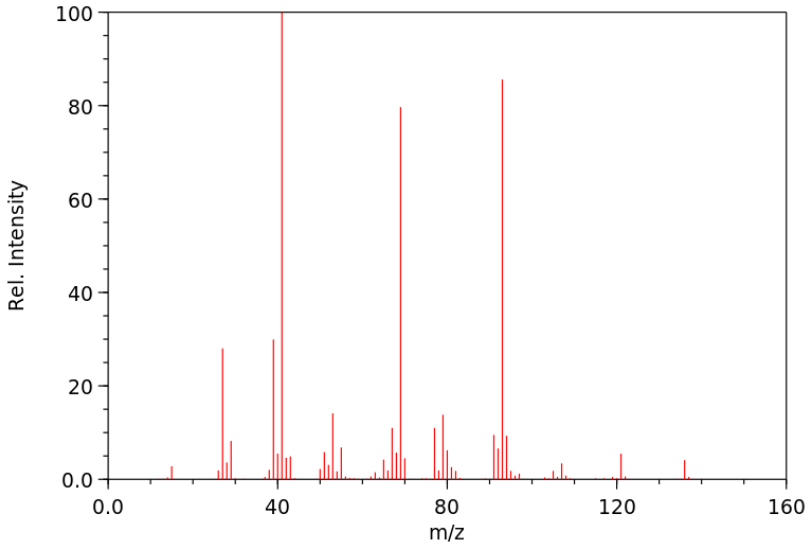


Figura 13. Spettro di massa (modalità EI) del myrcene

(+)-2-carene

Monoterpene biciclico con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e peso molecolare 136,24 g/mol. Contiene un anello biciclico con doppio legame interno e presenta punto di ebollizione circa 168 °C, densità circa 0,855 g/mL e tensione di vapore di circa 3,6 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 14) mostra picco molecolare a m/z 136 e frammenti principali a m/z 93 e m/z 41 dovuti alla rottura degli anelli.

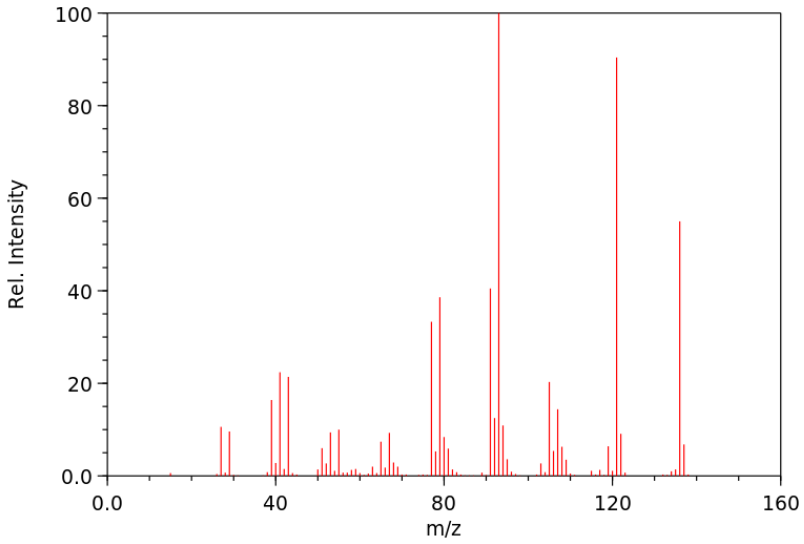


Figura 14. Spettro di massa (modalità EI) del (+)-2-carene

(R)-(+)-limonene

Monoterpene ciclico con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e peso molecolare 136,24 g/mol. Presenta un anello con doppio legame e un centro chirale con configurazione R. Liquido volatile con punto di ebollizione circa 176 °C, densità 0,841 g/mL e tensione di vapore di circa 1,98 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 15) mostra picco molecolare a m/z 136 e frammenti maggioritari a m/z 68 e m/z 93, associati alla rottura del ciclo e perdita di gruppi metilici.

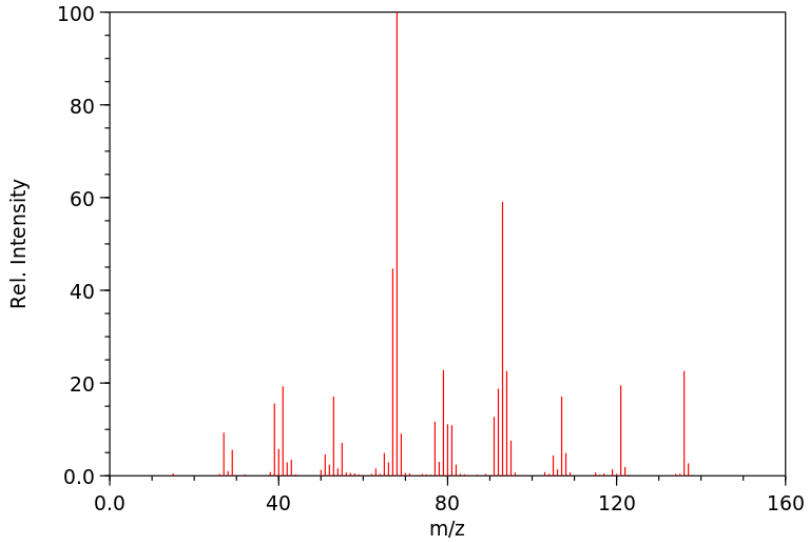


Figura 15. Spettro di massa (modalità EI) del (R)-(+)-limonene

Ocimene

Monoterpene aciclico con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e peso molecolare 136,24 g/mol. Contiene doppi legami isolati o coniugati a seconda dell'isomero (cis, trans). Il punto di ebollizione varia tra 50-55 °C per gli isomeri più volatili, densità circa 0,78 g/mL e tensione di vapore stimata tra 8 e 10 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 16) presenta picco molecolare a m/z 136 e frammenti maggioritari a m/z 93 e m/z 41, derivati dalla rottura della catena.

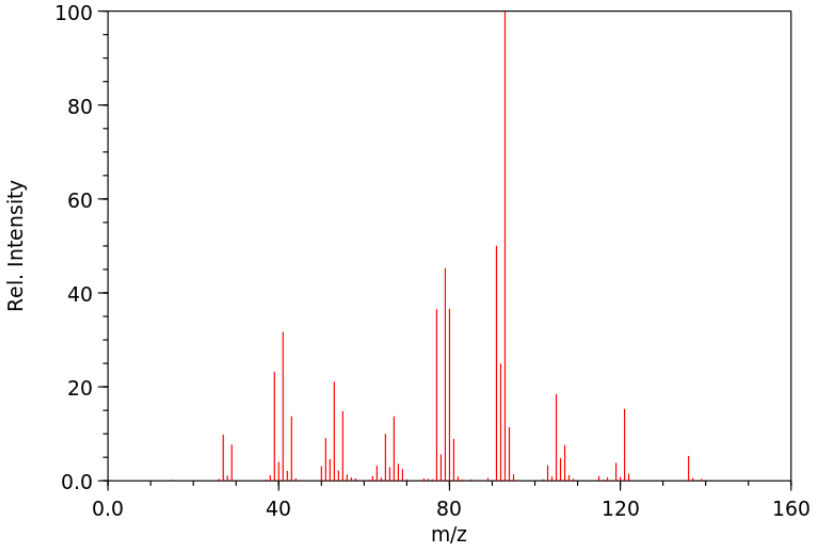


Figura 16. Spettro di massa (modalità EI) dell'ocimene

Terpinolene

Monoterpene ciclico con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e peso molecolare 136,24 g/mol. Contiene due doppi legami e un sistema coniugato parziale. Punto di ebollizione circa 185 °C, densità 0,852 g/mL e tensione di vapore circa 1,4 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 17) mostra picco molecolare a m/z 136 e frammenti principali a m/z 121 e m/z 93 da scissione del sistema coniugato.

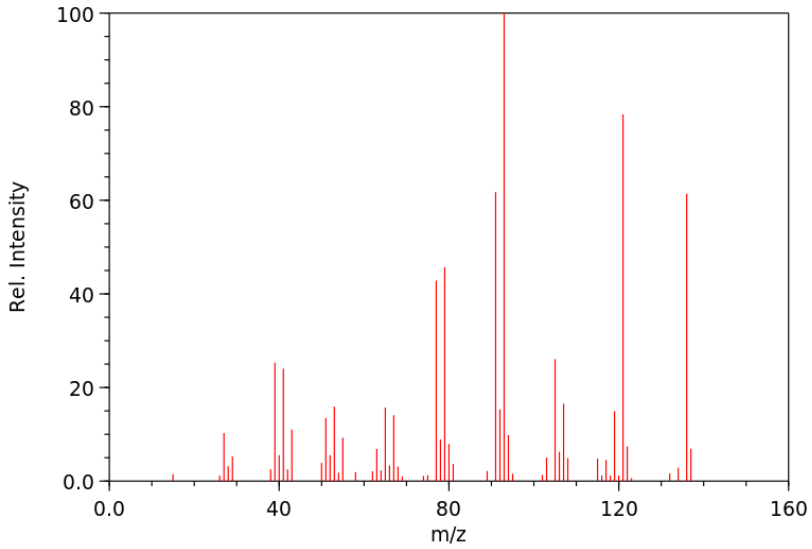


Figura 17. Spettro di massa (modalità EI) del terpinolene

Linalool

Monoterpenoide ossigenato con formula molecolare $C_{10}H_{18}O$ e peso molecolare 154,25 g/mol. Alcol terpenico aciclico con doppio legame isolato e gruppo ossidrilico. Punto di ebollizione circa 198 °C, densità 0,858 g/mL e tensione di vapore circa 0,16 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 18) presenta picco molecolare a m/z 154 e frammenti maggioritari a m/z 136 (perdita di acqua) e m/z 95.

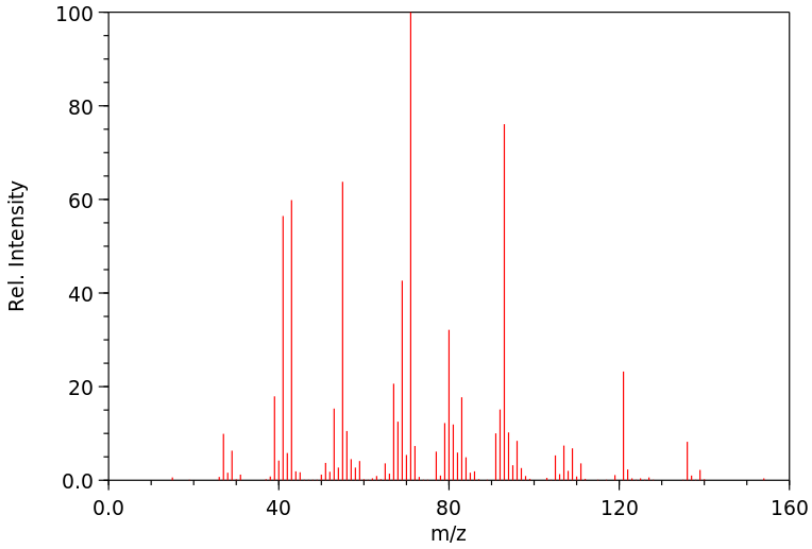


Figura 18. Spettro di massa (modalità EI) del linalool

Methyl salicylate

Estere aromatico con formula molecolare $C_8H_8O_3$ e peso molecolare 152,15 g/mol. Contiene un anello benzenico con gruppo estere metilico e ossidrile in posizione orto. Liquido volatile con punto di ebollizione 222 °C, densità 1,174 g/mL e tensione di vapore circa 0,013 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 19) mostra picco molecolare a m/z 152 e frammenti maggioritari a m/z 120 (perdita di CO_2) e m/z 92.

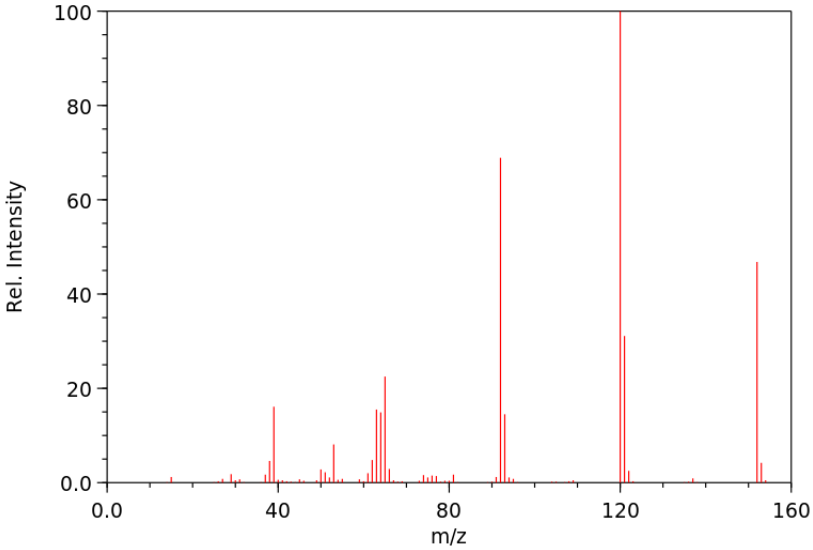


Figura 19. Spettro di massa (modalità EI) del methyl salicylate

(-)-β-elemene

Sesquiterpene biciclico con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e peso molecolare 204,35 g/mol. Presenta anelli fusi e diversi centri chirali, con configurazione ottica negativa. Punto di ebollizione circa 265 °C e tensione di vapore molto bassa, inferiore a 0,01 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 20) mostra picco molecolare a m/z 204 e frammenti maggioritari a m/z 189 e m/z 93.

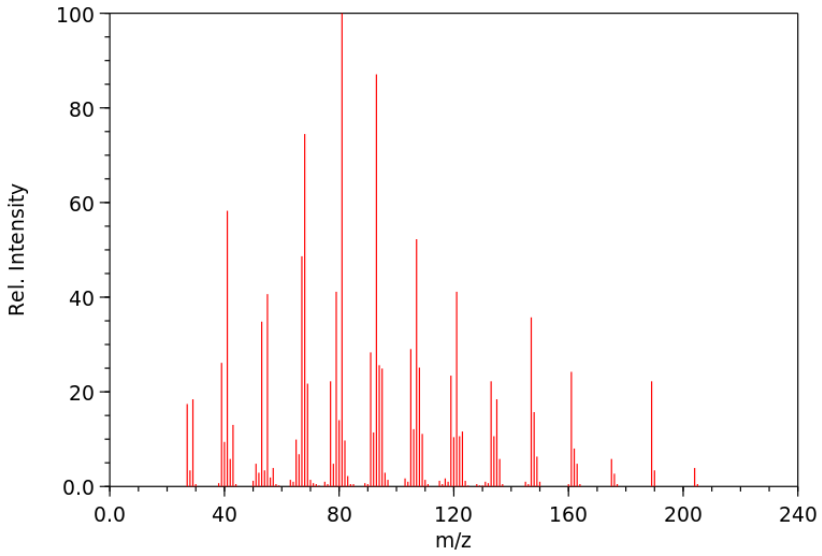


Figura 20. Spettro di massa (modalità EI) del (-)-β-elemene

Jasmone

Monoterpene ciclico carbonilico con formula molecolare $C_{11}H_{16}O$ e peso molecolare 164,24 g/mol. Contiene un anello con chetone α,β-insaturo. Punto di ebollizione circa 230 °C, densità 0,93 g/mL e tensione di vapore stimata intorno a 0,1 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 21) mostra picco molecolare a m/z 164 e frammenti maggioritari a m/z 146 e m/z 93, dovuti alla perdita di gruppi metilici e frammentazioni dell'anello.

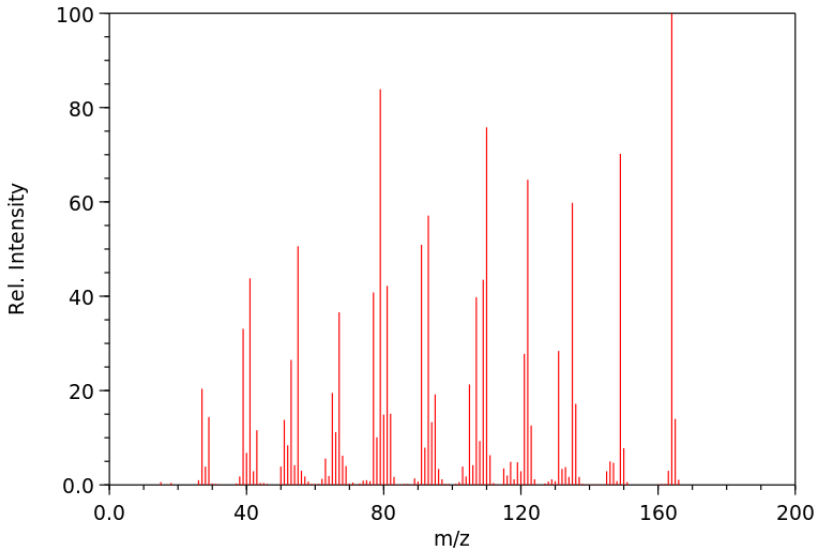


Figura 21. Spettro di massa (modalità EI) del jasmone

(-)-trans-caryophyllene

Il (-)-trans-caryophyllene o β-caryophyllene è un sesquiterpene biciclico con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e peso molecolare 204,35 g/mol. Presenta doppio legame trans e configurazione stereochimica negativa. Punto di ebollizione circa 262 °C, densità 0,895 g/mL e tensione di vapore molto bassa (<0,01 kPa a 25 °C). Lo spettro di massa (Figura 22) mostra picco molecolare a m/z 204 e frammenti maggioritari a m/z 161 e m/z 93 da scissione degli anelli.

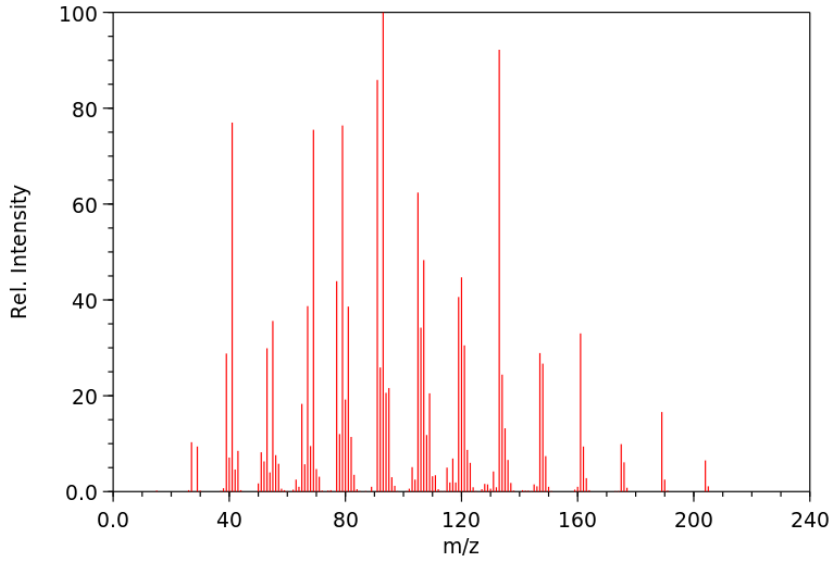


Figura 22. Spettro di massa (modalità EI) del (-)-trans-caryophyllene

α-humulene

Sesquiterpene ciclico con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e peso molecolare 204,35 g/mol, isomero del (-)-trans-caryophyllene. Contiene anello centrale con doppi legami isolati. Punto di ebollizione 198-202 °C, densità circa 0,86 g/mL e tensione di vapore inferiore a 0,01 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 23) presenta picco molecolare a m/z 204 e frammenti maggioritari a m/z 189 e m/z 93.

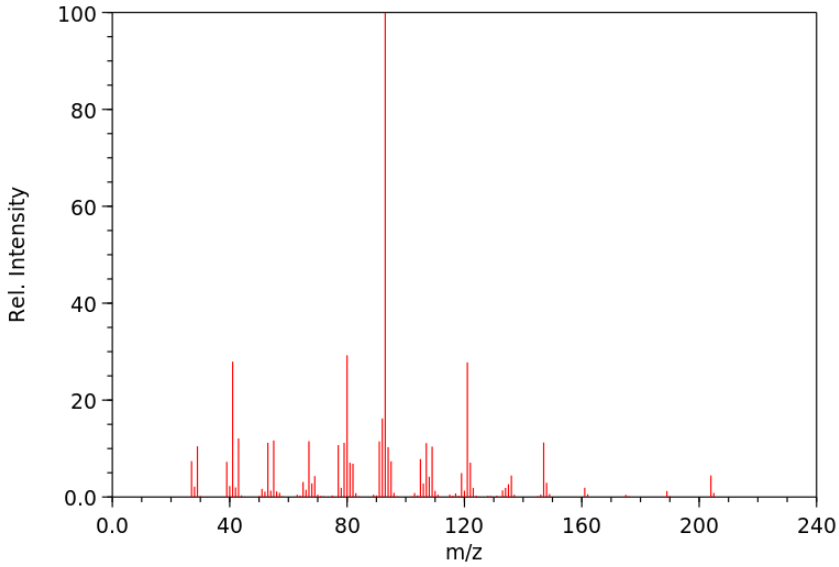


Figura 23. Spettro di massa (modalità EI) del α-humulene

trans- β-farnesene

Sesquiterpene aciclico con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e peso molecolare 204,35 g/mol. Contiene tre doppi legami in configurazione trans. Punto di ebollizione circa 260 °C, densità 0,815 g/mL e tensione di vapore bassa, tipica dei sesquiterpeni (<0,01 kPa a 25 °C). Lo spettro di massa (Figura 24) mostra picco molecolare a m/z 204 e frammenti maggioritari derivati da rotture lungo la catena a m/z 161 e m/z 93.

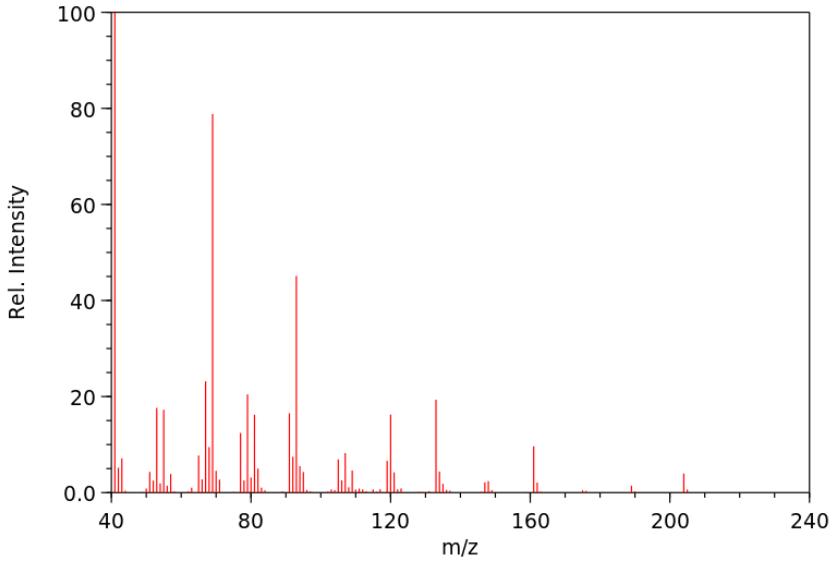


Figura 24. Spettro di massa (modalità EI) del trans- β-farnesene

Methyl jasmonate

Estere ciclico con formula molecolare $C_{13}H_{20}O_3$ e peso molecolare 224,30 g/mol. Derivato del jasmone con gruppo metilico estereo legato al gruppo carbossilico. Punto di ebollizione 110-112 °C a bassa pressione, densità circa 1,06 g/mL e tensione di vapore stimata intorno a 0,04 kPa a 25 °C. Lo spettro di massa (Figura 25) presenta picco molecolare a m/z 224 e frammenti maggioritari a m/z 206 (perdita di acqua) e m/z 161.

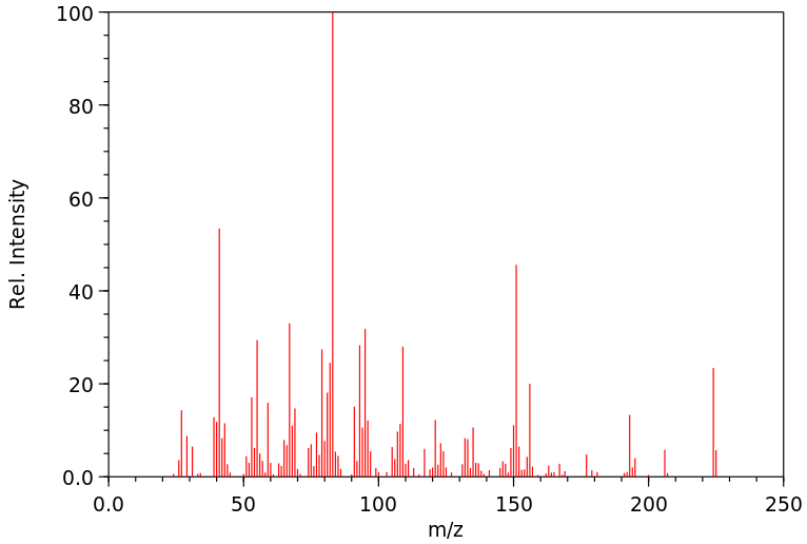


Figura 25. Spettro di massa (modalità EI) del methyl jasmonate

Tabella 1. Riassunto degli analiti

Analiti	**N° CAS**	**Classe di composti**
α-pinene	80-56-8	Monoterpene ciclico
6-methyl-5-hepten-2-one	110-93-0	Cheto-alchene
myrcene	123-35-3	Monoterpene aciclico
(+)-2-carene	4497-92-1	Monoterpene ciclico
(R)-(+)-limonene	5989-27-5	Monoterpene ciclico
ocimene	13877-91-3	Monoterpene aciclico
terpinolene	586-62-9	Monoterpene ciclico
linalool	78-70-6	Alcol terpenico
methyl salicylate	119-36-8	Estere
(-)-β-elemene	515-13-9	Sesquiterpene ciclico
jasmone	488-10-8	Terpene chetone ciclico
(-)-trans-caryophyllene	87-44-5	Sesquiterpene ciclico
α-humulene	6753-98-6	Sesquiterpene ciclico
trans-β-farnesene	18794-84-8	Sesquiterpene aciclico
methyl jasmonate	39924-52-2	Estere terpenoide

2.2. Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa

La cromatografia rappresenta una delle tecniche di separazione più versatili e diffuse nell'ambito delle scienze chimiche e bioanalitiche. Essa consente la separazione, l'identificazione e la quantificazione di componenti presenti in miscele complesse, sulla base della diversa affinità che tali componenti mostrano verso una fase stazionaria e una fase mobile. I principi fondamentali della cromatografia risiedono nella ripartizione delle specie chimiche tra queste due fasi: la fase stazionaria, solida o liquida immobilizzata, e la fase mobile, liquida o gassosa, che scorre attraverso la prima. Tale ridistribuzione genera un ritardo selettivo nel tempo di migrazione delle diverse molecole lungo il sistema, traducendosi in una separazione fisica dei singoli componenti della miscela.

La teoria dei piatti teorici rappresenta uno dei modelli più utilizzati per descrivere e razionalizzare il comportamento delle molecole nelle colonne cromatografiche. Essa è mutuata dalla distillazione frazionata e considera la colonna come suddivisa in un numero elevato di sezioni ideali, dette appunto piatti teorici. In ciascun piatto, si assume che il composto raggiunga un equilibrio istantaneo tra la fase stazionaria e quella mobile. Il numero di piatti teorici (N) è un indicatore dell'efficienza di separazione della colonna ed è espresso in funzione del tempo di ritenzione (t_R) e della larghezza del picco alla base (ω), come espresso in Equazione 1.

$$N = 16 * ({}^{t_R}/_{\omega})^2 \quad (1)$$

Un altro parametro fondamentale è l'altezza equivalente a un piatto teorico (HETP), ottenibile come rapporto tra la lunghezza della colonna (L) e il numero di piatti teorici (N), come riportato in Equazione 2.

$$HETP = {}^{L}/_{N} \quad (2)$$

Minore è il valore di HETP, maggiore è l'efficienza della colonna. Dal punto di vista teorico, l'efficienza e la qualità della separazione cromatografica possono essere descritte anche attraverso la curva di Van Deemter, che esprime l'altezza

equivalente a un piatto teorico (HETP) in funzione della velocità lineare del gas vettore (u). La curva mostra come esista una velocità ottimale alla quale H è minimo, ovvero la separazione è più efficiente. La funzione HETP (u) (Equazione 3) è composta da tre termini: A (diffusione turbolenta, indipendente dalla velocità), B/u (diffusione longitudinale, inversamente proporzionale a u) e C·u (resistenza al trasferimento di massa, proporzionale a u). Tale formulazione consente l'ottimizzazione dei parametri operativi per massimizzare la risoluzione.

$$HETP\ (u) = A + {}^{B}/_{u} + C \cdot u \qquad (3)$$

La gascromatografia (GC) è una tecnica cromatografica in cui la fase mobile è costituita da un gas inerte, generalmente elio, idrogeno o azoto, mentre la fase stazionaria è costituita da un film sottile di materiale liquido o solido depositato lungo la parete interna di una colonna. La GC è particolarmente indicata per l'analisi di composti volatili e termicamente stabili. Il processo analitico prevede che il campione, generalmente in forma liquida o gassosa, venga iniettato in una camera riscaldata, dove subisce una rapida vaporizzazione. Successivamente, il campione vaporizzato viene trasportato dal gas vettore attraverso la colonna, dove avviene la separazione dei singoli componenti in base alla loro interazione con la fase stazionaria e alla loro tensione di vapore.

Il sistema di iniezione può operare in modalità split o splitless (Figura 26). Nella modalità split, solo una frazione del campione viene introdotta nella colonna, rendendo questa opzione adatta per campioni concentrati. Al contrario, la modalità splitless consente l'introduzione dell'intero volume iniettabile e l'apertura della valvola di purge solo a trasferimento alla colonna avvenuto, migliorando la sensibilità in caso di analisi su tracce.

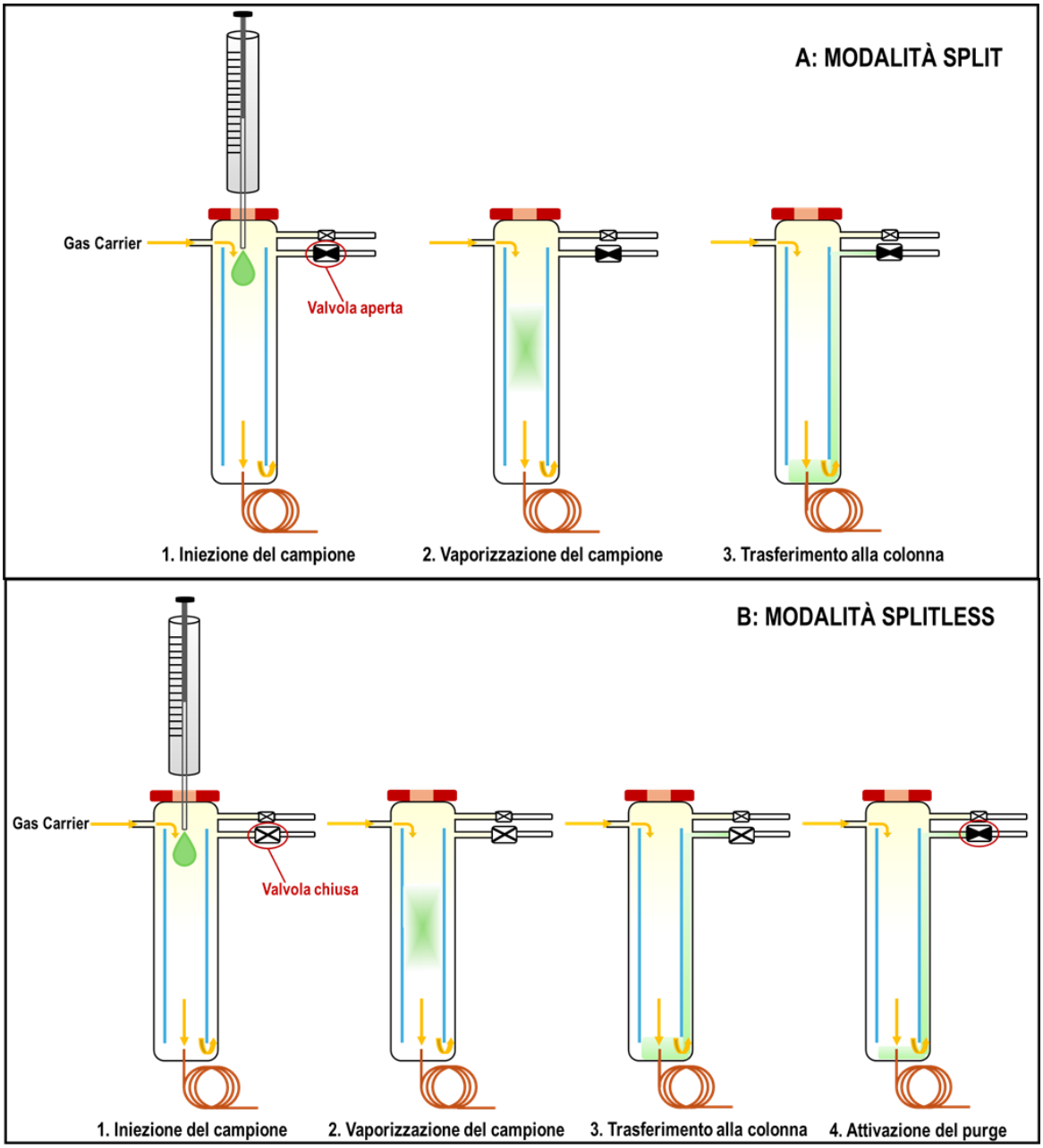


Figura 26. Schematizzazione delle modalità split e splitless

Le colonne utilizzate in GC possono essere di tipo impaccato o capillare, anche se oggi le colonne capillari rappresentano lo standard, grazie alla loro elevata efficienza, sensibilità e risoluzione. Le colonne capillari sono costituite da capillari di silice fusa con diametri interni compresi tra 0,1 e 0,53 mm e lunghezze che variano tipicamente da 15 a 60 metri. All'interno, le pareti sono rivestite da uno strato di fase stazionaria polimerica, la cui polarità può essere modulata per adattarsi alle caratteristiche degli analiti. Tra i materiali più

comuni si trovano il polidimetilsilossano (PDMS), usato per analiti apolari, e polimeri con gruppi fenilici o polietilenglicole per composti più polari.

Per il rilevamento dei composti separati in GC, vengono utilizzati diversi tipi di rivelatori. Tra i più comuni si annovera il rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), che misura la corrente generata dalla combustione di composti organici in una fiamma idrogeno-aria. Il segnale è proporzionale al numero di atomi di carbonio presenti nella molecola, rendendo il FID estremamente sensibile per la maggior parte dei composti organici, ma inadatto per sostanze prive di carbonio o per composti altamente ossigenati. Altri rivelatori includono il TCD (Thermal Conductivity Detector), l'ECD (Electron Capture Detector) e il rivelatore a spettrometria di massa (MS), che offre vantaggi incomparabili in termini di identificazione strutturale (24).

La GC-MS, ovvero l'accoppiamento tra la gascromatografia e la spettrometria di massa, è una tecnica analitica ad altissima sensibilità e specificità, largamente utilizzata per l'identificazione e la quantificazione di composti organici anche in tracce. Dopo la separazione cromatografica, gli analiti vengono inviati alla sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa, dove subiscono un processo di ionizzazione, solitamente per impatto elettronico (EI). Questo processo comporta la rimozione di un elettrone dalla molecola neutra, generando uno ione molecolare (M+) che può successivamente frammentare in ioni più piccoli (Figura 27). Lo spettro di massa risultante è un diagramma che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). L'analisi degli spettri di massa consente di ottenere informazioni dettagliate sulla struttura molecolare dell'analita, grazie alla specificità dei pattern di frammentazione. Ogni composto produce uno spettro di massa caratteristico, che può essere confrontato con librerie spettrali digitali per l'identificazione automatica. L'analizzatore di massa più comune nei sistemi GC-MS è il quadrupolo, costituito da quattro barre metalliche, tra cui è applicato un campo elettrico oscillante. Solo gli ioni con uno specifico rapporto m/z riescono a mantenere una traiettoria stabile e raggiungere il rivelatore,

mentre gli altri vengono deflessi. Il rivelatore, tipicamente un moltiplicatore elettronico, amplifica il segnale ionico e consente la generazione dello spettro.

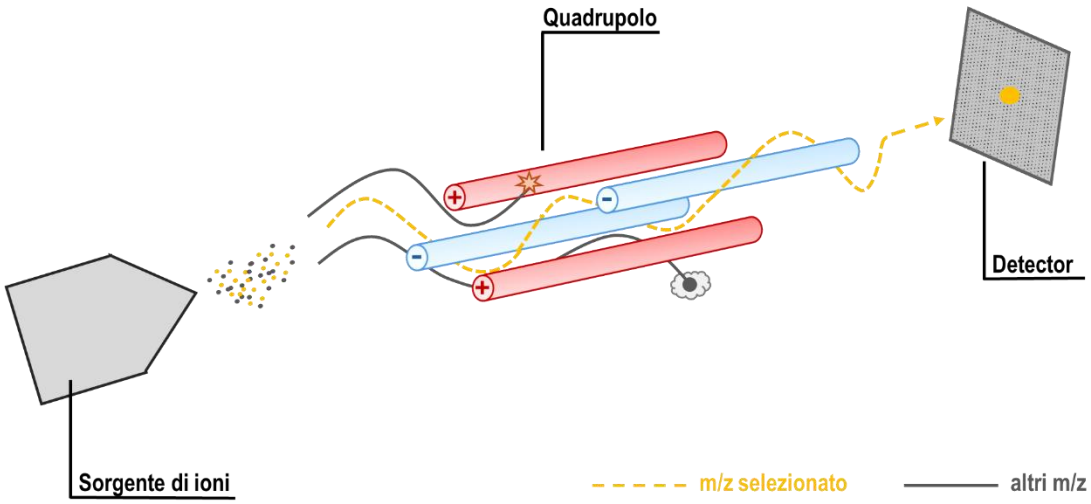


Figura 27. Rappresentazione grafica di uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo

La spettrometria di massa può essere utilizzata in diverse modalità operative. In modalità full scan lo spettrometro registra l'intero intervallo di masse di interesse, fornendo una panoramica completa degli ioni presenti nel campione. Tale approccio è utile per l'identificazione di composti sconosciuti o per lo screening qualitativo. Tuttavia, la sensibilità può risultare limitata in presenza di basse concentrazioni. Per aumentare la sensibilità e selettività, si utilizza la modalità SIM (Selected Ion Monitoring), in cui il rivelatore monitora esclusivamente pochi ioni selezionati, specifici per ciascun analita target. Questa tecnica riduce il rumore di fondo e migliora il limite di rilevabilità, rendendola particolarmente adatta per analisi quantitative.

Il cromatogramma risultante può essere rappresentato come un TIC (Total Ion Chromatogram), in cui si riportano gli ioni totali rilevati in funzione del tempo. Il TIC è utile per osservare l'andamento generale dell'analisi e per identificare i picchi principali, ma non consente di distinguere facilmente i composti coeluenti. In alternativa, è possibile generare cromatogrammi estratti di ioni specifici (EIC) relativi a m/z selezionati, migliorando la selettività.

Tra i vantaggi della GC-MS vi sono l'elevata risoluzione cromatografica, la possibilità di identificare composti noti e ignoti tramite librerie spettrali, l'ampia gamma di applicazioni in campo ambientale, alimentare, forense e clinico, nonché la capacità di quantificare analiti in concentrazioni molto basse, fino a livelli di parti per miliardo (ppb) o anche inferiori (25).

2.3 Validazione del metodo analitico

La validazione di un metodo analitico è una fase essenziale nella sua progettazione e applicazione, poiché consente di dimostrare che il metodo produce risultati affidabili, coerenti e adeguati allo scopo analitico previsto. Si tratta di un processo strutturato che ha lo scopo di fornire evidenza oggettiva della "fitness for purpose" del metodo, ossia della sua idoneità a fornire risposte attendibili nelle condizioni in cui verrà utilizzato.

Nel contesto della validazione, si parla spesso di *validazione primaria* quando il metodo è stato sviluppato internamente al laboratorio e non è ancora stato consolidato attraverso standard ufficiali o letteratura accreditata. In questa fase iniziale, è necessario definire e misurare una serie di caratteristiche prestazionali del metodo, chiamate comunemente figure di merito, che descrivono in modo quantitativo le proprietà analitiche fondamentali. Queste informazioni sono cruciali per comprendere i limiti e le potenzialità del metodo stesso, soprattutto quando si tratta di un metodo sviluppato ex novo. Tuttavia, anche nel caso in cui il metodo sia stato precedentemente validato da un altro laboratorio o sia riportato in letteratura o in normative ufficiali, è comunque necessario eseguire una *validazione secondaria*, detta anche verifica. Questo passaggio, meno esteso rispetto alla validazione primaria, ha lo scopo di accertare che il metodo mantenga le prestazioni attese nel contesto specifico del laboratorio che lo utilizza, con la propria strumentazione, personale e matrice campionaria.

Le principali figure di merito includono la precisione, l'accuratezza, la linearità della risposta, la sensibilità, i limiti di rivelazione e quantificazione, il range operativo e la selettività. Ciascuna di queste caratteristiche contribuisce a delineare il comportamento del metodo in condizioni controllate e riproducibili (26).

La *precisione* riflette il grado di concordanza tra risultati ottenuti su uno stesso campione in condizioni ripetute. È un parametro che considera sia la ripetibilità, cioè la variabilità riscontrabile in condizioni strettamente costanti, sia la precisione intermedia, che include le variazioni dovute a operatori diversi,

strumenti differenti o giorni diversi. L' *accuratezza*, invece, descrive quanto il valore misurato si avvicini al valore reale o accettato come riferimento, e si ottiene spesso tramite studi di recupero o confronto con materiali certificati. Una visualizzazione grafica del concetto di precisione e accuratezza è riportata in Figura 28.

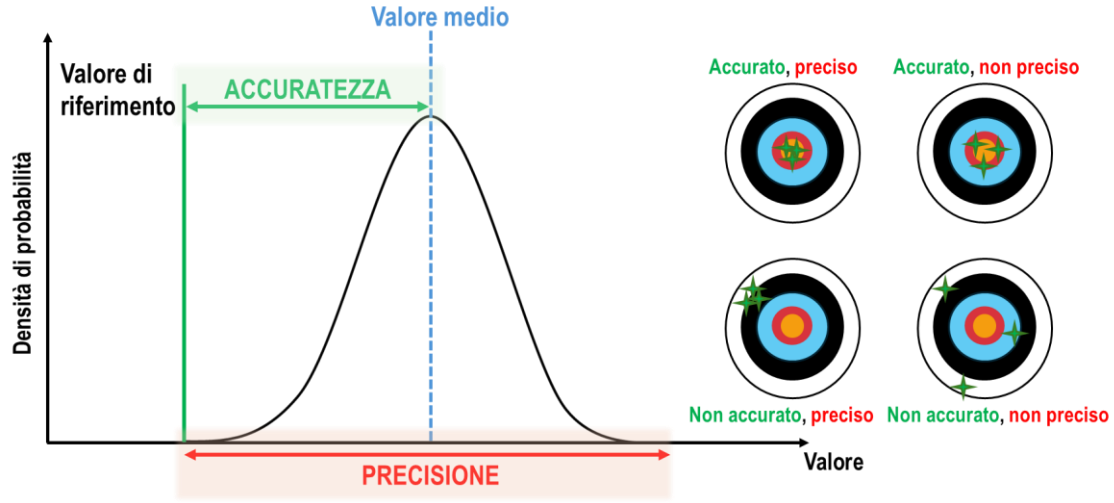


Figura 28. Schematizzazione dei concetti di precisione e accuratezza

Altro parametro fondamentale è la *linearità*, ovvero la capacità del metodo di fornire una risposta proporzionale alla concentrazione dell'analita in un intervallo definito. La linearità è un prerequisito per ogni metodo quantitativo ed è generalmente verificata attraverso l'elaborazione statistica di curve di calibrazione. Insieme alla linearità si valuta anche il range operativo, che definisce l'intervallo di concentrazioni all'interno del quale il metodo fornisce risultati affidabili in termini di precisione e accuratezza. Nel caso di metodi analitici basati su misurazioni quantitative, un elemento centrale della validazione è la valutazione del modello di regressione utilizzato per descrivere la relazione tra la concentrazione dell'analita e la risposta strumentale. Questo modello, in genere lineare, rappresenta la base per la calibrazione del metodo e quindi per la successiva quantificazione dei campioni. L'analisi della retta di calibrazione non si limita alla semplice costruzione del grafico: è importante valutare la significatività statistica della pendenza e dell'intercetta, verificando che il segnale aumenti in modo coerente con la concentrazione. A tale scopo si

impiegano spesso test t-Student, che consentono di verificare se la pendenza sia significativamente diversa da zero (indicando una reale dipendenza tra variabile indipendente e risposta), o se l'intercetta possa essere trascurata senza compromettere la qualità del modello.
Un altro passaggio importante è la valutazione della qualità globale del modello tramite analisi della varianza (ANOVA). Questo tipo di analisi permette di confrontare la variabilità spiegata dal modello con quella residua, non spiegata, ossia l'errore. Il rapporto tra queste due varianze genera un valore di F, che, se sufficientemente elevato, indica che il modello di regressione è statisticamente significativo. In pratica, significa che il modello è in grado di spiegare buona parte della variabilità osservata nei dati sperimentali. È inoltre fondamentale escludere che la relazione tra variabile indipendente e risposta presenti deviazioni sistematiche non catturate dal modello lineare. A tal fine si effettua il test chiamato *lack of fit*, che valuta se le deviazioni tra i valori osservati e quelli previsti siano compatibili con l'errore sperimentale o se esista una curvatura residua che suggerirebbe l'impiego di un modello non lineare. Il test di lack of fit risulta particolarmente utile nei casi in cui si osservi una distribuzione dei residui non casuale, o un comportamento anomalo della risposta a basse o alte concentrazioni. La valutazione dei residui, ossia delle differenze tra i valori sperimentali e quelli stimati dal modello, rappresenta un ulteriore strumento diagnostico. Un modello adeguato genera residui distribuiti casualmente attorno allo zero, senza tendenze o pattern evidenti. Al contrario, la presenza di strutture nei residui può indicare la necessità di rivedere il modello scelto o di approfondire eventuali fonti di errore sistematico.

Nel contesto delle basse concentrazioni, acquisiscono particolare importanza il *limite di rivelazione* (LOD) e il *limite di quantificazione* (LOQ). Il primo rappresenta la più bassa concentrazione dell'analita che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata con precisione; il secondo, invece, è la più bassa concentrazione che può essere determinata in modo quantitativo con sufficiente

affidabilità. Entrambi i valori sono strettamente collegati alla sensibilità del metodo e alla sua capacità di distinguere segnali reali dal rumore di fondo.

La *sensibilità* di un metodo descrive la variazione della risposta in funzione della variazione della concentrazione dell'analita. Una buona sensibilità è importante soprattutto per l'analisi di tracce o in presenza di campioni fortemente diluiti. Altrettanto importante è la *selettività*, ovvero la capacità del metodo di distinguere l'analita di interesse da eventuali interferenti presenti nella matrice. Questo parametro è cruciale in contesti complessi, come l'analisi ambientale, alimentare o biologica, dove la presenza di sostanze potenzialmente interferenti è elevata.

Infine, la *robustezza*, talvolta indicata anche come "ruggedness", valuta la capacità del metodo di mantenere prestazioni accettabili al variare controllato di alcuni parametri, come ad esempio la temperatura, il pH o il tempo di estrazione. Una buona robustezza è indice della stabilità del metodo rispetto a piccole variazioni operative e contribuisce alla sua affidabilità nella routine.

In sintesi, la validazione primaria fornisce al chimico analitico gli strumenti per comprendere a fondo il comportamento del metodo e per comunicare in modo trasparente i suoi limiti e le sue potenzialità. È una fase che non si limita alla semplice raccolta di dati, ma che implica una riflessione critica sull'intero approccio analitico, dalla preparazione del campione alla misurazione, fino all'elaborazione dei dati. Le informazioni raccolte nella fase di validazione saranno poi fondamentali anche per la stima dell'incertezza di misura, per l'impostazione del controllo qualità e per l'eventuale accreditamento del metodo presso enti ufficiali (27,28).

Nel capitolo dedicato ai materiali e metodi verranno illustrati nel dettaglio i protocolli sperimentali adottati per stimare ciascuna figura di merito descritta, accompagnati dalle relative elaborazioni statistiche e valutazioni critiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonner J, Varner JE. Plant Biochemistry. Elsevier; 2012. 944 p.

2. Fang C, Fernie AR, Luo J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. Trends in Plant Science. gennaio 2019;24(1):83–98.

3. Guerrieri E, Rasmann S. Exposing belowground plant communication. Science. 19 aprile 2024;384(6693):272–3.

4. Wang N, Kong C, Wang P, Meiners SJ. Root exudate signals in plant–plant interactions. Plant Cell & Environment. aprile 2021;44(4):1044–58.

5. Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, Hiltpold I, Toepfer S, Kuhlmann U, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. Nature. aprile 2005;434(7034):732–7.

6. Shen G, Zhang J, Lei Y, Xu Y, Wu J. Between-Plant Signaling. Annu Rev Plant Biol. 22 maggio 2023;74(1):367–86.

7. Maffei ME, Gertsch J, Appendino G. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. Nat Prod Rep. 2011;28(8):1359.

8. Giorgini M, Rossi Stacconi MV, Pace R, Tortorici F, Cascone P, Formisano G, et al. Foraging behavior of Ganaspis brasiliensis in response to temporal dynamics of volatile release by the fruit–Drosophila suzukii complex. Biological Control. agosto 2024;195:105562.

9. Cascone P, Quarto R, Iodice L, Cencetti G, Formisano G, Spiezia G, et al. Behavioural response of the main vector of Xylella fastidiosa towards olive VOCs. entomologia. 11 febbraio 2022;42(1):35–44.

10. Xu D, Qian Q, Zhuo Z. The different responses of *Batocera horsfieldi* adults to *Juglans regia* bark and leaf volatile compounds. Entomologia Exp Applicata. maggio 2024;172(5):422–35.

11. Devescovi F, Fernández PC, Bachmann GE, Nussenbaum AL, Segura DF. Direct and indirect host-related volatile compounds attract a fruit fly parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata*. Entomologia Exp Applicata. giugno 2024;172(6):502–12.

12. Oxford University Plants 400: Solanum lycopersicum [Internet]. [citato 29 agosto 2025]. Disponibile su: https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/ST/lycopersicum

13. Pavan S, Van Heusden AW, Bai Y. *Solanum lycopersicum* (Tomato). In: Encyclopedia of Life Sciences [Internet]. 1ª ed. Wiley; 2009 [citato 29 agosto 2025]. Disponibile su: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0003686

14. Trappola Minatrice del Pomodoro Tuta Absoluta - [Internet]. Agraria Il Pollice Verde. [citato 29 agosto 2025]. Disponibile su:

https://www.agrariailpolliceverde.it/prodotto/trappola-minatrice-del-pomodoro-tuta-absoluta/

15. Giorgini M, Guerrieri E, Cascone P, Gontijo L. Current Strategies and Future Outlook for Managing the Neotropical Tomato Pest Tuta absoluta (Meyrick) in the Mediterranean Basin. Neotrop Entomol. febbraio 2019;48(1):1–17.

16. Vila E, Cabello T. Biosystems Engineering Applied to Greenhouse Pest Control. In: Guevara-Gonzalez R, Torres-Pacheco I, curatori. Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [citato 29 agosto 2025]. p. 99–128. Disponibile su: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-03880-3_4

17. Gontijo L, Cascone P, Giorgini M, Michelozzi M, Rodrigues HS, Spiezia G, et al. Relative importance of host and plant semiochemicals in the foraging behavior of Trichogramma achaeae, an egg parasitoid of Tuta absoluta. J Pest Sci. settembre 2019;92(4):1479–88.

18. Tholl D, Boland W, Hansel A, Loreto F, Röse USR, Schnitzler J. Practical approaches to plant volatile analysis. The Plant Journal. febbraio 2006;45(4):540–60.

19. Makhlouf L, El Fakhouri K, Kemal SA, Aasfar A, Meftah Kadmiri I, El Bouhssini M. Advances in analytical techniques for assessing volatile organic compounds in pulse crops: a comprehensive review. Front Hortic. 25 giugno 2024;3:1394041.

20. Özgenç Ö, Durmaz S, Çelik G, Korkmaz B, Yaylı N. Comparative phytochemical analysis of volatile organic compounds by SPME-GC-FID/MS from six coniferous and nine deciduous tree bark species grown in Turkey. South African Journal of Botany. novembre 2017;113:23–8.

21. Majchrzak T, Wojnowski W, Wasik A. Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry for Plant Metabolomics. Trends in Plant Science. 1 marzo 2020;25(3):313–4.

22. Bruce TJ, Martin JL, Smart LE, Pickett JA. Development of semiochemical attractants for monitoring bean seed beetle, *Bruchus rufimanus*. Pest Management Science. ottobre 2011;67(10):1303–8.

23. NIST [Internet]. 2025 [citato 29 agosto 2025]. National Institute of Standards and Technology. Disponibile su: https://www.nist.gov/

24. Harvey D. Modern analytical chemistry. Boston: McGraw-Hill; 2000. 798 p.

25. Stashenko E, Ren J. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: Guo X, curatore. Advances in Gas Chromatography [Internet]. InTech; 2014 [citato 29 agosto 2025]. Disponibile su: http://www.intechopen.com/books/advances-in-gas-chromatography/gas-chromatography-mass-spectrometry

26. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Third edition (2025).

27. Horwitz W. AOAC Guidelines for Single Laboratory.

28. Long GL, Winefordner JD. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. Anal Chem. 1 giugno 1983;55(7):712A-724A.

29. James N. Miller, Jane C. Miller, Robert D. Miller. Calibration methods in instrumental analysis: regression and correlation. In: Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 7ª ed. Pearson; 2018. p. 138–83.

30. Massart, Vandeginste, Buydens, De Jong, Lewi, Smeyers-Verbeke. Straight line regression and calibration. In: Data Handling in Science and Technology [Internet]. 1998ª ed. Elsevier; 1998. p. 171–230. Disponibile su: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092234879780038X

SEZIONE SPERIMENTALE

1. MATERIALI E METODI

In questa sezione vengono riportati i materiali utilizzati e i metodi impiegati durante le procedure sperimentali.

1.1 Materiali

- Esano chromatographic grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 139386
- Acetone chromatographic grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 1000201000
- α-pinene purezza 98%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 147524
- 6-methyl-5-hepten-2-one purezza 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto M48805
- Myrcene purezza 97%, %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W276200
- (+)-2-carene purezza 97%, %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 232386
- (R)-(+)-limonene purezza 97%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 183164
- Ocimene purezza ≥90%, %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W353977
- Terpinolene analitycal standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W353977
- Linalool purezza ≥97%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W263508
- Methyl salicylate purezza ≥99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto M6752
- (−)-β-elemene analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 63965
- Jasmone analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 59975

- (−)-trans-caryophyllene analytican standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 75541
- α-humulene purezza >96%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto PHL83351
- trans-β-farnesene analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 73492
- Methyl jasmonate purezza ≥98%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W341002
- Tenax TA 60-80 mesh, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 11982
- Porapak Q 50-80 mesh, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 20330-U
- Cannabis Terpene Mixture 1 2500 µg/mL in Hexane, LGC Standards (Teddington, Middlesex, UK) codice prodotto DRE-GA09000494HE
- Soluzioni stock di ciascun analita preparate a 200 µL/L in esano
- Soluzioni di lavoro preparate per diluizione delle stock
- Gascromatografo Thermo Scientific Trace 1300 accoppiato a spettrometro di massa Thermo Scientific ISQ LT Mass Spectrometer e con autocampionatore Thermo Scientific AI 1310 Auto-sampler
- Colonna capillare Zebron ZB-Wax, Phenomenex (30 m x 0.25 mm I.D. 0.25 µm film thickness)
- Colonna capillare TG-5MS, Thermo Scientific (30 m x 0.25 mm I.D. 0.25 µm film thickness)

1.2 Metodi

Metodo GC-MS

Il programma di riscaldamento del gascromatografo è stato ottimizzato come segue sulla colonna TG-5MS: temperatura iniziale 40 °C con mantenimento di 1 min; incremento di 2 °C/min fino a 80 °C con mantenimento di 0.1 min; incremento di 3 °C/min fino a 120 °C con mantenimento di 0.1 min; incremento di 6 °C/min fino a 200 °C con mantenimento di 0.1 min; infine incremento di 10 °C/min fino a 250 °C con mantenimento di 0.93 min, per un tempo totale di corsa pari a 54 min.

L'identificazione dei composti è stata effettuata in modalità TIC (Total Ion Current), confrontando gli spettri ottenuti con la libreria in dotazione allo strumento e con quelli disponibili nel database NIST, con intervallo di scansione compreso tra 40 e 350 m/z. Le misure quantitative, comprensive di calibrazione, validazione e analisi dei campioni reali, sono state condotte in modalità SIM (Selected Ion Monitoring), monitorando gli ioni caratteristici riportati nell'elenco sottostante.
Per l'elaborazione statistica dei dati è stato utilizzato OriginPro, versione 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

- α-pinene: m/z 91
- 6-methyl-5-hepten-2-one: m/z 108
- myrcene: m/z 93
- (+)-2-carene: m/z 136
- (R)-(+)-limonene: m/z 68
- ocimene: m/z 79
- terpinolene: m/z 93, 121
- linalool: m/z 71
- methyl salicylate: m/z 120
- (-)-β-elemene: m/z 107
- jasmonic acid (jasmonate): m/z 110
- (-)-trans-caryophyllene: m/z 133
- α-humulene: m/z 93
- trans-β-farnesene: m/z 69
- methyl jasmonate: m/z 151

Validazione del metodo

La validazione del metodo è stata eseguita seguendo procedure statistiche consolidate. Per la calibrazione sono stati preparati sei livelli di concentrazione per ciascun analita, nei range riportati in Risultati e Discussione, con cinque repliche per ogni livello. I modelli di regressione ottenuti sono stati verificati tramite analisi della varianza a una via (ANOVA) (1,2). L'eventuale mancanza di adattamento del modello (lack of fit) è stata valutata mediante test F, calcolando il rapporto Fcalc = MS_{LOF} / MS_{PE} e confrontandolo con i valori critici della distribuzione F di Snedecor, con k–2 (dove k è

il numero di livelli di concentrazione) e n–k gradi di libertà (n il numero di repliche, come specificato in Risultati e Discussione).

La significatività dell'intercetta è stata verificata attraverso test t di Student a due code al 95% di confidenza, con n–2 gradi di libertà. I limiti di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati a partire dalla deviazione standard del bianco (σ) e dalla pendenza della retta di calibrazione (S), secondo le relazioni 1 e 2 (3).

$$LOD = 3\sigma/S \quad (1)$$

$$LOQ = 10\sigma/S \quad (2)$$

La precisione è stata stimata in termini di ripetibilità intra-giornaliera (RSD_r) e inter-giornaliera (RSD_R). Sono stati considerati tre livelli di concentrazione (alto: 1500 µg/L; medio: 50 µg/L; basso: 5 µg/L, rispetto all'intero intervallo di calibrazione), ciascuno analizzato in sei repliche sia nello stesso giorno sia in giorni differenti. RSD_r e RSD_R sono stati calcolati come deviazione standard relativa (RSD) in funzione della concentrazione C, espressa come frazione di massa, utilizzando le equazioni 3 e 4 proposte nelle linee guida AOAC (4):

$$RSD_r = C^{-0.15} \quad (3)$$

$$RSD_R = 2C^{-0.15} \quad (4)$$

Per ogni livello di concentrazione è stato inoltre definito un intervallo di accettabilità, ottenuto applicando le stesse equazioni considerando C pari a metà e al doppio del valore atteso.

L'accuratezza del metodo è stata valutata analizzando cinque repliche indipendenti ottenute per diluizione di uno standard certificato a 50.00 µg/L, contenente sette degli analiti studiati (α-pinene, myrcene, (R)-(+)-limonene, terpinolene, (-)-trans-caryophyllene, α-humulene). I risultati sono stati confrontati con i valori dichiarati dal certificato mediante test t di Student a due code al 95% di confidenza, verificando l'assenza di differenze statisticamente significative.

Trattamento delle piante

Le piante di pomodoro (Solanum lycopersicum L.) utilizzate appartenevano alla varietà Heinz 1301. I semi sono stati sterilizzati lavandoli con acqua sterile per 5 minuti, quindi con una soluzione di ipoclorito di sodio al 20% per altri 5 minuti, e successivamente risciacquati tre volte con acqua sterile. Dopo la sterilizzazione, i semi sono stati pre-germinati in capsule Petri su carta da filtro Whatman, mantenute al buio a 25 °C per tre giorni. Le plantule ottenute sono state trapiantate in vasi contenenti terriccio universale (Radicom Vigor Plant®) e coltivate in serra a temperatura controllata (24–26 °C), umidità relativa pari al 65 ± 5% e fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. In tutti gli esperimenti le piante sono state utilizzate cinque settimane dopo la germinazione.

Quattro settimane dopo l'emergenza, le piante sono state inoculate individualmente con tre diversi ceppi di Trichoderma (Tr) (Fungi: Ascomycota) isolati presso l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), sede di Portici. Per il trattamento fungino, a ciascuna pianta sono stati somministrati 20 mL di una sospensione contenente 10^7 conidiospore/mL in soluzione di solfato di magnesio ($MgSO_4$) 0.1 M. Le piante di controllo sono state trattate con 20 mL della sola soluzione di $MgSO_4$ 0.1 M. Le piante trattate e di controllo sono state impiegate per le prove biologiche una settimana dopo l'inoculazione.

Raccolta dei VOCs e analisi

Per garantire una raccolta affidabile e riproducibile dei composti volatili emessi dalle piante, è stato impiegato un sistema di raccolta a circuito chiuso ermetico (airtight entrainment system, Figura 29A e 29B). Il dispositivo è costituito da vasi in vetro da 20 L contenenti cinque piante di pomodoro di cinque settimane (varietà Heinz 1301), collegati a una pompa di ricircolo che manteneva un flusso costante di 200 $cm^3\ min^{-1}$. Prima di rientrare nella pompa, l'aria passa attraverso una cartuccia adsorbente riutilizzabile, costituita da un tubo di vetro (100 × 0,4 mm di diametro interno) riempito con 35 mg di Tenax®. Questo sistema consente di isolare le piante dall'ambiente esterno e di convogliare il volatiloma attraverso una cartuccia

adsorbente in condizioni controllate. I composti intrappolati vengono successivamente eluiti mediante estrazione dinamica con solvente per l'analisi GC–MS.

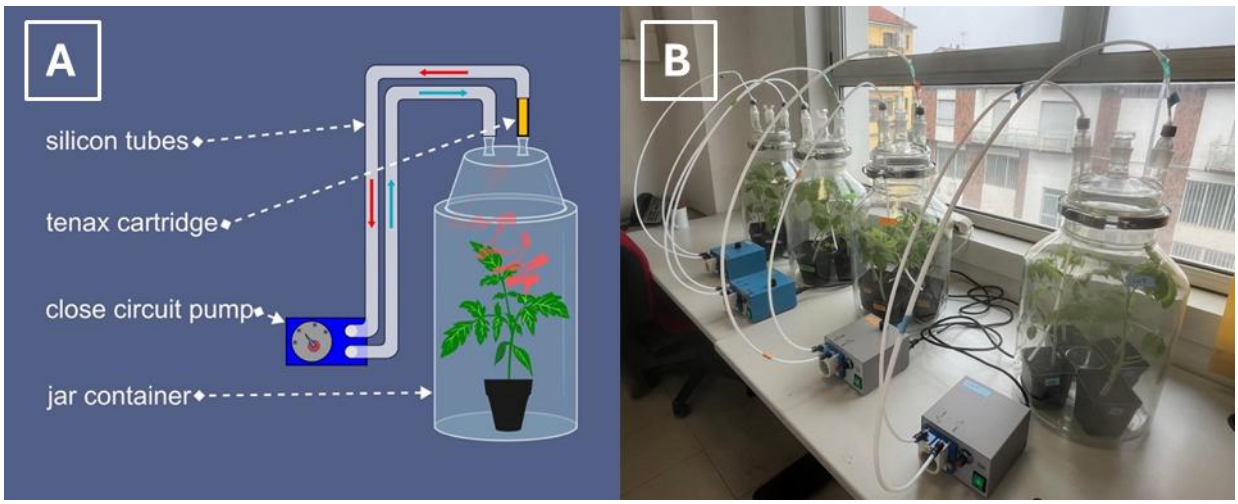


Figura 29. A) Schema raffigurante il sistema di raccolta dei VOCs; B) Piante di pomodoro inserite nel sistema durante la raccolta

L'intero processo di raccolta del volatiloma è stato articolato in due fasi principali:

(1) fase di adsorbimento, durante la quale i composti organici volatili (VOCs) venivano trattenuti sulla cartuccia durante il periodo di esposizione delle piante;

(2) fase di desorbimento, in cui gli analiti venivano eluiti con un solvente organico in vista dell'analisi strumentale.

Prima di ogni raccolta, è stato acquisito un campione bianco esponendo una cartuccia pulita al sistema vuoto. Le variabili sperimentali ottimizzate includevano la scelta del materiale adsorbente, il numero di piante all'interno del sistema, il tempo di esposizione, il solvente di eluizione e il volume impiegato per l'estrazione.

La selezione del materiale adsorbente rappresenta un fattore critico per la selettività del campionamento dei VOC. In letteratura sono riportati diversi materiali, tra cui carbone attivo, adsorbenti a base di silice, Tenax® e Porapak®. In questo studio, la scelta è stata guidata da due criteri principali: (i) le condizioni ambientali di campionamento, caratterizzate da un'elevata umidità relativa necessaria per mantenere il sistema biologico (coltura di pomodoro), e (ii) la natura chimica degli analiti target (5).

Sono stati testati due adsorbenti, Tenax® e Porapak®, in combinazione con esano e acetone come solventi di eluizione. Sulla base dei risultati preliminari, solo il Tenax® è stato scelto per gli esperimenti successivi. Prima dell'uso, le cartucce sono state pulite con 5 mL di acetone.

Gli esperimenti di raccolta del volatiloma sono stati condotti utilizzando tre o cinque piante di pomodoro e tempi di esposizione di 3, 5 o 7 ore. L'eluizione è stata effettuata con esano o acetone, in volumi compresi tra 0.5 e 2.0 mL. Sono stati inoltre condotti test per ottimizzare la rigenerazione delle cartucce di Tenax® al fine di consentirne il riutilizzo. I protocolli di rigenerazione includevano l'eluizione con 3,0 o 5,0 mL di esano o acetone, seguita dall'evaporazione del solvente a temperatura moderata; quando necessario, le cartucce venivano lasciate asciugare in stufa ventilata a 60 °C per una notte.

Le condizioni ottimali individuate sono risultate le seguenti: raccolta di 5 ore e desorbimento immediato mediante 1.5 mL di esano. Le soluzioni eluite sono state sigillate e conservate a –20 °C fino all'analisi GC–MS.

L'efficienza del metodo di raccolta è stata valutata mediante un test di recupero, volatilizzando 1.00 mL di una soluzione standard contenente 50.00 mg/L degli analiti nel sistema a circuito chiuso, in quattro repliche, e calcolando il recupero secondo le linee guida AOAC (4), applicando l'equazione 5:

$$Recupero\ \% = C_{meas} / C_{calc} * 100 \qquad (5)$$

Dove C_{meas} rappresenta la concentrazione ottenuta sperimentalmente e C_{calc} la concentrazione teorica attesa.

Questo passaggio è stato eseguito per valutare l'efficienza complessiva della procedura di campionamento e desorbimento dei VOC.

Prima dell'analisi GC–MS, i campioni sono stati filtrati con filtri in PTFE a porosità 0.22 µm. Dopo il desorbimento, le cartucce sono state rigenerate mediante tre eluizioni consecutive con 3.0 mL di esano puro e successiva essiccazione in stufa ventilata a 60 °C per una notte.

I dati ottenuti dall'analisi del volatiloma sono stati elaborati statisticamente mediante analisi della varianza a una via (ANOVA) (2); ove necessario, le differenze significative

tra i gruppi sono state verificate con test post-hoc di Tukey (6), considerando livelli di significatività pari a 0,05 o 0,1.

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

Ottimizzazione del metodo cromatografico

La Figura 30 mostra il confronto tra il cromatogramma ottenuto impiegando una colonna ZB-Wax con fase stazionaria a base di polietilenglicole (PEG), utilizzata nei test preliminari (Figura 30A), e quello ottenuto con una colonna a polarità intermedia, come suggerito da Shapira et al. (7) (Figura 30B). Come si può osservare nella Figura 30A, la colonna PEG non ha garantito una separazione soddisfacente degli analiti: il picco relativo all'α-pinene (picco 1) eluisce in corrispondenza del fronte del solvente, impedendo una quantificazione accurata; inoltre, α-humulene e trans-β-farnesene (picchi 13 e 14) mostrano una parziale sovrapposizione, mentre (-)-trans-caryophyllene e (-)-β-elemene (picchi 10 e 12) risultano coeluiti. Tali problematiche derivano dalla natura fortemente polare della fase stazionaria PEG, non adatta alla risoluzione di composti prevalentemente apolari o scarsamente polari come i terpeni e i loro derivati ossigenati.

L'impiego di una colonna non polare TG-5MS, in combinazione con l'ottimizzazione dei parametri cromatografici (programmazione della temperatura, flusso del gas di trasporto e modalità di iniezione), ha invece consentito di ottenere una separazione nettamente più efficiente, come evidenziato nella Figura 30B. Tutti gli analiti risultano ben risolti in circa 54 minuti di corsa, con un marcato miglioramento del rapporto segnale/rumore e una riduzione significativa delle coeluzioni osservate nei test precedenti. La risoluzione dei picchi terpenici maggiormente critici, come (-)-trans-cariofillene, α-humulene e trans-β-farnesene, ha reso possibile una quantificazione più accurata e riproducibile, migliorando la robustezza complessiva del metodo.

Questi risultati hanno portato alla decisione di sostituire la colonna originariamente prevista con la TG-5MS, che si è dimostrata più adatta all'analisi dei composti organici volatili del pomodoro. Tale scelta è stata supportata non solo dalle migliori prestazioni cromatografiche ottenute, ma anche dalla maggiore compatibilità della fase non polare con la natura chimica degli analiti oggetto di studio, caratterizzati prevalentemente da idrocarburi, terpeni e derivati ossigenati di bassa polarità.

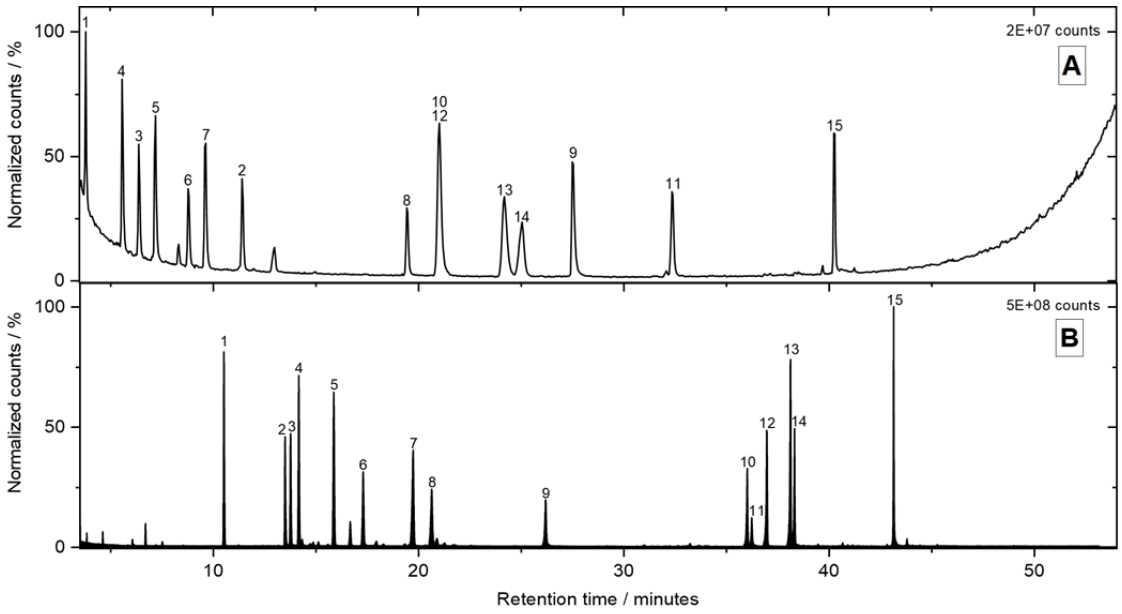


Figura 30. A) Corsa cromatografica effettuata con colonna ZB-Wax (carattere polare); B) corsa cromatografica con colonna TG-5MS (carattere semi-polare). Assegnazione dei picchi: 1: α-pinene, 2: 6-methyl-5-hepten-2-one; 3: myrcene; 4: (+)-2-carene; 5: (R)-(+)-limonene; 6: ocimene; 7: terpinolene; 8: linalool; 9: methyl salicylate; 10: (-)-β-elemene; 11: jasmone; 12: (-)-trans-caryophyllene; 13: α-humulene; 14: trans-β-farnesene; 15: methyl jasmonate.

Validazione del metodo

Seguendo le linee guida AOAC e IUPAC, è stata eseguita la validazione primaria del metodo, comprendente la valutazione delle principali figure di merito e delle prestazioni analitiche complessive. Sono stati considerati i parametri di linearità, limiti di rivelazione, limiti di quantificazione, ripetibilità intra-giornaliera, ripetibilità inter-giornaliera, e accuratezza.

La linearità è stata verificata per ciascun analita mediante curve di calibrazione costruite su sei livelli di concentrazione. I modelli di regressione sono risultati soddisfacenti, con coefficienti di determinazione (R^2) sempre superiori a 0.9912, a conferma della buona correlazione tra segnale strumentale e concentrazione (Tabella 2). L'assenza di intercette significative è stata confermata tramite t-test di Student, in quanto i valori calcolati di t risultano sempre inferiori a quelli tabulati, indicando che la retta di calibrazione passa per l'origine (Tabella 2).

I limiti di rivelazione e di quantificazione, calcolati a partire dalla deviazione standard del bianco e dalla pendenza della retta di calibrazione, risultano sempre inferiori a 4 μg L^{-1} e 9 μg L^{-1} rispettivamente, evidenziando la buona sensibilità del metodo.

Tabella 2. Figure di merito e equazioni dei modelli di calibrazione per ciascun analita (n = 18 repliche; ** n = 17 repliche; *** n = 15 repliche)*

Analiti	**Range di calibrazione (μg/L)**	***Equazione del modello***	***Significatività dell' intercetta***		**R^2**	**LOD (μg/L)**	**LOQ (μg/L)**
			t_{calc}	**t_{tab}**			
α-pinene*	9 – 1290	$(162 \pm 1)\cdot 10^4 x$	0.023	2.120	0.9989	4	9
6-methyl-5-hepten-2-one*	0.9 – 1290	$(131 \pm 1)\cdot 10^4 x$	1.754	2.120	0.9985	0.3	0.7
Myrcene*	0.79 – 1190	$(274 \pm 3)\cdot 10^4 x$	1.731	2.120	0.9984	0.08	0.16
(+)-2-carene*	0.86 – 1290	$(1064 \pm 6)\cdot 10^3 x$	1.195	2.120	0.9994	0.13	0.28
(R)-(+)-limonene*	4.2 – 1260	$(268 \pm 2)\cdot 10^4 x$	0.935	2.120	0.9988	0.5	1.2
Ocimene**	4.1 – 1230	$(318 \pm 3)\cdot 10^3 x$	1.637	2.131	0.9983	1.8	5.0
Terpinolene*	0.86 – 1290	$(167 \pm 1)\cdot 10^4 x$	1.257	2.120	0.9994	0.13	0.31
Linalool***	4 – 1300	$(179 \pm 2)\cdot 10^4 x$	1.741	2.160	0.9975	1	3
Methyl salicylate*	1.20 – 1760	$(21 \pm 1\cdot 10^5 x + (52 \pm 8)\cdot 10^4 x^2$	0.942	2.120	0.9985	0.36	0.87
(-)-β-elemene*	8.6– 1290	$(21 \pm 1)\cdot 10^4 x + (55 \pm 10)\cdot 10^3 x^2$	0.824	2.120	0,9984	2.3	6.5
Jasmone*	4.7 – 1410	$(45 \pm 1)\cdot 10^4 x$	1.471	2.120	0.9912	0.4	1.1
(-)-trans-caryophyllene*	4.5 – 1350	$(901 \pm 10)\cdot 10^3 x$	1.741	2.120	0.9980	1.5	3.7
α-humulene*	0.9 – 1330	$(822 \pm 9)\cdot 10^3 x$	1.789	2.120	0.9982	0.3	0.8
Trans-β-farnesene*	4.0 – 1210	$(22\pm 1)\cdot 10^5 x + (7\pm 1)\cdot 10^5 x^2$	0.304	2.120	0.9982	1.4	3.8
Methyl jasmonate*	5.1 – 1540	$(36 \pm 2)\cdot 10^4 x + (8 \pm 1)\cdot 10^4 x^2$	0.920	2.120	0.9986	1.2	2.8

L'adeguatezza dei modelli di regressione è stata valutata tramite analisi della varianza a una via (One-Way ANOVA). Come riportato in Tabella 3, i valori di F calcolati (F_{calc}) sono risultati sempre superiori ai valori tabulati (F_{reg}), confermando la validità dei modelli di regressione lineare. Tuttavia, il test di Lack of Fit ha evidenziato che per quattro analiti — methyl salicylate, β-elemene, β-farnesene e methyl jasmonate — il

modello lineare non era adeguato; in tali casi è stato quindi applicato un modello di secondo ordine, successivamente rivalutato tramite ANOVA, i cui risultati sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Informazioni statistiche per la validazione del metodo (n = 18 repliche; ** n = 17 repliche; *** n = 15 repliche)*

Analiti	***ANOVA***			
	Regression		***Lack of fit***	
	F_{calc}	F_{REG}	F_{calc}	F_{LoF}
α-pinene*	15295.9	4.494	0.219	3.259
6-methyl-5-hepten-2-one*	11121.0	4.494	1.928	3.259
Myrcene*	10591.9	4.494	1.473	3.259
(+)-2-carene*	28605.5	4.494	0.276	3.259
(R)-(+)-limonene*	12763.5	4.494	0.207	3.259
Ocimene**	9210.0	4.543	1.818	3.357
Terpinolene*	26694.3	4.494	0.289	3.259
Linalool***	5328.7	4.667	2.711	3.633
Methyl salicylate*	5238.5	3.682	0.279	3.259
(-)-β-elemene*	4923.9	3.682	0.185	3.259
Jasmone*	1813.7	4.494	2.370	3.259
(-)-trans-caryophyllene*	8189.4	4.494	1.994	3.259
α-humulene*	9004.1	4.494	2.181	3.259
Trans-β-farnesene*	4300.1	3.682	0.188	3.259
Methyl jasmonate*	5554.6	6.944	0.268	3.259

La precisione è stata valutata in termini di ripetibilità intra-giornaliera (RSDr) e inter-giornaliera (RSDR). Come riportato in Tabella 4, i valori di RSDr ottenuti ai tre livelli di concentrazione analizzati rientrano negli intervalli di accettabilità per tutti gli analiti considerati. Analogamente, la precisione intermedia (RSDR), valutata su giorni diversi e da operatori differenti, è risultata anch'essa entro i limiti accettabili, ad eccezione del methyl jasmonate, non rilevato al livello di concentrazione più basso. Nel complesso, il metodo risulta preciso e robusto, mostrando una buona ripetibilità e riproducibilità all'interno dell'intervallo di calibrazione.

I risultati dell'accuratezza sono riportati in Tabella 4 come media di cinque repliche indipendenti. La verifica statistica, condotta mediante t-test di Student a due code al 95% di livello di confidenza, ha mostrato che in tutti i casi il valore tabulato di t (t_{tab}) è superiore a quello calcolato (t_{calc}), indicando che le concentrazioni sperimentali non differiscono significativamente dai valori certificati. L'accuratezza del metodo può pertanto considerarsi pienamente soddisfacente.

Tabella 4. Valori ottenuti per la valutazione di precisione e accuratezza (trueness)

Precision evaluation							Accuracy			
	Repeatibility (RSD_r)			Interlaboratory precision (RSD_R)			Experimental	Certified	t_{tab}	t_{calc}
Analytes	Low level	Medium level	High level	Low level	Medium level	High level	(ug/L)	(ug/L)		
α-pinene	16.69 (9.09 – 36.37)	13.43 (4.56 – 18.23)	7.84 (3.82 – 15.27)	15.82 (9.09 – 36.37)	12.30(7.38 – 29.54)	7.27 (3.44 – 13.76)	2.31±0.09 ·10^6	2.5±0.1 ·10^6	2.776	1.578
6-methyl-5-hepten-2-one	19.67 (9.09 – 36.37)	14.18 (4.56 – 18.23)	7.80 (3.82 – 15.27)	19.10(8.19 – 32.78)	13.24 (7.38 – 29.54)	7.39 (3.44 – 13.76)				
myrcene	20.18 (9.09 – 36.37)	14.70 (4.56 -18.23)	8.06 (3.82 – 15.27)	19.50 (8.19 – 32.78)	13.90 (7.38 -29.54)	7.57 (3.44 -13.76)	2.25±0.07 ·10^6	2.5±0.1 ·10^6	2.776	1.997
(+)-2-carene	19.22 (9.09 – 36.37)	13.84 (4.56 – 18.23)	7.85 (3.82 – 15.27)	18.38 (8.19 – 32.78)	12.84 (7.38 – 29.54)	7.35 (3.44 – 13.76)				
(R)-(+)-limonene	18.84 (9.09 – 36.37)	14.08 (4.56 – 18.23)	7.92 (3.82 – 15.27)	18.27 (8.19 – 32.78)	13.11 (7.38 – 29.54)	7.40 (3.44 – 13.76)	2.10±0.06 ·10^6	2.5±0.1 ·10^6	2.776	2.130
ocimene	18.98 (9.09 – 36.37)	14.45 (4.56 – 18.23)	7.98 (3.82 – 15.27)	18.44 (8.19 – 32.78)	13.39(7.38 – 29.54)	7.43 (3.44 – 13.76)				
terpinolene	19.03 (9.09 – 36.37)	13.85 (4.56 – 18.23)	7.83 (3.82 – 15.27)	18.40 (8.19 – 32.78)	12.94 (7.38 – 29.54)	7.32 (3.44 – 13.76)	2.07±0.06 ·10^6	2.5±0.1 ·10^6	2.776	2.354
linalool	17.96 (9.09 – 36.37)	14.32 (4.56 – 18.23)	7.84 (3.82 – 15.27)	17.67 (8.19 – 32.78)	13.29 (7.38 – 29.54)	7.40 (3.44 – 13.76)	2.40±0.05 ·10^6	2.5±0.1 ·10^6	2.776	0.645
methyl salicylate	19.33 (8.55 – 34.22)	13.72 (6.06 – 24.23)	7.13 (3.64 – 14.55)	18.95 (7.71 – 30.84)	12.70 (5.46 – 21.83)	6.64 (3.28 – 13.11)				
(-)-β-elemene	20.80 (9.09 – 36.37)	14.56 (4.56 – 18.23)	7.81 (3.82 – 15.27)	18.65 (8.19 – 32.78)	13.71 (7.38 – 29.54)	7.22 (3.44 – 13.76)				
jasmone	20.94 (8.7 – 35.17)	14.98 (6.22– 24.90)	7.62 (3.78 – 15.10)	-	14.18 (5.61 – 22.44)	7.26 (3.40 – 13.61)				
(-)-trans-caryophyllene	19.81 (8.7 – 35.17)	14.19 (6.22– 24.90)	7.71 (3.78 – 15.10)	19.32 (8.19 – 32.78)	13.33 (5.61 – 22.44)	7.23 (3.40 – 13.61)	2.00±0.04 ·10^6	2.5±0.1 ·10^6	2.776	0.933
α-humulene	19.87 (9.09 – 36.37)	14.20 (4.56 – 18.23)	7.73 (3.82 – 15.27)	19.12 (8.19 – 32.78)	13.21 (7.38 – 29.54)	7.14 (3.44 – 13.76)	2.30±0.05 ·10^6	2.5±0.1 ·10^6	2.776	1.524
trans-β-farnesene	17.64 (9.09 – 36.37)	14.78 (4.56 – 18.23)	7.70 (3.82 – 15.27)	17.43 (8.19 – 32.78)	14.01 (7.38 – 29.54)	7.26 (3.44 – 13.76)				
methyl jasmonate	25.90 (8.79 – 35.17)	18.30 (6.22 – 24.90)	9.44(3.42 – 14.95)	24.78 (7.92 – 31.70)	16.91 (5.61 – 22.44)	8.56 (3.37 – 13.47)				

Ottimizzazione della raccolta dei VOCs

Come già evidenziato, la raccolta del volatiloma delle piante è una procedura complessa e altamente sensibile, che richiede un sistema in grado di isolare l'organismo vegetale dall'ambiente esterno e di garantire una raccolta accurata e riproducibile di tutte le molecole emesse. In questo lavoro tale obiettivo è stato raggiunto grazie all'impiego di un sistema di raccolta a circuito chiuso ermetico (airtight entrainment system, Figura 29), nel quale volumi noti di aria contenente il volatiloma emesso dalle piante in atmosfera controllata vengono convogliati attraverso una cartuccia adsorbente. I composti trattenuti vengono successivamente eluiti mediante estrazione dinamica con solvente organico per l'analisi mediante GC–MS.

L'ottimizzazione del sistema di raccolta è stata condotta confrontando i volatiloma ottenuti da piante di pomodoro non trattate, variando le condizioni sperimentali principali: tipo di materiale adsorbente, numero di piante nel sistema di raccolta, tempo di esposizione, tipo e volume del solvente di eluizione.

La scelta del materiale adsorbente rappresenta un fattore critico per la selettività e l'efficienza del campionamento dei VOC. In letteratura sono ampiamente riportati diversi materiali, tra cui carbone attivo, adsorbenti a base di silice, Tenax® e Porapak®. In questo studio, la selezione è stata guidata da due parametri fondamentali: le condizioni ambientali di campionamento, caratterizzate da un'elevata umidità relativa necessaria per mantenere il sistema biologico (coltivazione del pomodoro), e la natura chimica degli analiti target (5).

Sono stati quindi testati due sorbent, Tenax® e Porapak®, in combinazione con due diversi solventi di eluizione, esano e acetone. Il Tenax® (poli(2,6-difenil-p-fenilene ossido)) è ampiamente utilizzato per il campionamento di idrocarburi e terpeni a media volatilità grazie alla buona stabilità termica e all'inerzia chimica. Sebbene presenti alcune limitazioni nel trattenere composti molto leggeri o fortemente polari, è stato preferito per la sua comprovata stabilità in condizioni di umidità variabile, che lo rende più affidabile rispetto ai materiali a base di silice, come SBA-15 e MCM-41 (8). Il Porapak® (copolimero stirene-divinilbenzene) offre invece una maggiore capacità di ritenzione, estesa anche ad aldeidi e alcoli, ma ha mostrato una più elevata sensibilità all'umidità e la tendenza a introdurre contaminanti se non adeguatamente condizionato. Inoltre, durante i test preliminari, il Porapak® si è rivelato difficile da

confezionare e non ha consentito di ottenere cromatogrammi bianchi puliti, anche dopo ripetute fasi di lavaggio.

Sulla base di questi risultati, solo il Tenax® è stato scelto per i successivi esperimenti. Prima dell'uso, le cartucce sono state accuratamente pulite mediante lavaggio con 5 mL di acetone, come mostrato in Figura 31.

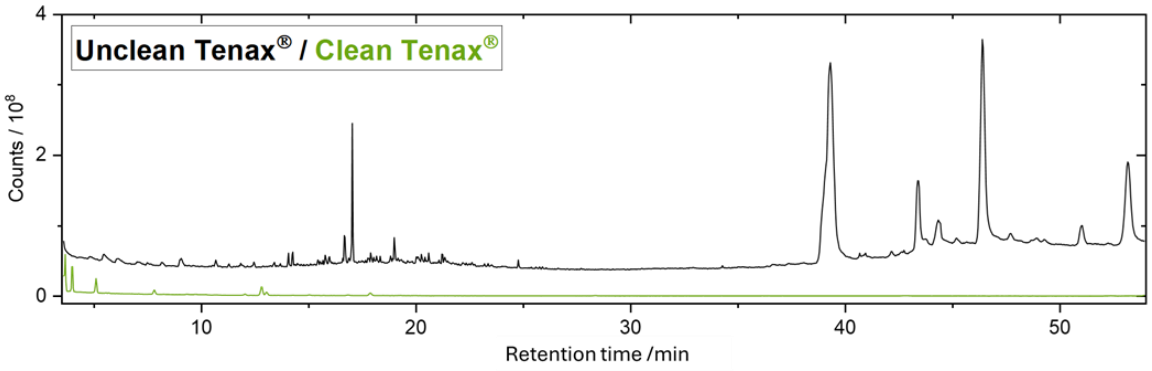


Figura 31. Cromatogrammi di confronto tra pre (Unclean Tenax ® - nero) e post (Clean Tenax ® - verde) pulizia delle cartucce

Il processo di raccolta è articolato in due fasi principali:

(i) una fase di adsorbimento, durante la quale la cartuccia è esposta al flusso del volatiloma, e

(ii) una fase di desorbimento, in cui gli analiti vengono recuperati per eluizione con solvente e successiva analisi GC–MS.

Ogni esperimento è stato preceduto dall'acquisizione di un bianco, ottenuto esponendo una cartuccia pulita al sistema privo di piante. Per la fase di raccolta sono stati ottimizzati il numero di piante e il tempo di esposizione: gli esperimenti sono stati condotti utilizzando tre o cinque piante nel sistema (quest'ultimo rappresenta il numero massimo consentito dal volume del dispositivo), e raccogliendo il volatiloma per 3.0, 5.0 o 7.0 ore.

Per la fase di eluizione, sono stati valutati differenti volumi di solvente (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mL) utilizzando esano e acetone. Sono stati inoltre eseguiti test per ottimizzare la rigenerazione delle cartucce di Tenax® in vista del riutilizzo, mediante eluizione con 3.0 o 5.0 mL di esano o acetone, seguita dall'evaporazione del solvente a temperatura moderata e, quando necessario, dall'essiccazione in stufa ventilata a 60 °C per una notte.

Le condizioni ottimali individuate sono risultate essere l'impiego di cinque piante e un tempo di esposizione di cinque ore: l'estensione a sette ore non ha prodotto differenze significative, consentendo una riduzione del tempo di campionamento senza perdita di efficienza. L'esano si è dimostrato il solvente più efficace sia per la fase di eluizione sia per la pulizia delle cartucce, come mostrato in Figura 32, garantendo una buona resa e un basso livello di rumore di fondo. Per il desorbimento, il miglior compromesso tra resa e concentrazione è stato ottenuto utilizzando 1.5 mL di esano.

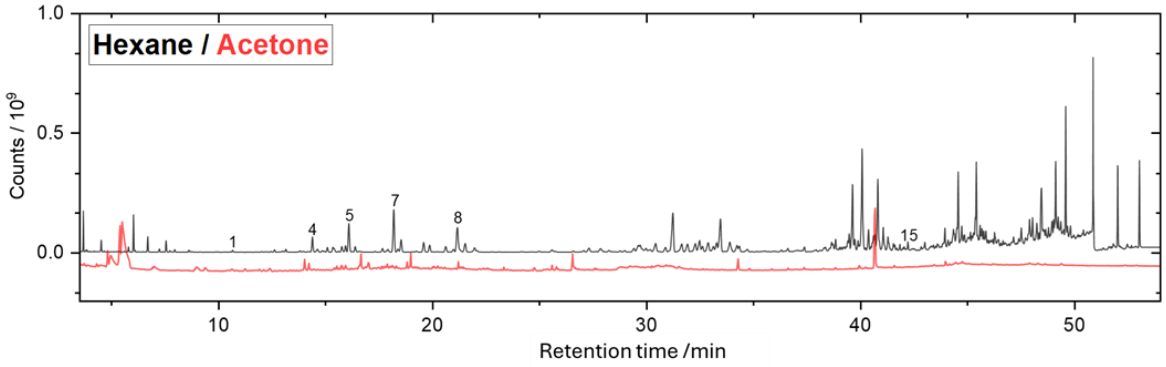


Figura 32. Cromatogrammi di confronto tra eluizione in esano (nero) e acetone (rosso)

Per assicurare la riutilizzabilità del sorbent, le cartucce sono state rigenerate mediante tre eluizioni consecutive con 3.0 mL di esano puro, seguite da essiccazione in stufa ventilata a 60 °C per una notte (Figura 33).

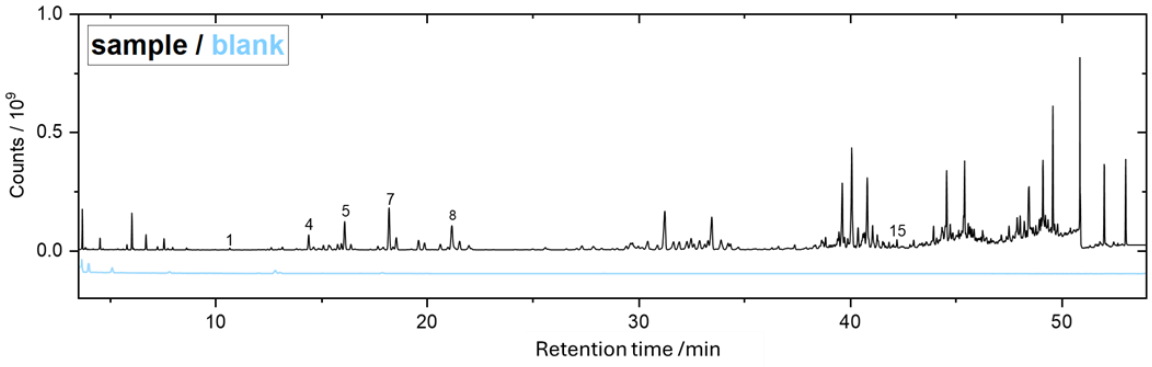


Figura 33. Cromatogrammi di confronto tra campione reale (nero) e bianco di procedura (azzurro)

La procedura di eluizione è stata infine sottoposta a una prova di recupero, poiché le numerose fasi del processo di campionamento e desorbimento possono comportare perdite di analita. A tale scopo sono state utilizzate tre concentrazioni di una soluzione standard mista (alta: 1500 µg/L; media: 50 µg/L; bassa: 5 µg/L). I risultati, riportati in Tabella 5, evidenziano percentuali di recupero relativamente basse, indicando che

una parte dei composti volatili tende a disperdersi o a degradarsi lungo la catena analitica.

Tali perdite possono derivare da diversi fattori: desorbimento incompleto degli analiti dalla fase adsorbente, parziale volatilizzazione durante l'evaporazione del solvente, o interazioni residue tra le molecole più polari e la superficie del Tenax®. Anche la volatilità e la diversa affinità dei composti per il solvente possono contribuire a un recupero disomogeneo tra analiti. In particolare, i VOC a bassa massa molecolare e più polari mostrano in genere una minore efficienza di estrazione, come riportato anche in letteratura per sistemi di campionamento analoghi.

Nonostante tali limitazioni, la valutazione del recupero rappresenta un passaggio cruciale per la correzione dei dati quantitativi, poiché consente di normalizzare le risposte strumentali e migliorare l'accuratezza delle determinazioni. Inoltre, la conoscenza dei fattori che influenzano il recupero fornisce indicazioni utili per future ottimizzazioni del protocollo, ad esempio mediante l'impiego di solventi con maggiore capacità eluente per i composti più polari, la riduzione del tempo di evaporazione o l'integrazione di una fase di desorbimento termico controllato.

Più che ottenere i valori di recupero più elevati possibile, questa fase è stata finalizzata a dimostrare la consistenza e la riproducibilità del metodo, verificando che il protocollo di raccolta e desorbimento fosse stabile e affidabile nel tempo, anche in presenza di piccole variazioni operative.

Tabella 5. Recuperi medi e deviazioni standard per il processo di raccolta dei VOCs

Analiti	Recupero medio (%)	Std. dev.
α-pinene	42	4
6-methyl-5-hepten-2-one	29	3
myrcene	31	3
(+)2-carene	37	3
(R)-(+)-limonene	33	3
ocimene	30	3
terpinolene	32	3
linalool	22	2
methyl salicylate	52	4
(-)-β-elemene	42	4
jasmone	8	1
(-)-trans-caryophyllene	20	2
α-humulene	23	2
trans-β-farnesene	25	2
methyl jasmonate	25	2

Analisi sul volatiloma di piante di pomodoro

A seguito dell'ottimizzazione e della validazione, l'intero metodo — comprendente le fasi di raccolta, eluizione e analisi cromatografica — è stato applicato a un caso reale. I campioni di volatiloma sono stati raccolti da piante di pomodoro coltivate secondo il metodo convenzionale (indicato come CNT, usato come riferimento) e da piante sottoposte a trattamento mediante inoculazione di ceppi di *Trichoderma* su tre diversi gruppi sperimentali (TR1, TR2 e TR3). Per ciascun trattamento sono state effettuate dieci raccolte indipendenti del volatiloma, considerate repliche genuine, utilizzando il sistema di raccolta ermetico precedentemente descritto.

I valori medi, accompagnati dalle relative deviazioni standard, sono riportati in Tabella 6. Tutte le concentrazioni rientrano nell'intervallo di linearità definito in fase di validazione, mentre in alcuni casi il trans-β-farnesene ha mostrato valori inferiori al limite di rivelazione. Dall'analisi dei dati emergono alcuni tratti comuni: (+)-2-carene, (R)-(+)-limonene, linalool e methyl jasmonate sono risultati gli analiti presenti in concentrazioni più elevate in tutti i campioni, sebbene con ampia variabilità tra le repliche, come indicato dai valori relativamente alti delle deviazioni standard.

Nonostante questa variabilità, il test di significatività statistica ha evidenziato alcune tendenze distintive nei livelli degli analiti tra il controllo e i diversi trattamenti. In particolare, linalool risulta presente in concentrazioni più elevate nei campioni di controllo e tende a diminuire nei campioni trattati con *Trichoderma*. Al contrario, (+)-2-carene e (R)-(+)-limonene mostrano un incremento marcato solo nel trattamento TR1.

Tabella 6. Media e deviazione standard delle concentrazioni di analiti rilevati nei campioni di volatiloma raccolti dalle piante di pomodoro (TR = trattamento con Trichoderma, CNT = controllo)

Analiti	TR1 (µg/L)	TR2 (µg/L)	TR3 (µg/L)	CNT (µg/L)
α-pinene	66±22	52±17	48±15	59±5
6-methyl-5-hepten-2-one	29±10	27±9	21±7	35±6
myrcene	8±3	3±1	3±1	15±6
(+)-2-carene	196±65	27±9	28±9	35±42
(R)-(+)-limonene	187±62	22±7	53±18	23±66
ocimene	28±9	27±4	36±12	44±12
terpinolene	7±2	5±2	9±3	11±3
linalool	83±32	85±28	75±25	104±22
methyl salicylate	2±1	2±1	2±1	2.1±0.1
(-)-β-elemene	16±5	33±11	32±11	25±4
jasmone	305±102	548±183	583±194	412±103
(-)-trans-caryophyllene	19±6	23±8	21±7	27±3
α-humulene	13±4	8±3	9±3	8±2
trans-β-farnesene	124±41	<LOD	<LOD	64±12
methyl jasmonate	8±3	10±3	10±3	9±2

Per valutare le differenze tra i trattamenti e il controllo è stata eseguita un'analisi della varianza a una via (One-Way ANOVA), considerando livelli di significatività pari a 0.05 e 0.1. Per tre analiti l'ipotesi nulla di uguaglianza delle medie è stata rifiutata, evidenziando differenze statisticamente significative tra alcuni gruppi. Di conseguenza è stato applicato il test post-hoc di Tukey per identificare le differenze specifiche tra coppie di trattamenti.

La Figura 34 riporta le concentrazioni dei singoli analiti sotto forma di diagrammi a barre, raggruppati per trattamento e controllo. Differenze significative al livello di confidenza del 90% sono state osservate tra TR3 e CNT per 6-methyl-5-hepten-2-one, e tra TR1/CNT e TR2/CNT per myrcene. Per (-)-β-elemene è stata invece rilevata una

differenza significativa tra TR1 e TR2 al livello di confidenza del 95%. Per gli altri analiti non sono state evidenziate differenze statisticamente significative ai livelli di confidenza considerati.

Nel complesso, pur in assenza di variazioni generalizzate per tutti i composti, le tendenze osservate suggeriscono che il trattamento con *Trichoderma* possa indurre modifiche misurabili nell'emissione dei VOCs, rilevabili mediante il metodo analitico proposto.

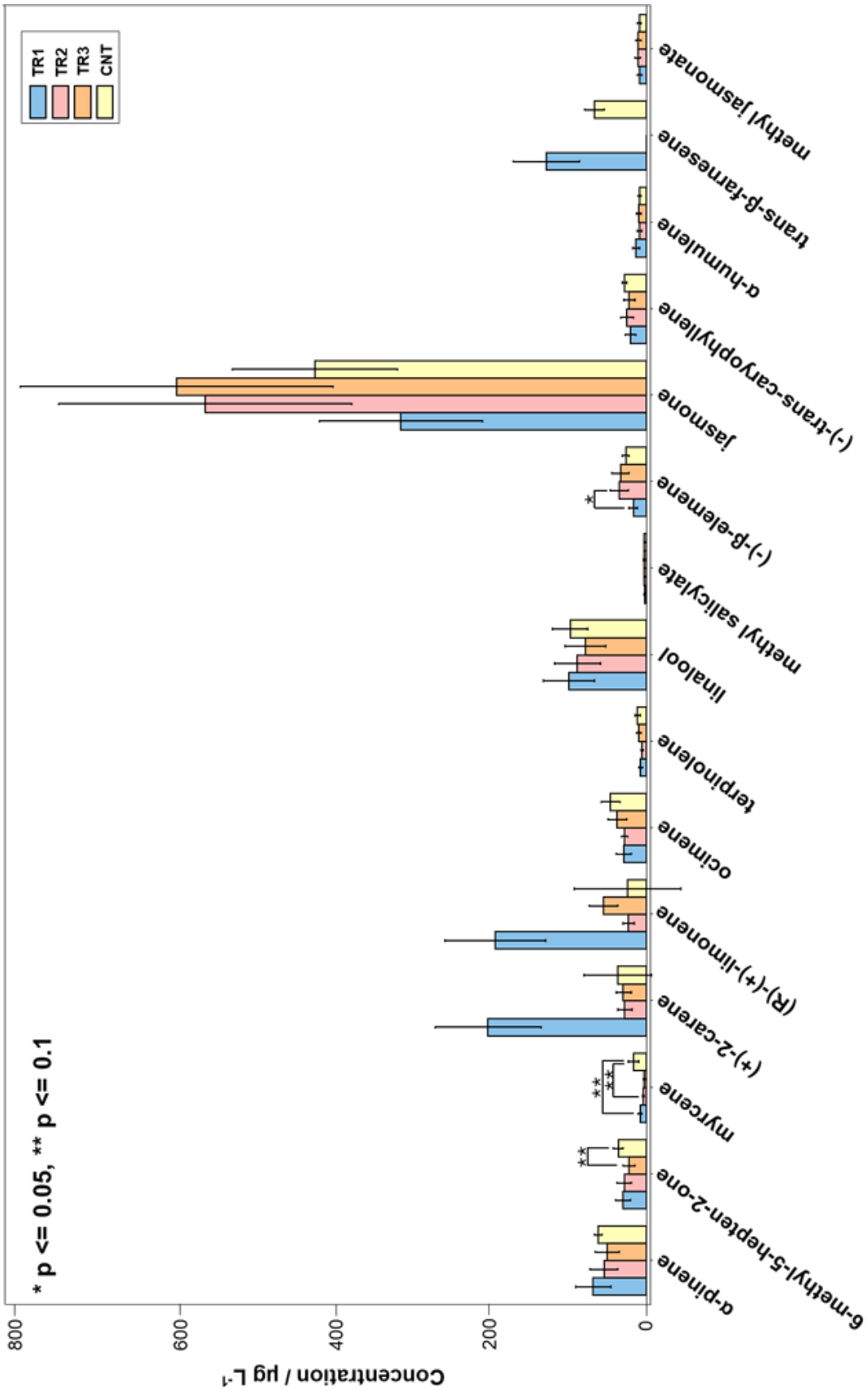


Figura 34. Grafico a barre delle medie per TR1, TR2, TR3 e CNT, con le rispettive deviazioni standard e parentesi con asterischi indicanti i risultati significativi del test post-hoc di Tukey

BIBLIOGRAFIA

1. James N. Miller, Jane C. Miller, Robert D. Miller. Calibration methods in instrumental analysis: regression and correlation. In: Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 7ª ed. Pearson; 2018. p. 138–83.

2. Massart, Vandeginste, Buydens, De Jong, Lewi, Smeyers-Verbeke. Straight line regression and calibration. In: Data Handling in Science and Technology [Internet]. 1998ª ed. Elsevier; 1998. p. 171–230. Disponibile su: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092234879780038X

3. Long GL, Winefordner JD. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. Anal Chem. 1 giugno 1983;55(7):712A-724A.

4. Horwitz W. AOAC Guidelines for Single Laboratory.

5. Makhlouf L, El Fakhouri K, Kemal SA, Aasfar A, Meftah Kadmiri I, El Bouhssini M. Advances in analytical techniques for assessing volatile organic compounds in pulse crops: a comprehensive review. Front Hortic [Internet]. 25 giugno 2024 [citato 6 ottobre 2025];3. Disponibile su: https://www.frontiersin.org/journals/horticulture/articles/10.3389/fhort.2024.1394041/full

6. Tukey JW. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. Biometrics. giugno 1949;5(2):99.

7. Shapira A, Berman P, Futoran K, Guberman O, Meiri D. Tandem Mass Spectrometric Quantification of 93 Terpenoids in *Cannabis* Using Static Headspace Injections. Anal Chem. 3 settembre 2019;91(17):11425–32.

8. Idris SA, Robertson C, Morris MA, Gibson LT. A comparative study of selected sorbents for sampling of aromatic VOCs from indoor air. Anal Methods. 2010;2(11):1803.

Conclusioni e prospettive future

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la messa a punto, l'ottimizzazione e la validazione di un metodo analitico basato sulla gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa per la determinazione e la quantificazione dei VOCs emessi da piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum*).

L'interesse verso lo studio del volatiloma vegetale nasce dalla sua centralità nei meccanismi di comunicazione chimica, nelle interazioni multitrofiche e nelle risposte di difesa delle piante agli stress biotici e abiotici. I VOCs rappresentano infatti un linguaggio chimico attraverso il quale la pianta interagisce con l'ambiente, segnalando la presenza di patogeni, erbivori o simbionti e modulando così le proprie risposte metaboliche.

In questo contesto, il pomodoro costituisce un modello sperimentale di particolare interesse, sia per la complessità del suo metabolismo secondario sia per la rilevanza agronomica e l'elevata suscettibilità a infestazioni e patogeni. Parallelamente, l'utilizzo di ceppi di *Trichoderma* come agenti di biocontrollo e promotori di crescita rappresenta una pratica di crescente importanza nella gestione sostenibile delle colture. Il lavoro ha pertanto avuto anche lo scopo di indagare l'effetto dell'inoculo di *Trichoderma* sul profilo volatile delle piante di pomodoro, con l'obiettivo di comprendere se e come l'associazione simbiontica possa influenzare l'emissione di VOCs e la comunicazione chimica pianta-ambiente.

Per raggiungere tali obiettivi, è stato progettato e costruito un sistema di raccolta a circuito chiuso ermetico (airtight entrainment system), in grado di isolare le piante dall'ambiente esterno e convogliare l'aria contenente i composti volatili attraverso una cartuccia adsorbente. Questa configurazione ha garantito un controllo preciso delle condizioni di raccolta, minimizzando le contaminazioni esterne e consentendo di lavorare in atmosfera controllata.

Sono stati testati diversi parametri sperimentali - tipo di materiale adsorbente, tempo di raccolta, volume e natura del solvente di eluizione - per identificare le condizioni più efficaci. Tra i materiali valutati, Tenax® si è dimostrato il sorbent più idoneo grazie alla sua stabilità termica, inerzia chimica e resistenza all'umidità. L'ottimizzazione del sistema ha portato a individuare condizioni operative standard affidabili: cinque piante per camera di raccolta, tempo di esposizione di cinque ore e desorbimento con 1,5 mL

di esano, solvente risultato più efficace sia per la pulizia sia per l'estrazione dei composti adsorbiti.

Parallelamente alla messa a punto del sistema di raccolta, è stata condotta una validazione completa del metodo analitico, seguendo le linee guida AOAC e IUPAC. Questa fase costituisce il vero cuore del lavoro di tesi, poiché ha trasformato una procedura sperimentale preliminare in un metodo analitico robusto, riproducibile e statisticamente validato, in grado di garantire dati quantitativi affidabili e confrontabili nel tempo.

La validazione ha interessato l'intera catena analitica - dalla raccolta al trattamento del campione fino all'analisi GC–MS - con l'obiettivo di ridurre al minimo gli errori sistematici e le variazioni di matrice. Le curve di calibrazione, costruite su sei livelli di concentrazione, hanno mostrato eccellente linearità, assenza di intercette significative e buona proporzionalità tra risposta e concentrazione. I limiti di rivelazione e di quantificazione sono risultati rispettivamente inferiori a 4 μg L^{-1} e 9 μg L^{-1}, a dimostrazione dell'elevata sensibilità del metodo.

Le prove di precisione hanno confermato la stabilità del sistema analitico: i valori di ripetibilità intra-giornaliera (RSDr) e inter-giornaliera (RSDR) rientrano pienamente negli intervalli di accettabilità previsti, attestando che il metodo mantiene un comportamento costante indipendentemente dal giorno di analisi o dall'operatore. L'accuratezza, valutata mediante soluzioni standard certificate e test t di Student a due code, ha mostrato assenza di differenze significative rispetto ai valori teorici, validando la correttezza del processo di quantificazione. Questi risultati dimostrano che il protocollo proposto è analiticamente solido, sensibile e riproducibile, e può essere applicato con successo allo studio di sistemi biologici complessi come il volatiloma vegetale. Dal punto di vista chimico-analitico, il metodo rappresenta un significativo avanzamento verso la standardizzazione di questo tipo di analisi, in cui la variabilità intrinseca del campione biologico spesso si somma a quella sperimentale, complicando l'interpretazione dei risultati. L'integrazione tra una fase di raccolta controllata e una procedura analitica validata consente di distinguere le variazioni dovute al metabolismo della pianta da quelle introdotte dal metodo stesso, migliorando la robustezza statistica e la significatività dei dati.

L'applicazione del metodo a un caso reale ha permesso di confrontare i profili volatili di piante di pomodoro coltivate in modo convenzionale (CNT) con quelli di piante trattate con tre diversi ceppi di *Trichoderma* (TR1, TR2 e TR3). I risultati hanno evidenziato che (+)-2-carene, (R)-(+)-limonene, linalool e methyl jasmonate sono i composti predominanti in tutti i campioni, pur con notevole variabilità intra-gruppo. Le analisi statistiche (One-Way ANOVA e test post-hoc di Tukey) hanno rilevato differenze significative tra alcuni trattamenti e il controllo, suggerendo che i ceppi di *Trichoderma* possono modulare selettivamente l'emissione dei VOCs, confermando l'esistenza di una comunicazione chimica mediata dalla pianta tra comparto radicale e parte aerea.

Questa evidenza sperimentale, resa possibile da un metodo affidabile e riproducibile, offre un contributo originale alla comprensione delle interazioni multitrofiche e dei meccanismi con cui le simbiosi microbiche possono influenzare la fisiologia e la difesa vegetale. Nel suo insieme, il metodo sviluppato in questa tesi costituisce uno strumento analitico ad alta affidabilità per la caratterizzazione del volatiloma vegetale, capace di integrare aspetti chimici, ecologici e fisiologici. La sua riproducibilità lo rende applicabile a un'ampia varietà di specie vegetali e sistemi sperimentali, aprendo prospettive di utilizzo anche in ambiti agronomici e ambientali.

I risultati ottenuti pongono le basi per diversi sviluppi futuri.
Un primo ambito di approfondimento riguarda l'ottimizzazione della fase di raccolta, mirata a migliorare ulteriormente l'efficienza di adsorbimento e ridurre le perdite dovute a fenomeni di breakthrough. L'impiego di materiali adsorbenti combinati, con diversa affinità per composti apolari e polari, o la modulazione di parametri come la portata del flusso e la temperatura, potrebbero consentire un recupero più completo del profilo volatile, in particolare per le molecole più leggere o a maggiore polarità.
Un secondo aspetto riguarda l'estensione del metodo a nuovi composti: l'analisi di campioni reali provenienti da piante sottoposte a differenti condizioni di stress biotico e abiotico permetterà di ampliare il numero di analiti caratterizzati e di individuare marker volatili specifici associati a particolari risposte fisiologiche. L'integrazione del metodo con tecniche ad alta risoluzione, come la GC×GC–TOF-MS o la PTR–MS, consentirà inoltre di identificare composti minori e di migliorare la capacità di discriminazione tra analiti isomerici o coeluenti.

Sarà inoltre necessario procedere con una ri-validazione del metodo in presenza di nuovi analiti o condizioni operative differenti, per garantire la robustezza del protocollo in un più ampio campo di applicazione. Parallelamente, l'analisi dei dati potrà essere integrata con approcci di chemometria multivariata, al fine di correlare in modo più efficace i profili VOC con lo stato fisiologico delle piante o con l'efficacia dei trattamenti biologici.

Infine, l'applicazione del metodo in condizioni di campo o di serra rappresenta un passo cruciale per trasferire il protocollo dall'ambito sperimentale controllato a quello reale, consentendo di valutare in modo più rappresentativo l'influenza delle variabili ambientali sull'emissione dei VOCs. Questi studi potranno fornire strumenti utili per il monitoraggio dello stato di salute delle colture e per la messa a punto di strategie di difesa integrata e sostenibile, basate sul riconoscimento e sull'uso mirato dei segnali chimici emessi dalle piante.

In conclusione, il metodo sviluppato in questa tesi non rappresenta soltanto un risultato tecnico, ma un approccio analitico integrato capace di coniugare rigore chimico, significato biologico e applicabilità agronomica, ponendo le basi per una comprensione più profonda e quantitativa del ruolo del volatiloma nella biologia delle piante.