



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Classe LM-54 – Scienze Chimiche

Confronto dei profili del volatiloma in piante di pomodoro infestate tramite metodo GC-MS

Relatrice:

Prof.ssa Valentina Gianotti

Correlatrice:

Dr.ssa Marysol Ferretti

Candidato:

Davide Acampora

Anno Accademico 2025 -2026

*A mia Mamma,
a tutti i “ti voglio bene” che non ti dico.*

Indice

Capitolo 1 – Introduzione	6
1.1 Le emissioni delle piante	6
1.2 I composti organici volatili	6
1.3 Obiettivi del progetto	8
Capitolo 2 – Sezione teorica	13
2.1 Stato dell'arte delle tecniche di campionamento e analisi dei VOCs	13
2.2 Contesto teorico	18
2.2.1 Analiti	18
2.2.2 Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa	37
2.2.3 Validazione del metodo analitico	40
2.2.4 Analisi statistica applicata al sistema in esame	42
Capitolo 3 – Sezione sperimentale	48
3.1 Materiali e metodi	48
3.1.1 Materiali	48
3.1.2 Metodi	49
3.2 Risultati e discussioni	56
3.2.1 Analiti monoterpenici	59
3.2.2 Confronto inter-annuale e valutazione della robustezza del sistema analitico	64
3.2.3 Analisi multivariata mediante PCA	66
3.2.4 Altri analiti target	72
3.2.5 Analiti incogniti identificati e valutazione semi-quantitativa	73
3.2.6 Conclusioni	74
Appendice A	76
Capitolo 4 – Bibliografia	84
Capitolo 5 – Conclusioni e prospettive future	88
Ringraziamenti	90

Capitolo 1 – Introduzione

1.1 Le emissioni delle piante

Le piante rappresentano una fonte estremamente ricca di metaboliti chimici, in grado di sintetizzare ed emettere un'elevata varietà di composti appartenenti a diverse classi strutturali. Tali metaboliti vengono rilasciati in quantità significative e misurabili, sia in condizioni basali sia in risposta a stimoli ambientali, contribuendo in modo sostanziale al profilo chimico dell'ecosistema circostante. [1]

L'ampiezza e la complessità di queste emissioni riflettono una notevole diversità metabolica, che rende le piante, oggetto di grande interesse per studi di caratterizzazione, identificazione e quantificazione analitica.

L'emissione di metaboliti non costituisce esclusivamente un processo di rilascio passivo, ma è alla base di meccanismi di comunicazione chimica che operano attraverso differenti compartimenti. A livello aereo, i composti rilasciati possono diffondere nell'ambiente e raggiungere altri organismi o individui vegetali, fungendo da segnali chimici trasmissibili su distanze variabili. Parallelamente, nel compartimento sotterraneo, il rilascio di metaboliti nel suolo consente la trasmissione di informazioni attraverso la matrice edafica, coinvolgendo sia interazioni dirette tra apparati radicali sia reti di trasporto mediate dall'ambiente circostante [2].

Nel loro insieme, questi processi evidenziano come l'emissione di metaboliti da parte delle piante rappresenti un fenomeno quantitativamente rilevante e chimicamente complesso, fondato su differenti modalità di diffusione e comunicazione. L'analisi di tali composti e dei meccanismi di trasmissione associati richiede pertanto approcci analitici sensibili e selettivi, in grado di descrivere in modo accurato sistemi chimici dinamici e multidimensionali.

1.2 I composti organici volatili

In contrapposizione ai meccanismi di comunicazione che coinvolgono l'apparato radicale, lo scambio di segnali attraverso l'atmosfera si realizza prevalentemente mediante il rilascio di un insieme articolato di composti organici volatili (volatile organic compounds, VOCs) sintetizzati da piante e organi fiorali. Questo insieme di molecole, comunemente indicato come volatiloma, costituisce un elemento chiave dell'ecologia chimica vegetale e può

essere considerato come una manifestazione dinamica e funzionale del metabolismo secondario della pianta.

I composti organici volatili (volatile organic compounds, VOCs) sono emessi da tutte le piante e hanno origine a livello di foglie, fiori, frutti e radici [3]. Dal punto di vista chimico e strutturale, i VOCs appartengono a un ampio insieme di classi molecolari (Figura 1.1) che comprende terpenoidi (omo-, mono-, di- e sesquiterpenoidi), idrocarburi alifatici derivati dagli acidi grassi, composti aromatici e specifiche classi di alcani, alcheni, alcoli, esteri, aldeidi e chetoni [3].

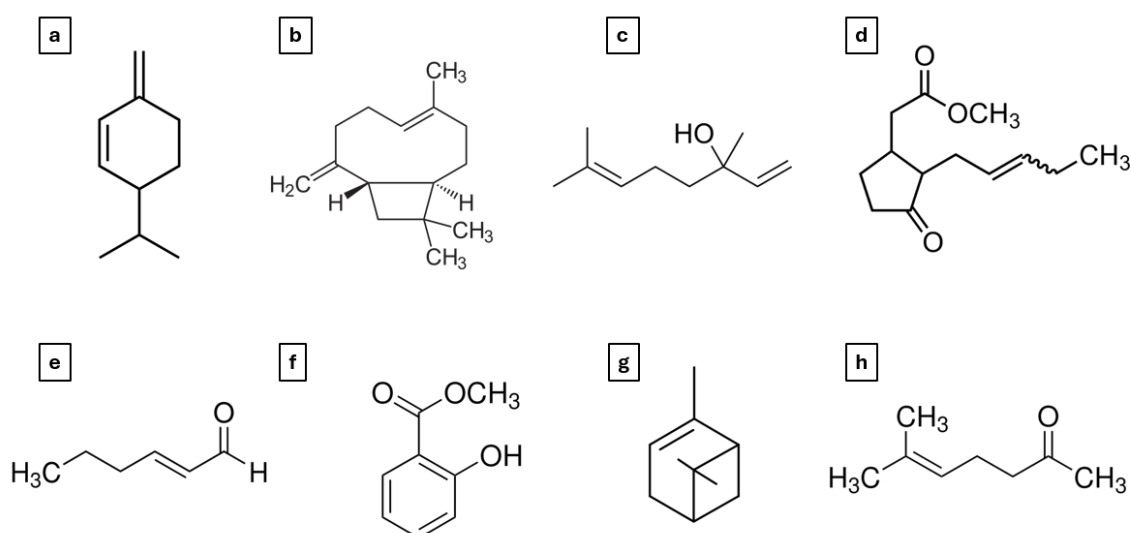


Figura 1.1. Esempi di VOCs: a: β -felandrene, b: (E)-beta-cariofillene, c: linalolo, d: metil jasmonato, e: trans-2-esenale, f: metil salicilato, g: α -pinene, h: 6-Methyl-5-hepten-2-one.

Questi composti vengono biosintetizzati attraverso diverse vie biochimiche [4]. In particolare, le ossilipine alifatiche, prodotte dall'ossidazione degli acidi grassi insaturi con ruolo di segnalazione e difesa, e i green leaf volatiles (GLVs), ossilipine volatili responsabili del tipico odore di erba tagliata e coinvolte nelle risposte allo stress, derivano dall'attività delle lipossigenasi (LOX) [5]; gli isoprenoidi sono prodotti tramite la via del deossixilulosio-5-fosfato (DXP) e la via del mevalonato (MVA), responsabili rispettivamente della biosintesi di monoterpeni e sesquiterpeni [6]; mentre i composti aromatici, i fenilpropanoidi e i fenoli sono sintetizzati, tra le altre, attraverso la via della fenilalanina ammonio-liasi (PAL) [7].

I VOCs mostrano un'elevata variabilità genotipica e una marcata plasticità fenotipica in termini di contenuto e composizione. Inoltre, la quantità e la qualità dei VOCs emessi possono subire variazioni significative in risposta a differenti stimoli biotici e abiotici, in particolare durante l'attivazione di risposte sistemiche [4].

All'interno del sistema pianta, i VOCs svolgono numerose funzioni biologiche. Essi partecipano a processi di comunicazione tra individui vegetali e agiscono come segnali attrattivi nei confronti di impollinatori, dispersori di semi e altri organismi benefici, inclusi microrganismi. L'emissione di VOCs aumenta inoltre in risposta a danni meccanici, attività trofica degli insetti, infezioni patogene e stress abiotici, quali siccità e temperature estreme [8].

È stato suggerito che, grazie alla loro elevata reattività biologica, all'efficacia anche a basse concentrazioni e alla capacità di diffondere su lunghe distanze, i VOCs possiedano un potenziale ancora sottostimato come promotori della crescita vegetale, inibitori di patogeni e induttori di resistenza nei confronti di stress biotici e abiotici [9]. I VOCs rappresentano pertanto importanti molecole segnale aerodisperse, in grado di attivare risposte differenziate nelle piante vicine e, in sinergia con altre molecole, di trasmettere segnali all'interno della stessa pianta [3].

Il volatiloma di una pianta, quindi, non è da considerarsi un insieme statico di composti, ma un sistema altamente dinamico, in grado di modulare la propria composizione in funzione delle condizioni ambientali e fisiologiche. In risposta a differenti forme di stress, le variazioni del volatiloma possono risultare contenute e limitate a modifiche quantitative di singoli analiti, oppure più estese, coinvolgendo cambiamenti significativi nella composizione complessiva del profilo volatile. In tali condizioni, specifici composti possono essere emessi in quantità maggiori, mentre l'assetto metabolico generale dei VOCs può subire una riorganizzazione più ampia, riflettendo l'attivazione di differenti vie biosintetiche e risposte adattative della pianta [10].

1.3 Obiettivi del progetto

I composti volatili emessi dalle piante rivestono un ruolo multifunzionale, essi agiscono come segnali di comunicazione e agenti di difesa, mediando le interazioni biologiche con altre piante, microrganismi e organismi animali [11].

L'approfondimento dell'ecologia chimica che governa le relazioni tra piante ospiti, erbivori e loro nemici naturali risulta cruciale per la progettazione e l'implementazione di strategie di difesa integrata efficaci, nell'ambito delle quali l'abbondanza e la distribuzione dei nemici naturali possono essere modulati attraverso l'impiego di semiochimici [12].

In condizioni naturali, le piante hanno evoluto strategie di difesa sia dirette sia indirette nei confronti degli organismi attaccanti [13]. Le difese dirette comprendono la produzione di tossine, inibitori della digestione e composti volatili indotti dall'attacco erbivoro (herbivore-induced plant volatiles, HIPVs), in grado di esercitare un effetto repellente sugli insetti fitofagi [14]. Le difese indirette, invece, si basano sull'emissione di HIPVs che favoriscono l'attrazione di nemici naturali antagonisti degli erbivori, contribuendo così alla riduzione della pressione trofica sulla pianta [11].

Comprendere i meccanismi con i quali le piante interagiscono è fondamentale per sviluppare sistemi e strategie di difesa più sostenibili e rispettose dell'ambiente.

L'obiettivo che questa tesi si propone è quello di studiare le differenze tra i profili del volatiloma delle piante analizzate e individuare nei campioni infestati da *Phthorimaea absoluta* l'eventuale presenza di molecole emesse al fine di allontanare il parassita. Inoltre, si cercherà di capire se la presenza o meno dell'ospite sarà in grado di generare differenze di emissioni complessive significative a livello quantitativo.

Per valutare tali differenze verrà utilizzato un metodo analitico precedentemente sviluppato e ottimizzato nell'ambito della tesi magistrale della Dottoranda Marysol Ferretti [15], basato sull'impiego della gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), tecnica particolarmente adatta all'identificazione e alla determinazione di miscele complesse di analiti presenti a basse concentrazioni. Questo approccio permetterà di attribuire le variazioni dei segnali alla diversa condizione biologica del campione e non alle fluttuazioni strumentali o a errori di campionamento e consentirà di approfondire più nel dettaglio le differenze delle emissioni in condizioni di diversi tipi di stress delle piante.

Al termine della raccolta dati, si confronteranno i profili ottenuti con quelli derivanti da piante studiate precedentemente nello stesso progetto di questa tesi per indagare ulteriori differenze e similitudini nei risultati.

Il sistema analizzato nel seguente lavoro presenta tre livelli;

1. Pianta: (*Solanum lycopersicum* L.),
2. Parassita: (Larve di *Phthorimaea absoluta*),
3. Parassitoide: (*Trichogramma achaeae*).

1) Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) (Figura 1.2) rappresenta una delle colture orticole di maggiore rilevanza a livello globale, sia per l'elevato valore economico sia per l'importanza nutrizionale nella dieta umana. Oltre al suo ruolo produttivo, questa specie riveste un interesse scientifico di primo piano, essendo ampiamente utilizzata come organismo modello nello studio dei meccanismi fisiologici, genetici e biochimici delle piante coltivate. Il volatiloma del pomodoro è caratterizzato da un'elevata complessità e plasticità, con emissioni che variano in funzione del genotipo, dello stadio di sviluppo e dell'esposizione a stress di natura biotica e abiotica. I VOCs emessi dalle foglie, in particolare, risultano coinvolti in processi di difesa diretta e indiretta, nella comunicazione pianta–pianta e nella mediazione delle interazioni multitrofiche, rendendo *S. lycopersicum* un sistema di riferimento ideale per lo studio dell'ecologia chimica vegetale [16].



Figura 1.2. Illustrazione del *Solanum lycopersicum* L. [17].

Accanto alla sua importanza agronomica e scientifica, il pomodoro è una coltura fortemente soggetta all'attacco di insetti fitofagi, che possono compromettere in modo significativo la resa e la qualità della produzione. Tra questi, la tignola del pomodoro *Phthorimaea (Tuta) absoluta* (Meyrick, Lepidoptera: Gelechiidae) rappresenta attualmente uno dei parassiti più dannosi a livello mondiale. Originaria del Sud America, la specie si è diffusa rapidamente in numerose aree di coltivazione, assumendo un ruolo di primaria emergenza fitosanitaria.

- 2) Le larve di *P. absoluta* (Figura 1.3) si sviluppano all'interno dei tessuti vegetali, dove scavano mine fogliari che riducono la superficie fotosinteticamente attiva; inoltre, possono attaccare fusti e frutti, causando danni diretti rilevanti e favorendo l'insorgenza di infezioni secondarie da parte di patogeni opportunisti. In assenza di adeguate misure di controllo, le perdite produttive possono risultare estremamente elevate.



Figura 1.3. Larva matura di *Phthorimaea absoluta* [18].

Tradizionalmente, la gestione di questo fitofago si è basata sull'impiego di insetticidi di sintesi; tuttavia, tale approccio presenta limiti evidenti. Lo sviluppo endofitico delle larve riduce l'efficacia dei trattamenti chimici e l'uso intensivo di questi ultimi ha favorito la selezione di popolazioni resistenti a diverse classi di principi attivi. Di conseguenza, negli ultimi anni si è assistito a un crescente interesse verso strategie di difesa integrata

(Integrated Pest Management, IPM), che combinano pratiche agronomiche, mezzi fisici, controllo biologico e un impiego più razionale dei prodotti fitosanitari [19].

- 3) Nell'ambito delle strategie di controllo biologico, i parassitoidi oofagi del genere *Trichogramma* (Figura 1.4) rivestono un ruolo di particolare interesse. Questi imenotteri sono in grado di parassitizzare le uova dei lepidotteri fitofagi, interrompendone il ciclo vitale prima dello sviluppo larvale. Tra le specie maggiormente studiate, *Trichogramma achaeae* ha mostrato una buona efficacia nel contenimento delle popolazioni di *P. absoluta* ed è attualmente impiegata in programmi di rilascio, in particolare in ambiente protetto.

La capacità dei parassitoidi di individuare l'ospite si basa su un raffinato sistema di percezione dei segnali chimici. Oltre ai semiochimici emessi direttamente dall'insetto, un ruolo cruciale è svolto dai VOCs prodotti dalla pianta in risposta all'attività trofica dell'erbivoro. Questi composti, noti come HIPVs, derivano da modificazioni qualitative e quantitative del profilo volatile basale e agiscono come segnali indiretti di difesa, in grado di attrarre predatori e parassitoidi verso la pianta infestata. Numerosi studi hanno dimostrato che variazioni specifiche del volatiloma consentono ai parassitoidi di discriminare tra piante sane e attaccate, migliorando l'efficienza della ricerca dell'ospite e rafforzando le interazioni multitrofiche.



Figura 1.4. *Trichogramma achaeae* in atto di parassitizzare un uovo di *P. absoluta* [20].

Capitolo 2 – Sezione teorica

2.1 Stato dell'arte delle tecniche di campionamento e analisi dei VOCs

Lo studio dei composti organici volatili (VOCs) emessi dalle piante richiede metodologie analitiche specifiche, in grado di rilevare molecole presenti a concentrazioni molto basse e caratterizzate da elevata volatilità e reattività chimica. Negli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi approcci per il campionamento, la preconcentrazione e l'identificazione di tali composti, che costituiscono oggi strumenti fondamentali per l'analisi del profilo volatile delle piante.

- **Tecniche di campionamento dei VOCs**

Il campionamento dei VOCs si basa prevalentemente su approcci di tipo headspace, che consentono la raccolta dei composti volatili direttamente dalla fase gassosa circostante il campione senza alterarne la struttura biologica. In questo ambito, si distinguono principalmente due strategie: il campionamento statico e quello dinamico [21].

Nel metodo statico (Figura 2.1), il campione viene confinato in un sistema chiuso, nel quale i composti volatili si accumulano fino al raggiungimento di un equilibrio tra la fase gassosa e la matrice biologica. Questa tecnica è semplice e poco invasiva, ma può risultare limitata nella rappresentatività del profilo volatile e nell'analisi quantitativa [22].

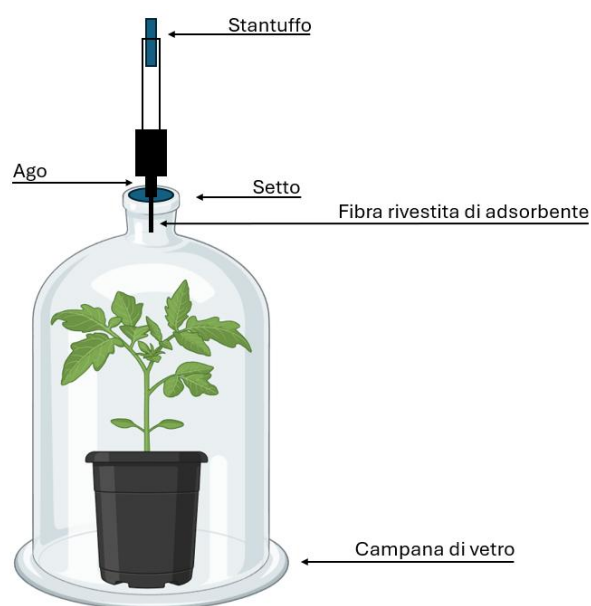


Figura 2.1. Esempio di campionamento statico.

Il campionamento dinamico (Figura 2.2) prevede invece il passaggio continuo di aria purificata attraverso una camera contenente il campione, con successiva raccolta dei VOCs su materiali adsorbenti. Questo approccio consente una maggiore efficienza di raccolta, un migliore controllo delle condizioni sperimentali e la possibilità di ottenere dati quantitativi più affidabili [22].

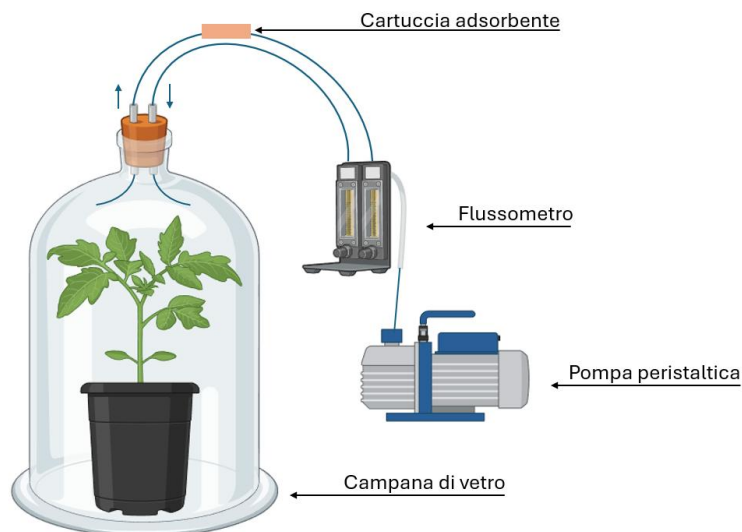


Figura 2.2. Esempio di campionamento dinamico.

- **Tecniche di preconcentrazione e raccolta**

All'interno di questi sistemi i VOCs sono generalmente presenti in tracce, dunque, la loro analisi richiede una fase di preconcentrazione. Tra le tecniche più diffuse rientra la microestrazione in fase solida (SPME), che utilizza fibre rivestite con materiali adsorbenti per catturare i composti volatili presenti nell'headspace. Questa metodologia è ampiamente impiegata per la sua semplicità operativa, l'assenza di solventi e l'elevata sensibilità analitica [23].

Nei sistemi di campionamento dinamico vengono invece impiegati tubi sui quali vengono installate trappole adsorbenti contenenti materiali come il Tenax® TA (Figura 2.3), che consentono di trattenere i VOCs durante il passaggio del flusso d'aria e di rilasciarli successivamente mediante desorbimento termico o mediante eluizione con solvente [24]. Tale approccio permette una raccolta più completa e quantitativa dei composti volatili [25].

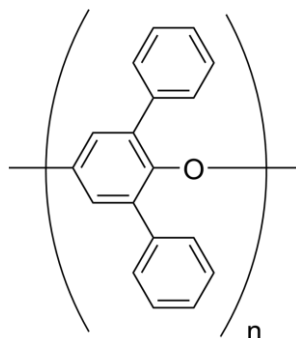


Figura 2.3. Struttura chimica del Tenax® TA.

- **Strumentazioni analitiche**

L'identificazione e la quantificazione dei composti organici volatili (VOCs) emessi dalle piante si basano prevalentemente su tecniche cromatografiche accoppiate a spettrometria di massa. In particolare, la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) (Figura 2.4) rappresenta una delle piattaforme analitiche di riferimento per lo studio del volatiloma vegetale, in virtù della sua elevata capacità di separazione e della possibilità di identificare composti presenti in miscele chimicamente complesse [21], [22].

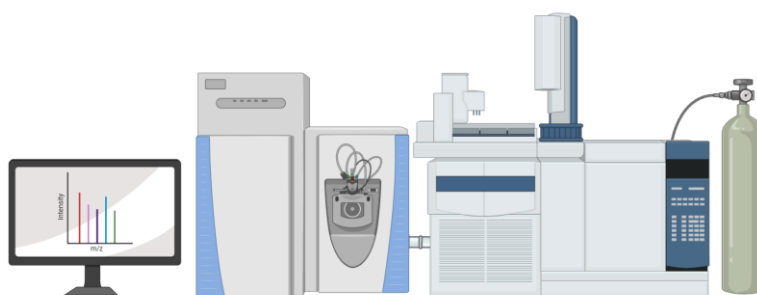


Figura 2.4. Schematizzazione di un GC-MS.

Il principio della tecnica prevede la separazione dei composti volatili mediante una colonna gascromatografica, seguita dalla loro caratterizzazione attraverso l'analisi degli spettri di massa caratteristici. Tale approccio è ampiamente impiegato negli studi sui VOCs di origine

vegetale, soprattutto quando integrata ai sistemi di preconcentrazione descritti nel paragrafo precedente, grazie alla combinazione di elevata sensibilità, selettività e capacità di fornire informazioni strutturali affidabili dei composti analizzati [21].

Accanto alla gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, anche la gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID) (Figura 2.5) trova applicazione nell'analisi dei composti organici volatili [26]. Il rivelatore FID si basa sulla ionizzazione dei composti organici in una fiamma di idrogeno-aria e sulla successiva misura della corrente ionica generata, che risulta proporzionale alla quantità di carbonio presente nel campione.

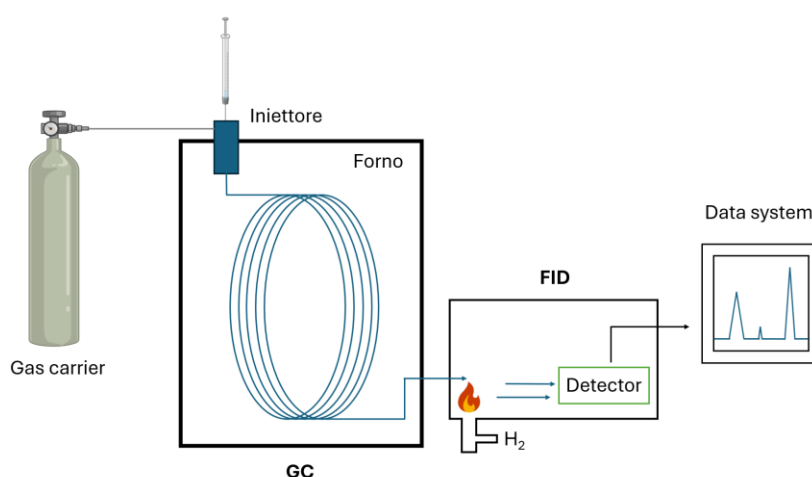


Figura 2.5. Schematizzazione di un GC-FID.

Grazie all'elevata sensibilità nei confronti dei composti organici e all'ampio intervallo dinamico di risposta, il GC-FID è particolarmente adatto per analisi quantitative dei VOCs, soprattutto quando i composti di interesse sono già noti. Tuttavia, a differenza della GC-MS, il rivelatore FID non fornisce informazioni strutturali, rendendo necessario il confronto con standard analitici per l'identificazione dei composti.

Negli studi riguardanti il volatiloma delle piante, il GC-FID viene pertanto impiegato principalmente come tecnica complementare alla GC-MS, in particolare per la quantificazione accurata dei composti volatili dopo la loro identificazione preliminare mediante spettrometria di massa. L'integrazione tra GC-MS e GC-FID consente infatti di combinare capacità identificative e precisione quantitativa nell'analisi delle emissioni volatili.

Più recentemente, sono stati sviluppati approcci che permettono la caratterizzazione delle emissioni volatili dall'headspace delle piante mediante campionamento attivo su tubi adsorbenti, accoppiati a tecniche cromatografiche e spettrometriche ad alta risoluzione. Tali sistemi rendono possibile l'analisi di un ampio numero di VOCs in condizioni sperimentali prossime a quelle fisiologiche [27].

In parallelo alla GC-MS convenzionale, sono state introdotte tecniche di spettrometria di massa in tempo reale, tra cui la proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) (Figura 2.6) e la selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), che consentono il monitoraggio continuo delle emissioni volatili senza necessità di separazione cromatografica. Tuttavia, queste metodologie vengono generalmente utilizzate come strumenti complementari, in particolare per lo studio delle dinamiche temporali delle emissioni in quanto presentano una capacità di risoluzione strutturale ridotta [22].

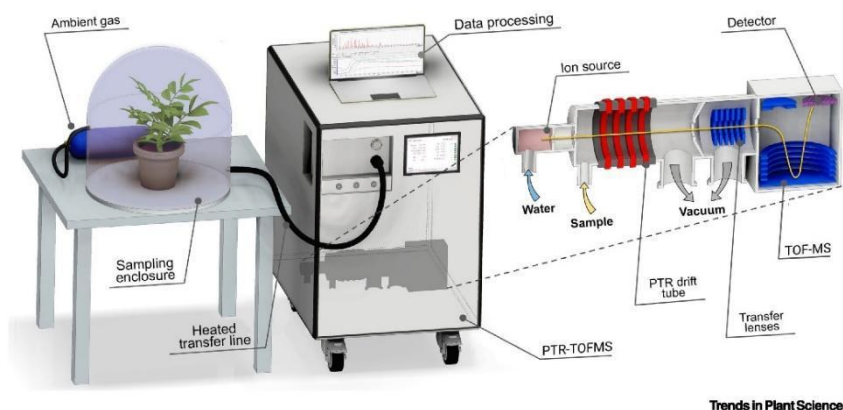


Figura 2.6. Schematizzazione di un PTR-MS [28].

In generale quindi, le analisi mediante GC-MS rappresentano attualmente l'approccio più consolidato per la caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei composti organici volatili emessi dalle piante [21], [22]. Tuttavia, l'integrazione di diverse strategie di campionamento, di tecniche di preconcentrazione e strumenti di rivelazione deve sempre essere considerata a causa della grande variabilità e complessità dei sistemi generalmente studiati.

2.2 Contesto teorico

Il seguente paragrafo introduce i principi teorici alla base dello studio oggetto della tesi. In particolare, verranno illustrate le caratteristiche chimico-fisiche degli analiti considerati, le strumentazioni impiegate e le basi di chemiometria e statistica utilizzate per l'elaborazione e l'interpretazione dei dati sperimentali.

2.2.1 Analiti

Le piante di pomodoro emettono un'ampia gamma di composti organici volatili appartenenti a diverse classi chimiche; tra questi troviamo: alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni ed esteri. Al fine di ottenere un insieme rappresentativo del profilo volatile, sono stati selezionati sedici analiti (Figura 2.7), scelti in modo da coprire le principali categorie di VOCs tipicamente associate a questa matrice vegetale.

Le loro caratteristiche chimico-fisiche sono state ricavate dalla libreria NIST (National Institute of Standards and Technology) [29].

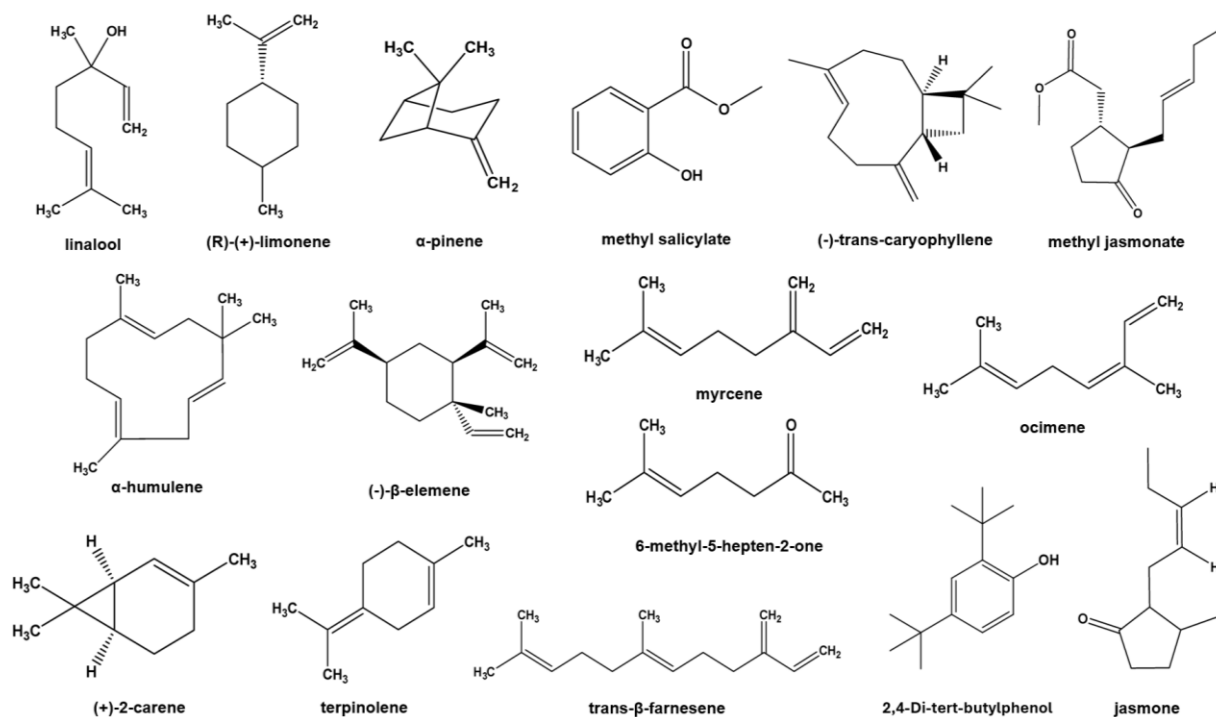


Figura 2.7. Struttura chimica degli analiti.

Di seguito vengono riportate le caratteristiche chimico-fisiche degli analiti:

- **Linalool**

Il linalool è un monoterpene aciclico appartenente alla classe degli alcoli terpenici, con formula molecolare $C_{10}H_{18}O$ e massa molare pari a 154,25 g/mol. Dal punto di vista strutturale, presenta una catena a dieci atomi di carbonio caratterizzata da due doppi legami e da un gruppo ossidrilico secondario, che conferisce alla molecola una moderata polarità rispetto ad altri monoterpene idrocarburici. Il composto è un liquido incolore, con punto di ebollizione di circa 198 °C a pressione atmosferica e densità pari a circa 0,86 g·cm⁻³ a 25 °C. La tensione di vapore relativamente elevata (circa 0,16 mmHg a 25 °C) riflette una volatilità significativa. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP ($\approx 2,7-2,9$) indica una moderata lipofilia, mentre la presenza del gruppo ossidrilico consente interazioni di tipo dipolo-dipolo e legami a idrogeno deboli.

Dallo spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.8), il linalool mostra generalmente uno ione molecolare M^{+} a m/z 154 di intensità moderata, indice della stabilità relativa del radicale cationico. Il picco base, tipicamente osservato a m/z 71, è attribuibile alla formazione di un catione allilico stabilizzato derivante da scissione della catena terpenica in prossimità del gruppo ossidrilico. Tra i frammenti più diagnostici si osservano inoltre i segnali a m/z 93 e m/z 69, riconducibili a cationi allilici e isoprenoidi stabilizzati per risonanza, tipici dei monoterpene aciclici. La presenza di questi frammenti, insieme al debole ma identificabile ione molecolare, costituisce un pattern caratteristico che consente una facile identificazione del composto mediante confronto con librerie spettrali.

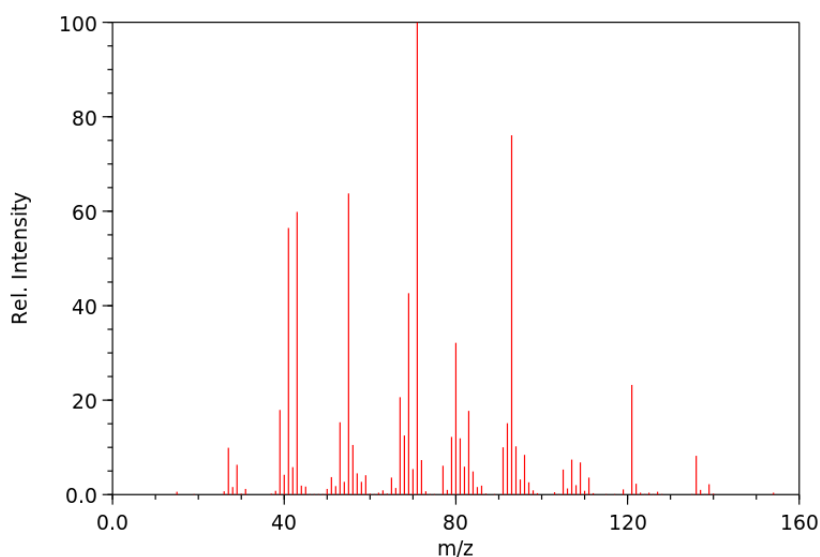


Figura 2.8. Spettro di massa (modalità EI) del linalool.

- **(R)-(+)-limonene**

L' (R)-(+)-limonene è un monoterpene idrocarburico monociclico appartenente alla famiglia degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e massa molare pari a 136,24 g/mol. La sua struttura è caratterizzata da un anello cicloesenico sostituito con un gruppo isopropenilico e un doppio legame endociclico, elementi che conferiscono alla molecola un'elevata stabilità dei cationi allilici e radicalici formabili durante la frammentazione. In condizioni standard si presenta come un liquido incolore con punto di ebollizione di circa 176 °C e densità pari a circa 0,84 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari rende il limonene una molecola fortemente apolare, come indicato anche dal valore elevato di logP ($\approx 4,2$), mentre la tensione di vapore relativamente alta (circa 1,9 mmHg a 25 °C) riflette una marcata volatilità, tipica dei monoterpeni idrocarburici.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.9), il limonene mostra uno ione molecolare M^{+} a m/z 136 di intensità moderata. Il picco base è tipicamente osservato a m/z 68 ed è attribuibile alla formazione di un catione isoprenoide stabilizzato per risonanza derivante dalla scissione della struttura monoterpénica. Tra i frammenti più diagnostici si osservano inoltre i segnali a m/z 93 e m/z 67, riconducibili rispettivamente a cationi allilici e a frammenti ciclici stabilizzati. Questo pattern di frammentazione, dominato dalla formazione di cationi isoprenoidi a bassa massa, è caratteristico dei monoterpeni idrocarburici e consente una chiara identificazione del limonene mediante confronto con librerie spettrali.

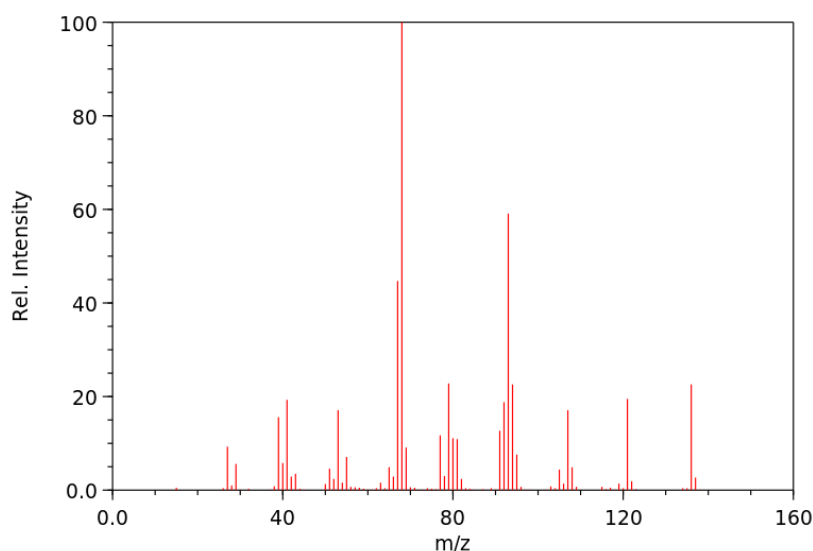


Figura 2.9. Spettro di massa (modalità EI) del (R)-(+)-limonene.

- **α-pinene**

L'α-pinene è un monoterpene biciclico appartenente alla classe degli idrocarburi terpenici, con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e massa molare pari a 136,24 g/mol. La sua struttura è caratterizzata da un sistema biciclico costituito da un anello ciclobutanico fuso a un anello cicloesenico, con la presenza di un doppio legame endociclico. Questa conformazione rigida influenza sia le proprietà chimico-fisiche sia il comportamento di frammentazione in spettrometria di massa. L'α-pinene si presenta come un liquido incolore, con punto di ebollizione di circa 155 °C e densità pari a circa 0,86 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari conferisce alla molecola una marcata apolarità ($\log P \approx 4,5$) e una scarsa solubilità in acqua, mentre la tensione di vapore relativamente elevata ($\approx 4\text{--}5$ mmHg a 25 °C) riflette l'elevata volatilità tipica dei monoterpene idrocarburici.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.10), l'α-pinene presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 136 di intensità moderata. Il picco base è tipicamente osservato a m/z 93 ed è attribuibile alla formazione di un catione tropilico o benzilico stabilizzato per risonanza, derivante dalla riorganizzazione e frammentazione del sistema biciclico. Tra gli altri frammenti diagnostici si osservano segnali a m/z 91 e m/z 77, anch'essi associati a specie cationiche stabilizzate, nonché un frammento a m/z 121 riconducibile alla perdita di un gruppo metile ($M-15$). Il pattern di frammentazione,

caratterizzato da una significativa riorganizzazione della struttura biciclica e dalla formazione di cationi aromatici stabilizzati, è tipico dei monoterpeni biciclici e consente una chiara distinzione dell' α -pinene rispetto ai monoterpeni aciclici.

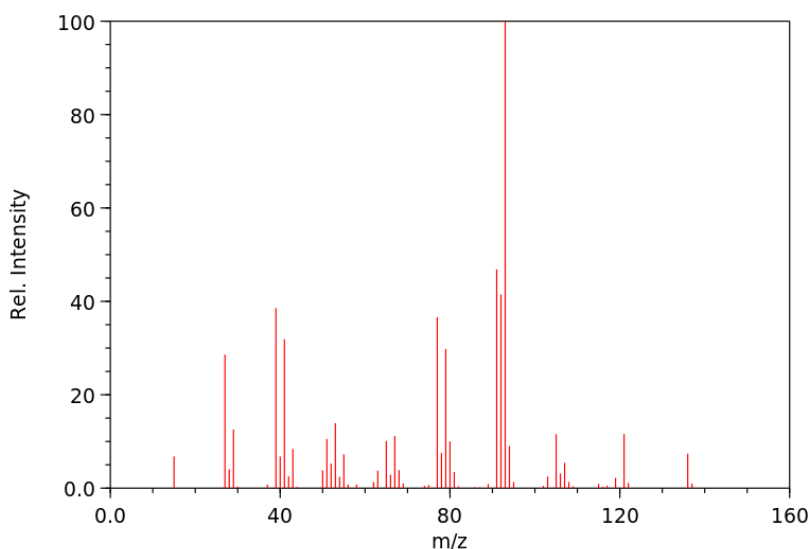


Figura 2.10. Spettro di massa (modalità EI) dell' α -pinene.

- **Methyl salicylate**

Il methyl salicylate è un estere aromatico appartenente alla classe dei derivati dell'acido salicilico, con formula molecolare $C_8H_8O_3$ e massa molare pari a 152,15 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da un anello benzenico sostituito in posizione orto da un gruppo estereo metilico e da un gruppo ossidrilico fenolico, configurazione che consente la formazione di un legame a idrogeno intramolecolare stabile. Tale caratteristica influisce significativamente sulle proprietà chimico-fisiche del composto, che si presenta come un liquido incolore o debolmente giallastro, con punto di ebollizione relativamente elevato (circa 223 °C) e densità pari a circa 1,17 g·cm⁻³ a 25 °C. La presenza dei gruppi funzionali ossigenati conferisce una polarità maggiore rispetto ai monoterpeni idrocarburici, come evidenziato anche da un valore di logP pari a circa 2,5–2,7. La tensione di vapore relativamente bassa ($\approx$ 0,03 mmHg a 25 °C) riflette una volatilità inferiore rispetto ai terpeni, pur rientrando nell'intervallo tipico dei VOCs vegetali.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.11), il methyl salicylate presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 152 ben evidente, indice della stabilità del sistema aromatico. Il picco base osservabile a m/z 120 è attribuibile alla perdita di una molecola di metanolo ($M-32$) o, più frequentemente, alla perdita del gruppo metossilico tramite scissione dell'estere. Tra i frammenti diagnostici si osservano inoltre i segnali a m/z 92 e m/z 65, associati alla formazione di cationi fenolici e tropilici stabilizzati per risonanza. Il pattern di frammentazione, dominato dalla stabilità del nucleo aromatico e dalle scissioni caratteristiche del gruppo estereo, risulta altamente distintivo e consente un'identificazione affidabile del composto mediante confronto con librerie spettrali.

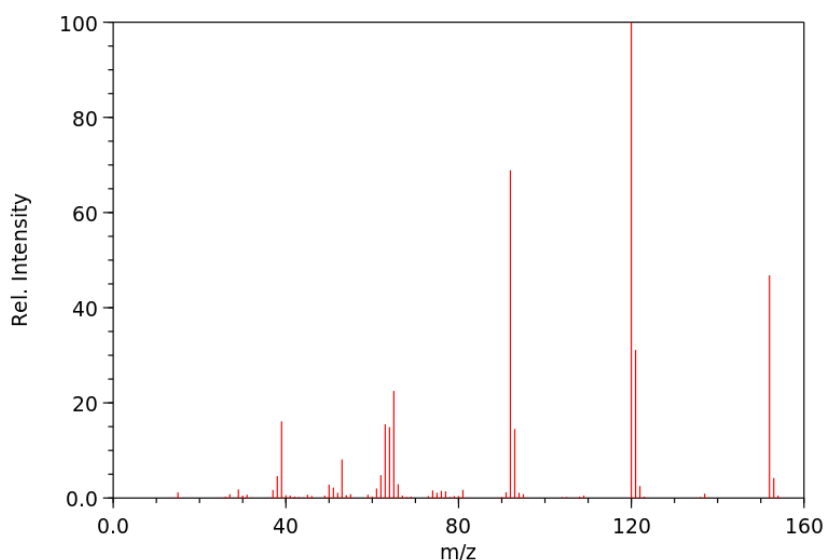


Figura 2.11. Spettro di massa (modalità EI) del methyl salicylate.

- **(-)-trans-caryophyllene**

Il (-)-trans-caryophyllene, noto anche come β -caryophyllene, è un sesquiterpene idrocarburico biciclico con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e massa molare pari a 204,35 g/mol. La sua struttura è caratterizzata da un sistema biciclico costituito da un anello cicloesenico fuso a un anello ciclobutanico e da un doppio legame esociclico, questi elementi contribuiscono alla formazione di cationi stabilizzati durante i processi di frammentazione. Si presenta come un liquido incolore o leggermente giallastro, con punto di ebollizione relativamente elevato (circa 260 °C a pressione atmosferica) e densità pari a circa 0,90

$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari conferisce alla molecola una marcata apolarità ($\log P \approx 6$), associata a una scarsa solubilità in acqua. La tensione di vapore è inferiore rispetto ai monoterpeni ($\approx 0,01\text{--}0,02$ mmHg a 25 °C), coerentemente con la maggiore massa molecolare e con la minore volatilità tipica dei sesquiterpeni.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.12), il (-)-trans-caryophyllene mostra uno ione molecolare M^{+} a m/z 204 di intensità moderata, riflesso della stabilità del radicale cationico derivante dal sistema insaturo. Il picco base osservato a m/z 93 è attribuibile alla formazione di un catione ciclico stabilizzato per risonanza, ed è comune nei terpeni con scheletro biciclico. Tra i frammenti più significativi si osservano inoltre i segnali a m/z 133 e m/z 161, riconducibili a scissioni del sistema biciclico e a riarrangiamenti che generano cationi terpenici stabilizzati. Il pattern di frammentazione, caratterizzato dalla perdita di porzioni isoprenoidi e dalla formazione di cationi ciclici a bassa massa, è tipico dei sesquiterpeni idrocarburici e consente un'identificazione affidabile mediante confronto con librerie spettrali.

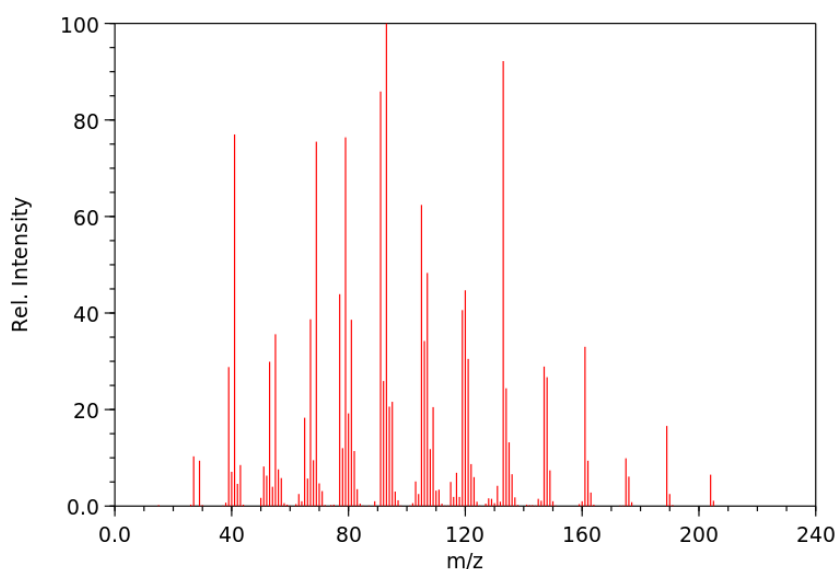


Figura 2.12. Spettro di massa (modalità EI) del (-)-trans-caryophyllene.

- methyl jasmonate

Il methyl jasmonate è un estere metilico dell'acido jasmonico appartenente alla classe delle ossilipine ciclopentaniche, con formula molecolare $C_{13}H_{20}O_3$ e massa molare pari a 224,30 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da un anello ciclopentanone sostituito da una catena laterale pentenilica e da un gruppo estereo metilico, configurazione che combina una porzione relativamente apolare con gruppi funzionali carbonilici polari (chetone ed estere). In condizioni standard si presenta come un liquido incolore o debolmente giallastro, con punto di ebollizione elevato (circa 300 °C a pressione atmosferica, con possibile decomposizione) e densità pari a circa 0,97 g·cm⁻³ a 25 °C. Il valore di logP ($\approx 2,5-3$) indica una moderata lipofilia, nonostante la tensione di vapore relativamente bassa rifletta una volatilità inferiore rispetto ad altri monoterpeni, rientra tra i VOCs biologicamente attivi coinvolti nei processi di segnalazione vegetale.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.13), il methyl jasmonate presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 224 di intensità moderata, in linea con la presenza di gruppi carbonilici suscettibili a frammentazione. Il picco base, osservato a m/z 83, è attribuibile alla formazione di un catione ciclopentenonico stabilizzato derivante dalla scissione della catena laterale. Tra i frammenti diagnostici si rilevano inoltre i segnali a m/z 151 e m/z 133, associati a perdite successive dalla catena alchilica e a riarrangiamenti tipici delle molecole contenenti sistemi ciclopentanici insaturi. Il pattern di frammentazione è caratterizzato da scissioni in α rispetto ai gruppi carbonilici e dalla formazione di specie cationiche stabilizzate per risonanza.

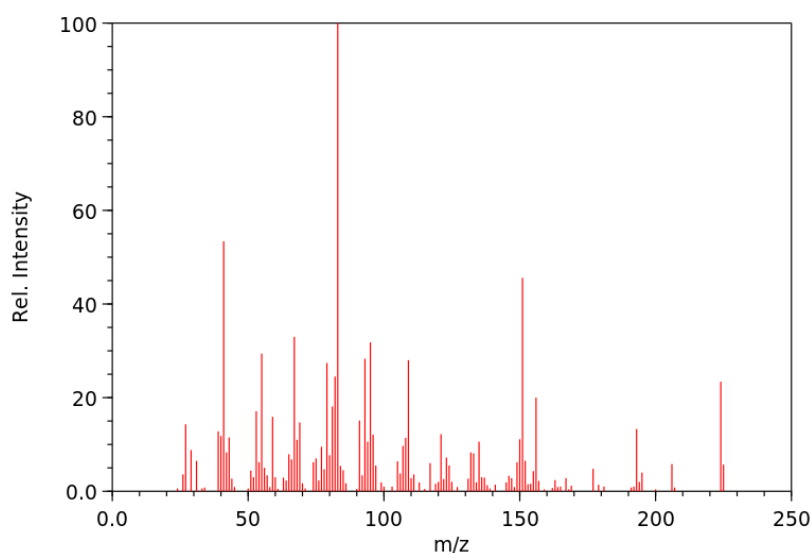


Figura 2.13. Spettro di massa (modalità EI) del methyl jasmonate.

- **α -humulene**

L' α -humulene è un sesquiterpene idrocarburico monociclico appartenente alla famiglia degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e massa molare pari a 204,35 g/mol. La sua struttura è costituita da un anello macrociclico a undici atomi di carbonio contenente tre doppi legami coniugati, configurazione che conferisce alla molecola una notevole flessibilità conformazionale e favorisce la stabilizzazione dei cationi formati durante i processi di frammentazione. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore o leggermente giallastro, con punto di ebollizione relativamente elevato (circa 255–260 °C) e densità pari a circa 0,89 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari rende l' α -humulene fortemente apolare, come evidenziato anche dal valore elevato di logP (≈ 6), e scarsamente solubile in acqua. La tensione di vapore è bassa (dell'ordine di 10⁻² mmHg a 25 °C), coerentemente con la maggiore massa molecolare e con la minore volatilità tipica dei sesquiterpeni rispetto ai monoterpeni.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.14), l' α -humulene presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 204 di intensità moderata. Il picco base, osservato a m/z 93, è attribuibile alla formazione di un catione ciclico stabilizzato per risonanza, comune nei sesquiterpeni insaturi. Tra i frammenti più caratteristici si osservano i segnali a m/z 161 e m/z 133, derivanti da scissioni della catena isoprenoide e da riarrangiamenti che generano cationi terpenici stabilizzati. Il pattern di frammentazione, dominato dalla perdita di unità isopreniche e dalla formazione di specie cationiche cicliche a bassa massa, è tipico dei sesquiterpeni idrocarburici.

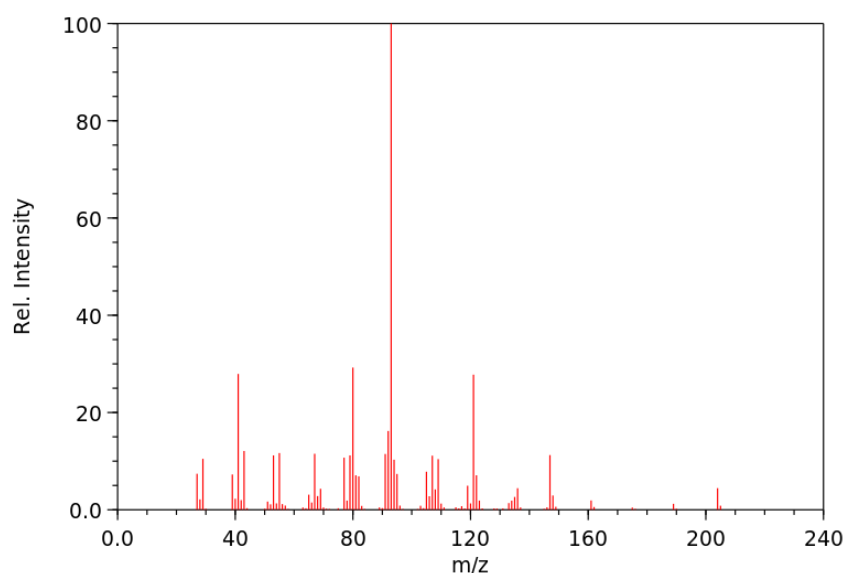


Figura 2.14. Spettro di massa (modalità EI) dell' α -humulene.

- **(-)- β -elemene**

il (-)- β -elemene è un sesquiterpene idrocarburico monociclico appartenente alla classe degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e massa molare pari a 204,35 g/mol. La sua struttura è costituita da un anello cicloesenico sostituito con catene isopreniche e caratterizzato dalla presenza di doppi legami che conferiscono alla molecola un'elevata insaturazione e la capacità di formare cationi stabilizzati durante i processi di frammentazione. In condizioni standard si presenta come un liquido incolore o debolmente giallastro, con punto di ebollizione relativamente elevato (circa 255–260 °C) e densità pari a circa 0,87 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari determina una marcata apolarità ($\log P \approx 6$) e una scarsa solubilità in acqua, mentre la tensione di vapore è bassa, coerentemente con la minore volatilità tipica dei sesquiterpeni rispetto ai monoterpeni.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.15), il (-)- β -elemene presenta uno ione molecolare $M^{+•}$ a m/z 204 di intensità moderata. Il picco base, osservato a m/z 93 è attribuibile alla formazione di un catione ciclico stabilizzato per risonanza, comune nei sesquiterpeni insaturi. Tra i frammenti diagnostici si osservano i segnali a m/z 161 e m/z 133, riconducibili a scissioni successive dello scheletro isoprenoide e a riarrangiamenti che generano cationi terpenici stabilizzati. Il pattern di frammentazione, dominato dalla perdita di porzioni della catena isoprenica e dalla formazione di specie

cationiche cicliche a bassa massa, è caratteristico dei sesquiterpeni idrocarburici e consente una chiara identificazione del composto mediante confronto con librerie spettrali.

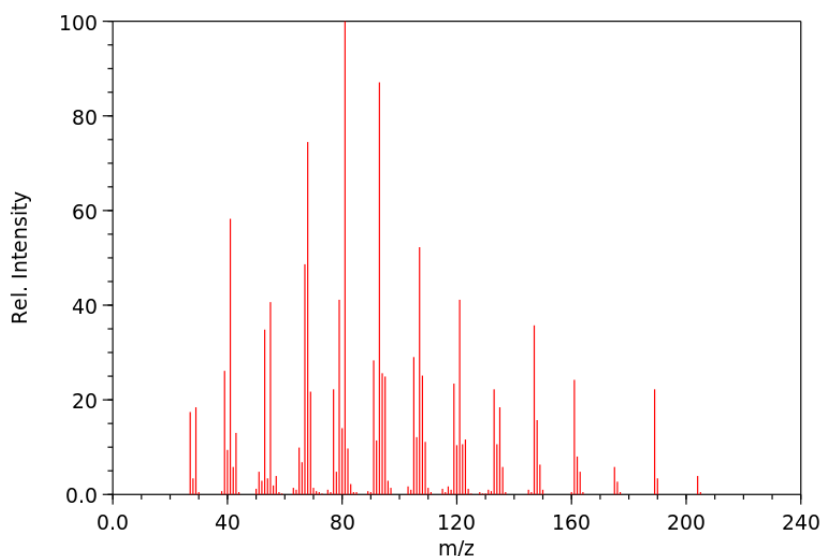


Figura 2.15. Spettro di massa (modalità EI) del (-)-β-elemene.

- **Myrcene**

Il myrcene è un monoterpene idrocarburico aciclico appartenente alla famiglia degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e massa molare pari a 136,24 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da una catena lineare contenente tre doppi legami coniugati, configurazione che conferisce elevata reattività e facilita la formazione di cationi allilici stabilizzati durante i processi di frammentazione. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore con punto di ebollizione di circa 167 °C e densità pari a circa 0,79 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari determina una marcata apolarità (logP ≈ 4,5) e una scarsa solubilità in acqua, mentre la tensione di vapore relativamente elevata (≈ 2 mmHg a 25 °C) riflette l'elevata volatilità tipica dei monoterpeni aciclici.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.16), il myrcene presenta uno ione molecolare $M^{+•}$ a m/z 136 di intensità moderata. Il picco base osservato a m/z 69 è attribuibile alla formazione di un catione isoprenilico altamente stabilizzato per risonanza, caratteristico dei monoterpeni aciclici. Tra i frammenti diagnostici si osservano i segnali a m/z 93 e m/z 41, derivanti rispettivamente da scissioni della catena

con formazione di cationi allilici e di frammenti isoprenoidi più piccoli. Il pattern di frammentazione, dominato dalla generazione di specie cationiche alliliche a bassa massa, risulta distintivo per i monoterpeni lineari e consente una chiara differenziazione rispetto ai monoterpeni ciclici.

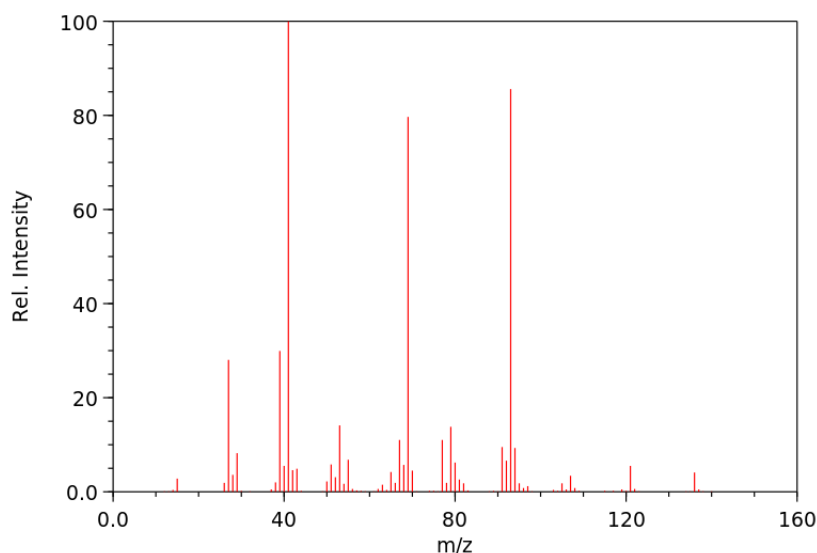


Figura 2.16. Spettro di massa (modalità EI) del myrcene.

- **6-methyl-5-hepten-2-one**

Il 6-methyl-5-hepten-2-one, noto anche come sulcatone, è un composto carbonilico appartenente alla classe dei chetoni alifatici insaturi, con formula molecolare $C_8H_{14}O$ e massa molare pari a 126,20 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da una catena lineare contenente un gruppo chetonico e un doppio legame terminale sostituito, configurazione che conferisce una moderata polarità e una buona reattività chimica. In condizioni standard si presenta come un liquido incolore, con punto di ebollizione relativamente basso (circa 173 °C) e densità pari a circa 0,83 g·cm⁻³ a 25 °C. Il valore di logP (≈ 2,5) indica una moderata lipofilia, mentre la presenza del gruppo carbonilico determina interazioni dipolari e una maggiore solubilità in acqua rispetto ai terpeni idrocarburici. La tensione di vapore relativamente elevata (≈ 1–2 mmHg a 25 °C) riflette una volatilità significativa, coerente con la sua frequente presenza tra i VOCs vegetali.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.17), 6-methyl-5-hepten-2-one presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 126 di intensità moderata. Il picco base osservato a m/z 43 è attribuibile alla formazione del catione acilio CH_3CO^{+} derivante dalla scissione α rispetto al gruppo carbonilico, processo altamente favorito nei chetoni. Tra i frammenti diagnostici si osservano inoltre i segnali a m/z 69 e m/z 55, associati rispettivamente a cationi allilici stabilizzati derivanti dalla porzione insatura della catena e a ulteriori frammenti prodotti da scissioni successive. Il pattern di frammentazione è quindi dominato da scissioni α al gruppo chetonico e dalla formazione di cationi allilici e risulta altamente caratteristico per i chetoni alifatici insaturi.

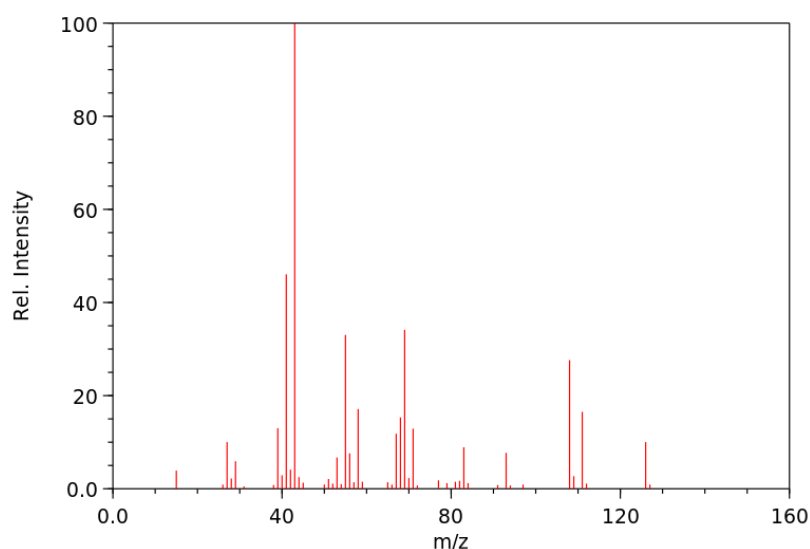


Figura 2.17. Spettro di massa (modalità EI) del 6-methyl-5-hepten-2-one.

- **ocimene**

L'ocimene è un monoterpene idrocarburico aciclico appartenente alla famiglia degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e massa molare pari a 136,24 g/mol. La molecola è costituita da una catena lineare contenente tre doppi legami coniugati, configurazione che conferisce elevata reattività e favorisce la formazione di cationi allilici stabilizzati durante i processi di frammentazione. In condizioni standard si presenta come un liquido incolore, con punto di ebollizione di circa 175 °C e densità pari a circa 0,80 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari determina una marcata apolarità ($\log P \approx 4$ –

4,5) e una scarsa solubilità in acqua, mentre la tensione di vapore relativamente elevata ($\approx 1\text{--}2$ mmHg a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) riflette una volatilità significativa, tipica dei monoterpeni aciclici.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.18), l'ocimene presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 136 di intensità moderata. Il picco base osservato a m/z 93 è attribuibile alla formazione di un catione allilico stabilizzato per risonanza derivante da scissioni della catena insatura. Tra i frammenti diagnostici si osservano i segnali a m/z 69 e m/z 41, associati rispettivamente a cationi isoprenoidi e a frammenti allilici di massa inferiore. Il pattern di frammentazione, dominato dalla formazione di specie cationiche alliliche e isoprenoidi, è caratteristico dei monoterpeni aciclici altamente insaturi e consente una chiara identificazione del composto mediante confronto con librerie spettrali.

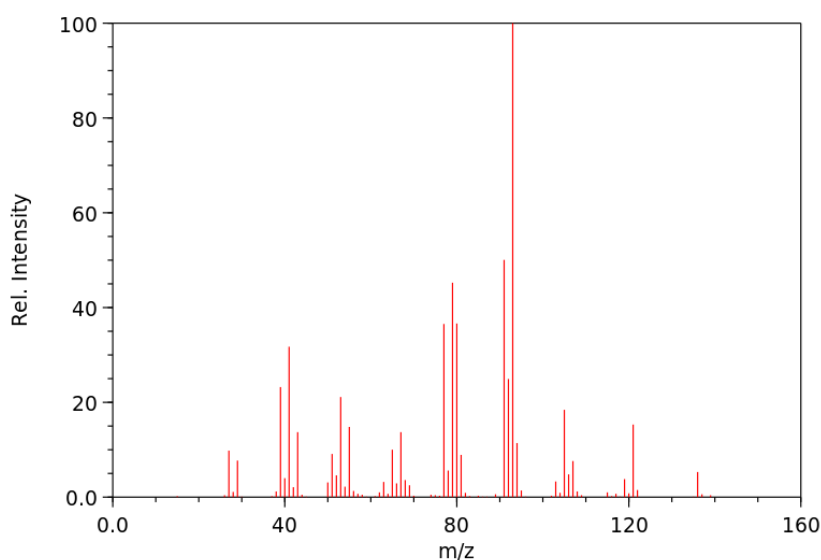


Figura 2.18. Spettro di massa (modalità EI) dell'ocimene.

- **(+)-2-carene**

Il (+)-2-carene è un monoterpene idrocarburo biciclico appartenente alla famiglia degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e massa molare pari a 136,24 g/mol. La sua struttura è caratterizzata da un sistema biciclico costituito da un anello ciclopropanico fuso a un anello cicloesenico contenente un doppio legame, configurazione che conferisce elevata rigidità molecolare e influenza significativamente i processi di frammentazione in

spettrometria di massa. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, con punto di ebollizione relativamente basso (circa 169 °C) e densità pari a circa 0,86 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari rende la molecola fortemente apolare (logP ≈ 4,5), scarsamente solubile in acqua e caratterizzata da una tensione di vapore relativamente elevata (≈ 2 mmHg a 25 °C), indicativa di una buona volatilità tipica dei monoterpeni.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.19), il (+)-2-carene presenta uno ione molecolare M⁺ a m/z 136 di intensità moderata. Il picco base osservato a m/z 93 è attribuibile alla formazione di un catione ciclico stabilizzato per risonanza derivante dalla riorganizzazione e frammentazione del sistema biciclico. Tra i frammenti diagnostici si osservano i segnali a m/z 91 e m/z 77, associati alla formazione di cationi aromatici stabilizzati, nonché un frammento a m/z 121 riconducibile alla perdita di un gruppo metile (M-15). Il pattern di frammentazione, dominato dalla riorganizzazione dello scheletro biciclico e dalla formazione di cationi ciclici stabilizzati, è caratteristico dei monoterpeni biciclici e consente una chiara identificazione del composto mediante confronto con librerie spettrali.

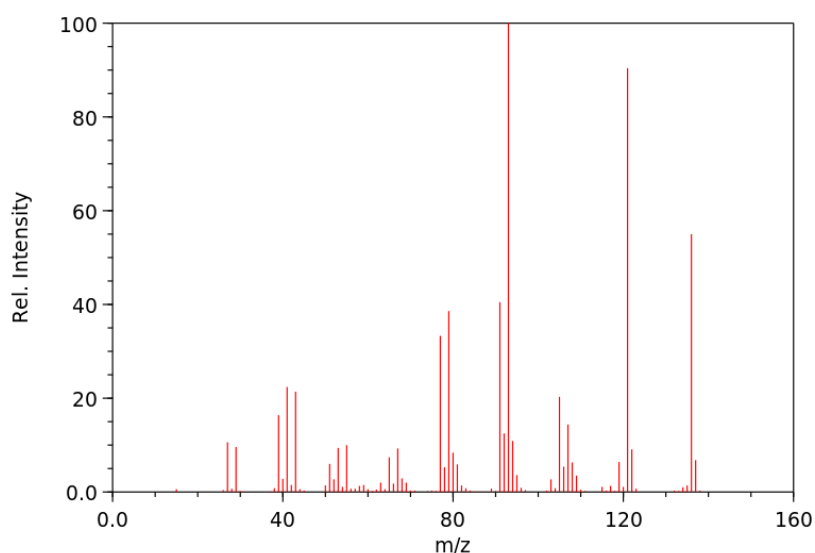


Figura 2.19. Spettro di massa (modalità EI) del (+)-2-carene.

- **Terpinolene**

Il terpinolene è un monoterpene idrocarburico monociclico appartenente alla famiglia degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{10}H_{16}$ e massa molare pari a 136,24 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da un anello cicloesenico sostituito con una catena isopropenilica e caratterizzato dalla presenza di tre doppi legami, configurazione che conferisce elevata insaturazione e favorisce la formazione di cationi allilici stabilizzati durante i processi di frammentazione. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, con punto di ebollizione di circa 184 °C e densità pari a circa 0,86 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari rende il terpinolene fortemente apolare ($\log P \approx 4,5$) e scarsamente solubile in acqua, mentre la tensione di vapore relativamente elevata (≈ 1 mmHg a 25 °C) riflette una volatilità significativa, tipica dei monoterpene idrocarburici.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.20), il terpinolene presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 136 di intensità moderata. Il picco base osservato a m/z 93 è attribuibile alla formazione di un catione ciclico stabilizzato per risonanza derivante dalla frammentazione del sistema insaturo. Tra i frammenti diagnostici si osservano i segnali a m/z 91, m/z 77 e m/z 121, riconducibili rispettivamente alla formazione di cationi aromatici stabilizzati e alla perdita di un gruppo metile ($M-15$). Il pattern di frammentazione, dominato dalla formazione di specie cationiche cicliche a bassa massa, è caratteristico dei monoterpene monociclici altamente insaturi e consente un'identificazione affidabile mediante confronto con librerie spettrali.

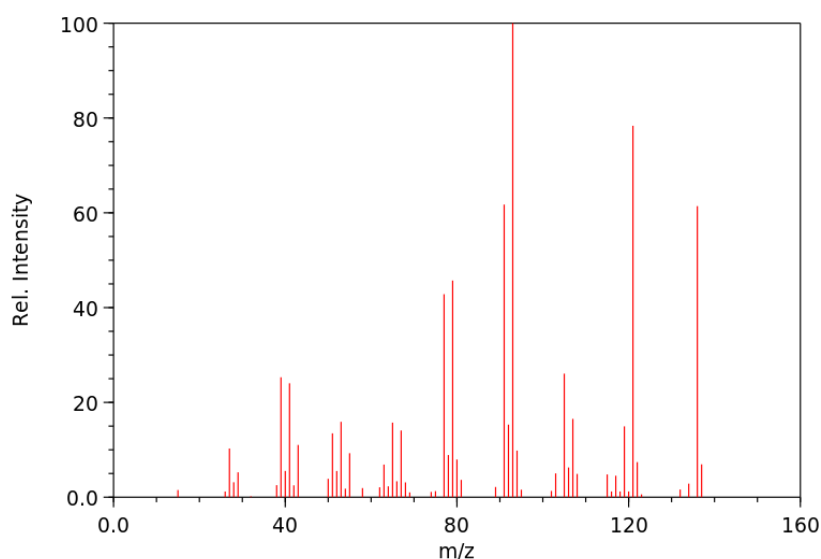


Figura 2.20. Spettro di massa (modalità EI) del terpinolene.

- **Trans- β -farnesene**

Il trans- β -farnesene è un sesquiterpene idrocarburico aciclico appartenente alla famiglia degli isoprenoidi, con formula molecolare $C_{15}H_{24}$ e massa molare pari a 204,35 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da una catena lineare contenente quattro doppi legami coniugati distribuiti lungo lo scheletro isoprenoide, configurazione che conferisce elevata flessibilità conformazionale e favorisce la formazione di cationi allilici stabilizzati durante i processi di frammentazione. In condizioni standard si presenta come un liquido incolore o leggermente giallastro, con punto di ebollizione relativamente elevato (circa 260–270 °C) e densità pari a circa 0,88 g·cm⁻³ a 25 °C. L'assenza di gruppi funzionali polari rende la molecola fortemente apolare ($\log P \approx 6-7$) e scarsamente solubile in acqua, mentre la tensione di vapore relativamente bassa riflette la minore volatilità tipica dei sesquiterpeni rispetto ai monoterpeni.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.21), il trans- β -farnesene presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 204 di intensità moderata. Il picco base osservato a m/z 69 è attribuibile alla formazione di un catione isoprenilico altamente stabilizzato per risonanza, caratteristico dei sesquiterpeni aciclici. Tra i frammenti diagnostici si osservano i segnali a m/z 93 e m/z 41, associati rispettivamente a cationi allilici di massa superiore e a frammenti isoprenoidi più piccoli derivanti da scissioni successive lungo la catena insatura. Il pattern di frammentazione, dominato dalla formazione di specie cationiche alliliche e isoprenoidi a bassa massa, è tipico dei sesquiterpeni lineari e consente una chiara distinzione rispetto ai sesquiterpeni ciclici.

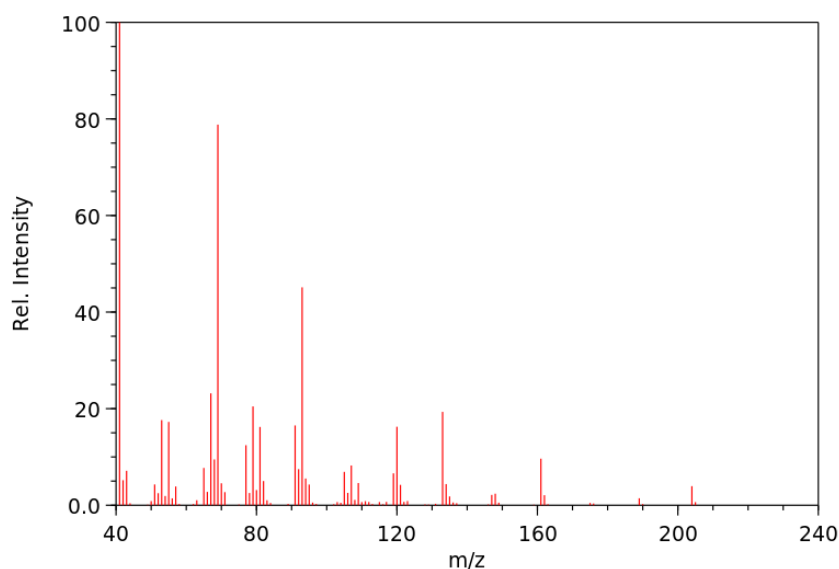


Figura 2.21. Spettro di massa (modalità EI) del *trans*- β -farnesene

- **2,4-di-tert-butylphenol**

Il 2,4-di-tert-butylphenol è un composto aromatico fenolico con formula molecolare $C_{14}H_{24}O$ e massa molare pari a 206,32 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da un anello benzenico sostituito da un gruppo ossidrilico fenolico e da due gruppi tert-butilici in posizione orto e para rispetto al gruppo ossidrilico. Questa configurazione conferisce un marcato ingombro sterico e una elevata stabilità chimica, oltre a una pronunciata lipofilia ($\log P \approx 5-6$). In condizioni standard si presenta come un solido cristallino bianco, con punto di fusione intorno a 50–55 °C e punto di ebollizione relativamente elevato (circa 265–270 °C). La densità è pari a circa 0,92 g·cm⁻³, mentre la tensione di vapore è molto bassa.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.22), il composto mostra uno ione molecolare M^{+} a m/z 206 ben visibile, grazie alla stabilità del sistema aromatico sostituito. Il picco base osservato a m/z 191 è attribuibile alla perdita di un gruppo metile ($M-15$) da uno dei sostituenti tert-butilici. Tra i frammenti più caratteristici si osservano i segnali a m/z 177 e m/z 135, riconducibili rispettivamente alla perdita di porzioni dei gruppi alchilici e alla formazione di cationi fenolici stabilizzati per risonanza. Il pattern di frammentazione è quindi dominato dalla stabilità del nucleo aromatico e dalle scissioni tipiche dei gruppi tert-butilici.

Sebbene questo composto sia stato rilevato con una certa ricorrenza nei campioni analizzati, la sua origine biologica risulta incerta. Il 2,4-di-tert-butylphenol è infatti frequentemente segnalato in letteratura come contaminante derivante da materiali plastici, additivi antiossidanti o prodotti di degradazione di polimeri, piuttosto che come metabolita secondario delle piante. Pertanto, la sua presenza nei campioni è stata considerata con cautela e interpretata come possibile contaminazione di origine esogena.

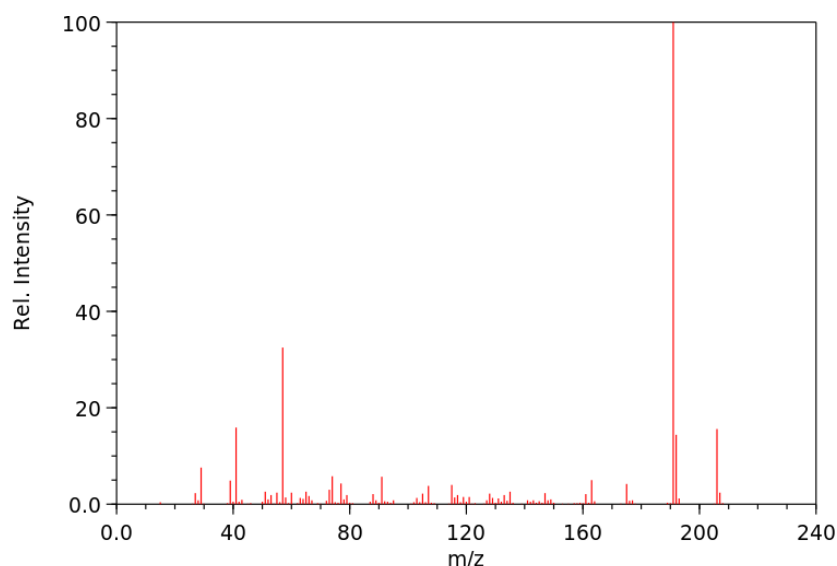


Figura 2.22. Spettro di massa (modalità EI) del 2,4-di-tert-butylphenol.

- **Jasmone**

Il jasmone è un composto carbonilico appartenente alla classe dei ciclopentenoni insaturi, con formula molecolare $C_{11}H_{16}O$ e massa molare pari a 164,24 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è costituita da un anello ciclopentenone sostituito con una catena alchilica insatura, configurazione che combina una porzione relativamente apolare con un gruppo carbonilico fortemente polare. In condizioni standard si presenta come un liquido incolore o leggermente giallastro, con punto di ebollizione di circa 255–260 °C e densità pari a circa 0,94 g·cm⁻³ a 25 °C. Il valore di logP (≈ 3) indica una moderata lipofilia, mentre la presenza del gruppo chetonico consente interazioni dipolari e una solubilità in acqua superiore rispetto ai terpeni idrocarburici. La tensione di vapore relativamente bassa riflette una volatilità inferiore rispetto ai monoterpeni, pur rientrando tra i composti volatili biologicamente attivi emessi dalle piante.

Nello spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI, 70 eV) (Figura 2.23), il jasmone presenta uno ione molecolare M^{+} a m/z 164 ben osservabile, grazie alla stabilità del sistema insaturo coniugato. Il picco base osservato a m/z 83 è attribuibile alla formazione di un catione ciclopentenonico stabilizzato per risonanza, derivante da scissioni della catena laterale. Tra i frammenti diagnostici si osservano i segnali a m/z 55 e m/z 41, associati rispettivamente a frammenti allilici e a specie cationiche a bassa massa generate da ulteriori scissioni lungo la catena insatura. Il pattern di frammentazione, dominato da scissioni α

rispetto al gruppo carbonilico e dalla formazione di cationi ciclici stabilizzati, risulta altamente caratteristico per questa classe di ossilipine ciclopentenoniche.

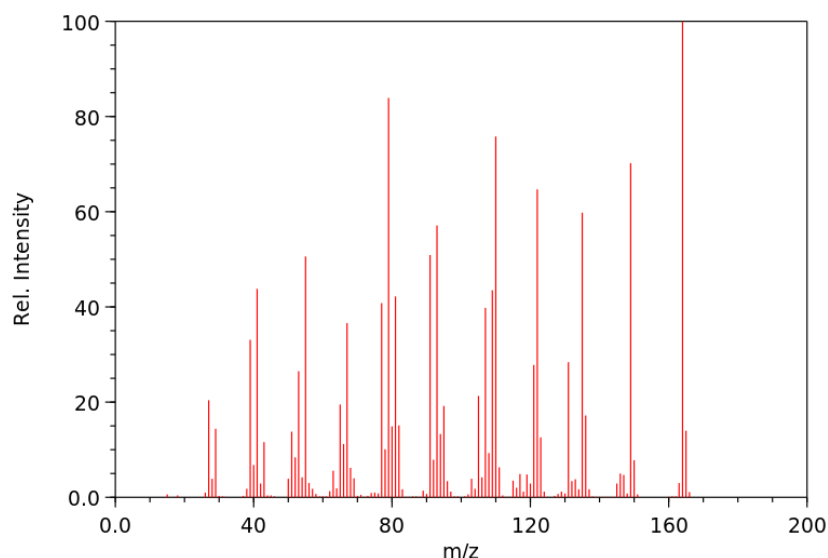


Figura 2.23. Spettro di massa (modalità EI) del jasmone.

2.2.2 Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa

La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) rappresenta una delle tecniche analitiche più consolidate per l'analisi qualitativa e quantitativa di composti organici volatili e semi-volatili. L'elevata potenza di tale metodologia deriva dall'integrazione sinergica tra un sistema di separazione basato su fenomeni di ripartizione termodinamica e un sistema di rivelazione capace di fornire informazioni strutturali molecola-specifiche.

Nel modulo gascromatografico, la separazione degli analiti avviene in seguito alla loro distribuzione differenziale tra una fase mobile gassosa e una fase stazionaria immobilizzata lungo la superficie interna di una colonna. Il tempo di ritenzione (t_R) di ciascun composto, ovvero il tempo impiegato da un composto per attraversare la colonna cromatografica, è determinato dall'equilibrio dinamico tra adsorbimento e desorbimento sulla fase stazionaria, nonché dalle proprietà termodinamiche dell'analita, quali tensione di vapore, polarità e coefficienti di ripartizione.

Dal punto di vista teorico, l'efficienza del processo separativo viene descritta mediante il modello dei piatti teorici, secondo il quale la colonna può essere considerata come una

successione di stadi di equilibrio ideali. Il numero di piatti teorici (N) costituisce un parametro quantitativo della capacità risolutiva del sistema, mentre l'altezza equivalente a un piatto teorico (HETP) rappresenta un indice inversamente proporzionale all'efficienza cromatografica. Questi due parametri sono legati dalla seguente equazione:

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Le prestazioni della colonna risultano inoltre fortemente influenzate dai fenomeni diffusivi e cinetici descritti dall'equazione di Van Deemter (Figura 2.24), che mette in relazione l'efficienza con la velocità lineare del gas carrier attraverso contributi di diffusione multipla (A), diffusione longitudinale (B) e resistenza al trasferimento di massa (C).

$$HETP(u) = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

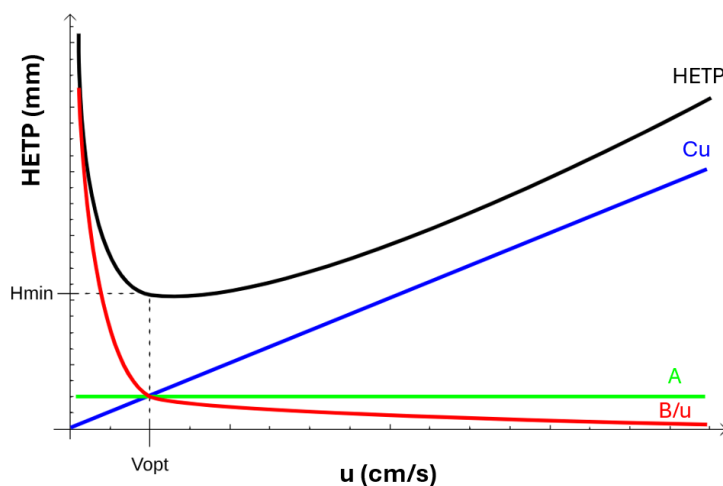


Figura 2.24. Equazione di Van Deemter [30].

Nei sistemi GC moderni, la separazione viene effettuata mediante colonne capillari in silice fusa, caratterizzate da elevato rapporto lunghezza/diametro interno e rivestite da film sottili

di fase stazionaria polimerica. La natura chimica della fase stazionaria determina il meccanismo di interazione con gli analiti, influenzando parametri quali selettività, fattore di capacità e risoluzione cromatografica. La scelta della polarità della fase rappresenta quindi un elemento critico nella progettazione del metodo analitico.

Per quanto concerne l'analisi, l'introduzione del campione avviene in un sistema di iniezione termostato, che consente la rapida vaporizzazione dell'analita e il suo trasferimento nel flusso del gas carrier. Le modalità operative split e splitless permettono di modulare la quantità di analita introdotta nella colonna, influenzando direttamente sensibilità e linearità della risposta strumentale.

Al termine della separazione cromatografica, gli analiti che vengono eluiti sono trasferiti alla sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa. Nei sistemi GC-MS, il processo di ionizzazione più comunemente impiegato è l'impatto elettronico, che avviene mediante l'interazione con un fascio di elettroni ad energia controllata, tipicamente pari a 70 eV. Questo processo comporta la formazione di uno ione molecolare radicalico e la successiva frammentazione della molecola secondo meccanismi di scissione prevedibili, quali rotture omolitiche, riarrangiamenti e formazione di cationi stabilizzati per risonanza.

Gli ioni generati vengono separati in funzione del rapporto massa/carica mediante un analizzatore di massa, generalmente di tipo quadrupolare (Figura 2.25). In tale dispositivo, campi elettrici oscillanti permettono la trasmissione selettiva degli ioni con traiettoria stabile, mentre gli altri vengono eliminati. Il segnale ionico viene infine amplificato da un rivelatore a moltiplicazione elettronica, consentendo la registrazione dello spettro di massa.

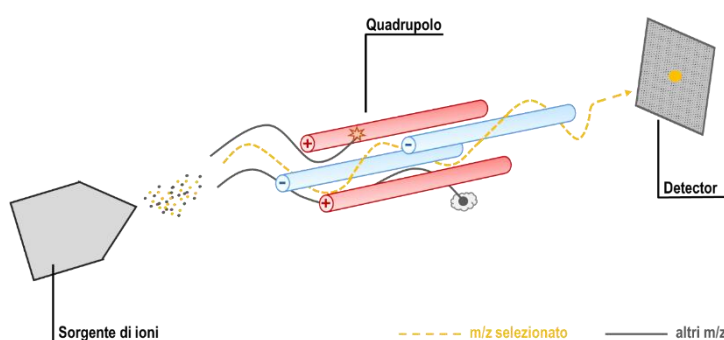


Figura 2.25. Rappresentazione grafica di uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo.

Dal punto di vista operativo, la spettrometria di massa può essere utilizzata in modalità full scan o in modalità Selected Ion Monitoring (SIM). La prima consente l'acquisizione dell'intero intervallo di masse, risultando particolarmente indicata per analisi esplorative e identificazione di composti sconosciuti. La modalità SIM, invece, prevede il monitoraggio selettivo di specifici ioni diagnostici e consente di ottenere un significativo incremento della sensibilità e del rapporto segnale-rumore, risultando pertanto particolarmente adatta per determinazioni quantitative mirate.

Infine, i dati acquisiti possono essere rappresentati come cromatogrammi di ioni totali, che forniscono una visione globale del profilo analitico, oppure come cromatogrammi di ioni estratti, che permettono di migliorare la selettività dell'analisi e di discriminare eventuali fenomeni di co-eluzione.

La GC-MS costituisce dunque, una piattaforma analitica di riferimento per la caratterizzazione di composti organici volatili, grazie alla combinazione di elevata efficienza separativa, specificità strutturale e sensibilità analitica, consentendo la determinazione affidabile di analiti anche a livelli di concentrazione molto bassi.

Nel contesto dell'analisi del volatiloma vegetale, l'impiego della GC-MS in modalità Selected Ion Monitoring risulta particolarmente vantaggioso, poiché consente la determinazione mirata di composti organici volatili presenti a basse concentrazioni in matrici complesse. In tali applicazioni, la selezione preventiva di ioni diagnostici per ciascun analita permette di incrementare significativamente la sensibilità e la selettività del metodo, riducendo al contempo le interferenze di matrice e il rumore di fondo. L'identificazione dei composti si basa sulla combinazione di parametri cromatografici, quali il tempo di ritenzione, e di criteri spettrometrici, quali la presenza di frammenti caratteristici e i rapporti di intensità tra gli ioni monitorati. Questo approccio consente di ottenere dati quantitativi affidabili e riproducibili e rende la GC-MS uno strumento fondamentale per lo studio delle variazioni del profilo volatile in sistemi biologici complessi, come nel caso delle emissioni gassose di piante sottoposte a differenti condizioni fisiologiche o ambientali.

2.2.3 Validazione del metodo analitico

La validazione di un metodo analitico rappresenta il processo mediante il quale vengono dimostrate, attraverso evidenze sperimentali documentate, l'affidabilità e l'idoneità del metodo rispetto allo scopo analitico prefissato ("fitness for purpose"). Essa consente di

caratterizzare quantitativamente le prestazioni del metodo attraverso la determinazione delle cosiddette figure di merito, definite secondo linee guida internazionali (ICH, AOAC, Eurachem).

Nel caso di metodi sviluppati internamente, si parla di validazione primaria, mentre qualora il metodo sia già riportato in letteratura o validato da altro laboratorio, si procede con una validazione secondaria (o verifica), finalizzata a confermare che le prestazioni dichiarate siano mantenute nelle specifiche condizioni operative del laboratorio utilizzatore (strumentazione, operatori, matrice campionaria).

Le principali figure di merito considerate nella validazione di un metodo quantitativo includono precisione, accuratezza, linearità, sensibilità, limiti di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ), range operativo, selettività e robustezza.

La precisione esprime il grado di concordanza tra misure replicate ed è generalmente valutata come deviazione standard relativa (RSD%), distinguendo tra ripetibilità (condizioni operative costanti) e precisione intermedia (variazioni di giorno, operatore o strumentazione). L'accuratezza descrive invece la vicinanza del valore misurato al valore vero o di riferimento ed è tipicamente stimata mediante prove di recupero o confronto con materiali certificati.

La linearità rappresenta la capacità del metodo di fornire una risposta proporzionale alla concentrazione dell'analita entro un intervallo definito. Essa viene verificata mediante regressione lineare dei dati di calibrazione e successiva valutazione statistica del modello. In particolare, la significatività della pendenza e dell'intercetta può essere verificata tramite test t-Student, mentre l'adeguatezza globale del modello è valutabile mediante analisi della varianza (ANOVA) della regressione. Il test di lack-of-fit consente inoltre di verificare l'eventuale presenza di deviazioni sistematiche dalla linearità, distinguendo l'errore puro dall'errore di modello.

I limiti di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) rappresentano parametri fondamentali nei metodi per l'analisi di tracce. Il LOD corrisponde alla minima concentrazione rilevabile, mentre il LOQ definisce la minima concentrazione quantificabile con precisione e accuratezza accettabili. Tali parametri sono strettamente connessi alla sensibilità del metodo, intesa come variazione della risposta in funzione della concentrazione.

La selettività descrive la capacità del metodo di discriminare l'analita di interesse da potenziali interferenti presenti nella matrice, mentre la robustezza valuta la stabilità delle prestazioni analitiche al variare controllato di parametri operativi.

Nel caso di metodi cromatografici accoppiati alla spettrometria di massa, ulteriori parametri possono contribuire alla caratterizzazione della risposta analitica e alla conferma dell'identificazione dei composti. Tra questi rientrano i fattori di risposta (RF) e gli indici di ritenzione (RI). I fattori di risposta consentono di esprimere la risposta strumentale degli analiti in relazione allo standard interno, permettendo una quantificazione più accurata e comparabile tra diverse analisi. Gli indici di ritenzione, calcolati mediante l'utilizzo di una serie omologa di n-alcani analizzati nelle stesse condizioni cromatografiche, rappresentano invece un parametro aggiuntivo di identificazione dei composti, consentendo il confronto dei tempi di ritenzione con valori riportati in letteratura e migliorando l'affidabilità dell'assegnazione degli analiti.

Nel presente lavoro è stato utilizzato il metodo GC–MS precedentemente sviluppato e validato nell'ambito dello stesso progetto di ricerca (Ferretti et al., 2025). La validazione primaria del metodo ha incluso la valutazione delle principali figure di merito analitiche, tra cui linearità, precisione, accuratezza, limiti di rivelazione e quantificazione, secondo procedure statistiche consolidate. Nel contesto di questo studio, il metodo validato è stato applicato all'analisi dei campioni vegetali per la determinazione dei composti organici volatili. Le elaborazioni statistiche effettuate sui dati ottenuti (ANOVA, test post-hoc di Tukey e analisi delle componenti principali) sono invece state condotte nell'ambito del presente lavoro e sono descritte nella sezione dedicata all'analisi statistica.

2.2.4 Analisi statistica applicata al sistema in esame

Nell'ambito della chimica analitica moderna, l'elaborazione statistica dei dati riveste un ruolo centrale nella validazione e nell'interpretazione dei risultati sperimentali. La determinazione quantitativa di un analita non è infatti sufficiente a garantire l'affidabilità del dato, poiché ogni misura è intrinsecamente soggetta a variabilità strumentale, incertezza di campionamento e dispersione biologica. L'applicazione di strumenti statistici appropriati consente di distinguere le variazioni sistematiche da quelle casuali, valutare la significatività delle differenze osservate e supportare in modo quantitativo le conclusioni sperimentali.

In funzione del disegno sperimentale e della natura dei dati, possono essere impiegate differenti strategie di trattamento statistico, comprendenti procedure di trasformazione delle variabili, gestione dei valori censurati, test parametrici o non parametrici e metodi per il confronto multiplo tra gruppi. La scelta del test deve essere coerente con le caratteristiche del dataset e con le ipotesi da verificare, al fine di garantire rigore metodologico e solidità interpretativa.

Nel presente studio, l'elaborazione dei dati, previa normalizzazione delle concentrazioni rispetto ad uno standard interno e gestione dei valori al di sotto del limite di rilevabilità, è stata condotta mediante un approccio parametrico, basato sull'analisi della varianza (ANOVA), sul test post-hoc di Tukey e sulla analisi delle componenti principali (PCA).

- **Analisi delle variazioni relative (fold change)**

Nel confronto tra gruppi sperimentali è spesso utile affiancare ai test statistici inferenziali un indicatore descrittivo della variazione relativa dell'intensità del segnale analitico. A questo scopo è stato utilizzato il fold change (FC), parametro comunemente impiegato nell'analisi di dati metabolomici e di profili di composti volatili per quantificare l'entità della variazione tra due condizioni sperimentali [32].

Il fold change esprime il rapporto tra il valore medio osservato in un gruppo trattato e quello misurato nel gruppo di riferimento (controllo), secondo la relazione:

$$FC = \frac{\bar{X}_{trattamento}}{\bar{X}_{controllo}}$$

dove $\bar{X}$ rappresenta la media della concentrazione o dell'intensità del segnale dell'analita nei rispettivi gruppi.

Valori di $FC > 1$ indicano un aumento relativo del segnale analitico (up-regulation), mentre valori $FC < 1$ indicano una diminuzione (down-regulation). Il fold change fornisce quindi una misura immediata dell'entità della variazione osservata tra due condizioni sperimentali, pur non costituendo di per sé un test di significatività statistica. Per questo motivo, nella pratica

analitica esso viene generalmente utilizzato come strumento descrittivo preliminare, da affiancare a test statistici inferenziali quali l'analisi della varianza (ANOVA) o test post-hoc.

- **Analisi della varianza (ANOVA)**

L'analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) è una procedura statistica parametrica impiegata per verificare l'esistenza di differenze significative tra le medie di più gruppi indipendenti [33]. In chimica analitica, l'ANOVA è largamente utilizzata per confrontare risultati ottenuti in differenti condizioni sperimentali, valutare l'effetto di diversi tipi di trattamento del campione o verificare la presenza di variazioni sistematiche tra serie di campioni.

L'impiego dell'ANOVA risulta quindi particolarmente appropriato nel contesto analitico in quanto consente di discriminare variazioni dovute a condizioni sperimentali da quelle attribuibili alla variabilità intrinseca del metodo.

Nell'ambito di questo progetto, l'analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) è stata impiegata per verificare l'esistenza di differenze significative tra le medie di più gruppi indipendenti. Il principio dell'ANOVA consiste nel confrontare la variabilità tra gruppi con la variabilità interna ai gruppi. La variabilità totale (Total Sum of Squares, SS_T) può essere scomposta secondo la relazione:

$$SS_T = SS_B + SS_W$$

dove SS_B rappresenta la variabilità tra gruppi (Between Groups Sum of Squares) e SS_W la variabilità interna ai gruppi (Within Groups Sum of Squares).

Le quantità sono definite come:

$$SS_B = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

$$SS_W = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

dove $\bar{x}_i$ è la media del gruppo i, $\bar{x}$ è la media globale, n_i è il numero di osservazioni nel gruppo i e x_{ij} il j-esimo valore del gruppo i.

Le varianze medie (Mean Squares) si ottengono dividendo le somme dei quadrati per i rispettivi gradi di libertà:

$$MS_B = \frac{SS_B}{k - 1}$$

$$MS_W = \frac{SS_W}{N - k}$$

dove k rappresenta il numero di gruppi e N il numero totale di osservazioni.

La statistica F è quindi definita come:

$$F = \frac{MS_B}{MS_W}$$

Un valore elevato di F indica che la variabilità tra gruppi è significativamente maggiore rispetto alla variabilità interna, suggerendo il rigetto dell'ipotesi nulla (H_0) di uguaglianza delle medie.

In altre parole, se la variabilità tra le medie dei gruppi risulta significativamente maggiore rispetto alla dispersione interna, il test restituisce un valore di F elevato e un p-value inferiore al livello di significatività prefissato (α), indicando che almeno una delle medie differisce dalle altre.

- **Test post-hoc di Tukey**

Anche se l'ANOVA evidenzia una differenza globale significativa, essa non specifica quali gruppi differiscano tra loro. A tal fine, si ricorre a test post-hoc per il confronto multiplo tra coppie di medie.

Nel presente lavoro è stato impiegato il test di Tukey (Tukey's Honestly Significant Difference, HSD), procedura che consente di effettuare confronti multipli controllando l'errore di tipo I complessivo (family-wise error rate) [33]. La differenza critica è calcolata come:

$$HSD = q_{\alpha,k,N-k} \cdot \sqrt{\frac{MS_W}{n}}$$

dove $q_{\alpha,k,N-k}$ è il valore critico della distribuzione studentizzata q, MS_W è la varianza residua stimata dall'ANOVA e n la numerosità del gruppo (nel caso di gruppi bilanciati). Due medie $\bar{x}_i$ e $\bar{x}_j$ sono considerate significativamente differenti se:

$$|\bar{x}_i - \bar{x}_j| > HSD$$

Nel caso di gruppi con numerosità differenti, il calcolo viene adattato utilizzando la media armonica delle numerosità campionarie.

In ambito analitico, tale controllo è essenziale quando si confrontano più condizioni sperimentali, poiché l'esecuzione di test multipli indipendenti aumenterebbe la probabilità di identificare differenze spurie.

In sostanza, il test di Tukey si basa sulla distribuzione della statistica q e consente di determinare se la differenza tra due medie sia maggiore di una soglia critica che dipende dalla numerosità dei campioni e dalla variabilità residua stimata dall'ANOVA. L'applicazione del test è risultata particolarmente utile per identificare le specifiche coppie di trattamenti responsabili delle differenze osservate.

- **Analisi delle Componenti Principali (PCA)**

L'Analisi delle Componenti Principali (Principal Component Analysis, PCA) è una tecnica multivariata non supervisionata finalizzata alla riduzione della dimensionalità di un dataset preservando la massima quota possibile di varianza totale [34].

Sia X la matrice dei dati di dimensione $n \times p$, dove n rappresenta il numero di campioni e p il numero di variabili. Dopo centratura rispetto alla media, la PCA si basa sulla decomposizione della matrice di covarianza:

$$S = \frac{1}{n-1} X^T X$$

Le componenti principali sono ottenute risolvendo il problema agli autovalori:

$$S v_i = \lambda_i v_i$$

dove λ_i rappresenta l'autovalore associato alla componente i e v_i il corrispondente autovettore (loading). Gli autovalori quantificano la varianza spiegata da ciascuna componente principale, mentre gli autovettori definiscono la direzione nello spazio delle variabili lungo cui tale varianza è massimizzata.

I punteggi (scores) dei campioni lungo ciascuna componente sono calcolati come:

$$t_i = X v_i$$

La prima componente principale (PC1) massimizza la varianza proiettata dei dati; le componenti successive, ortogonali tra loro, descrivono quote progressivamente decrescenti di varianza.

Capitolo 3 – Sezione sperimentale

3.1 *Materiali e metodi*

Il seguente paragrafo descrive i materiali impiegati e le metodologie adottate nello svolgimento delle attività sperimentali.

3.1.1 *Materiali*

- Esano chromatographic grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 139386
- Styrene purezza $\geq 99\%$, ReagentPlus®, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto S4972
- Linalool purezza $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W263508
- (R)-(+)-limonene purezza 97%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 183164
- α -pinene purezza 98%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 147524
- Methyl salicylate purezza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto M6752
- (-)-trans-caryophyllene analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 75541
- Methyl jasmonate purezza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W341002
- α -humulene purezza $>96\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto PHL83351
- (-)- β -elemene analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 63965
- Myrcene purezza 97%, %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W276200
- 6-methyl-5-hepten-2-one purezza 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto M48805

- Ocimene purezza $\geq 90\%$, %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W353977
- (+)-2-carene purezza 97%, %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 232386
- Terpinolene analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto W353977
- trans- β -farnesene analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 73492
- 2,4-Di-tert-butylphenol standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) codice prodotto 137731
- Jasmone analytical standard, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 59975
- Tenax TA 60-80 mesh, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 11982
- Alkane standard mixture for performance tests of GC-systems, analytical standard, C10 - C40 (all even), 50 mg/l each, codice prodotto 68281-2ML-F
- Soluzioni stock di ciascun analita preparate a 200 $\mu\text{L/L}$ 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 TG-5MS, Thermo Scientific (30 m x 0.25 mm I.D. 0.25 μm film thickness)

3.1.2 Metodi

- Metodo GC-MS

Il programma di riscaldamento del gascromatografo utilizzato sulla colonna TG-5MS è il seguente: Il programma di temperatura del forno è stato impostato come segue: temperatura iniziale di 40 °C mantenuta per 1 min, quindi incremento di 2 °C·min⁻¹ fino a 80 °C, con sosta isoterma di 0,1 min. Successivamente, la temperatura è stata aumentata di 3 °C·min⁻¹ fino a 120 °C (sosta isoterma 0,1 min), quindi di 6 °C·min⁻¹ fino a 200 °C (sosta

isoterma 0,1 min) e infine di 10 °C·min⁻¹ fino a 250 °C, mantenuti per 0,93 min. Il tempo totale di analisi è risultato pari a 54 min.

L'identificazione dei composti è stata eseguita in modalità full scan mediante acquisizione del cromatogramma a corrente ionica totale (TIC), con intervallo di massa compreso tra 40 e 350 m/z. Gli spettri ottenuti sono stati confrontati con le librerie spettrali in dotazione allo strumento e con il database NIST al fine di confermare l'identità degli analiti. Le determinazioni quantitative, comprensive delle fasi di calibrazione, validazione del metodo e analisi dei campioni reali, sono state invece effettuate in modalità Selected Ion Monitoring (SIM), monitorando gli ioni diagnostici specifici per ciascun composto.

Ioni monitorati:

- Linalool: m/z 71
- (R)-(+)-limonene: m/z 68
- α-pinene: m/z 91
- Methyl salicylate: m/z 120
- (-)-trans-caryophyllene: m/z 133
- Methyl jasmonate: m/z 151
- α-humulene: m/z 93
- (-)-β-elemene: m/z 107
- Myrcene: m/z 93
- 6-methyl-5-hepten-2-one: m/z 108
- Ocimene: m/z 79
- (+)-2-carene: m/z 136
- Terpinolene: m/z 93, 121
- trans-β-farnesene: m/z 69
- 2,4-di-tert-butylphenol: m/z 191
- Jasmone: m/z 110

Il metodo GC–MS impiegato per l'analisi dei composti organici volatili è stato applicato conformemente al protocollo di validazione precedentemente sviluppato e pubblicato nell'ambito di questo progetto per matrici analoghe [15]. Tale protocollo prevede la

determinazione delle principali figure di merito analitiche mediante procedure statistiche consolidate, includendo la valutazione di linearità, significatività della regressione, test di lack of fit, limiti di rivelazione e quantificazione (LOD e LOQ), precisione intra- e inter-giornaliera e accuratezza.

Nel presente lavoro, le medesime condizioni operative e i criteri statistici descritti in letteratura sono stati adottati al fine di garantire la coerenza metodologica e l'affidabilità delle misure quantitative ottenute. Ad essi sono stati affiancati anche i valori di RF e RI calcolati per ogni analita al fine di irrobustire l'affidabilità dell'assegnazione.

I fattori di risposta (RF) sono stati calcolati al fine di quantificare la concentrazione degli analiti target rispetto al segnale dello standard interno. Gli indici di ritenzione (RI) sono stati invece determinati utilizzando una miscela di n-alcani analizzata nelle medesime condizioni cromatografiche, permettendo il confronto con i valori riportati in letteratura e fornendo un ulteriore parametro di conferma per l'identificazione dei composti.

I fattori di risposta sono stati calcolati, per ogni livello di calibrazione come segue:

$$R_A = \frac{A_x}{A_{IS}}; \quad R_C = \frac{C_x}{C_{IS}}$$

$$R_F = \frac{R_A}{R_C}$$

Con A_x e C_x che corrispondono rispettivamente all'area e alla concentrazione dell'analita e A_{IS} e C_{IS} che corrispondono rispettivamente all'area e alla concentrazione dello standard interno.

Per ottenere le concentrazioni degli analiti dai vari campioni si è utilizzata la seguente formula:

$$C_x = \frac{R_A \times C_{IS}}{R_F}$$

Dopo aver ottenuto i valori dei tempi di ritenzione $t_R(n)$ degli alcani contenuti all'interno della miscela analizzata è stato calcolato il valore di RI_x per ogni analita come segue:

$$RI_x = 100 \cdot \left[n + \frac{t_R(x) - t_R(n)}{t_R(n+1) - t_R(n)} \right]$$

Dove:

- RI_x = index di Van Den Dool & Kratz dell'analita x
- n = numero di atomi di carbonio dell'alcano precedente all'analita x
- $t_R(x)$ = tempo di ritenzione dell'analita x
- $t_R(n), t_R(n+1)$ = tempi di ritenzione degli alcani prima e dopo l'analita x

- Trattamento delle piante

I semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L., cultivar Heinz 1301) sono stati sterilizzati lavandoli con acqua sterile per 5 minuti, quindi trattati con ipoclorito di sodio (NaClO) al 20% e successivamente risciacquati tre volte con acqua sterile sotto cappa biologica. I semi sono stati pre-germinati in capsule Petri su carta Whatman e mantenuti al buio a 25 °C in incubatore per tre giorni.

I semi pre-germinati sono stati quindi trasferiti in vasi di plastica da 5 L. Il substrato di crescita utilizzato era un terriccio commerciale (Radicom[®], Vigorplant). Secondo le specifiche tecniche del produttore, Radicom Universal è costituito da una miscela di torba bianca fine, torba bruna (0–40 mm), compost verde, EcoFibra[®] e fibra di cocco. I parametri fisico-chimici dichiarati sono pH 6,5–7,5 (H₂O) e conducibilità elettrica (EC) pari a 0.35–0.45 dS/m.

Le piante sono state irrigate tre volte a settimana con acqua di rubinetto. Le condizioni della serra erano le seguenti: fotoperiodo di 16 h luce / 8 h buio, temperatura compresa tra 22 e 26 °C e umidità relativa pari al 60–70%.

- Inoculo del simbionte

Le specie di *Trichoderma* selezionate per il test sono state: due ceppi di *T. asperellum* (denominati T1 e T4), *T. viride* (T2) e *T. polysporum* (T3). Tutti questi ceppi sono stati isolati e caratterizzati presso l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), sede di Portici (Italia), ad eccezione del ceppo T4, isolato da collaboratori algerini del progetto ASTER da un suolo sub-sahariano in Algeria.

Per la preparazione dell'inoculo, i quattro ceppi di *Trichoderma* sono stati coltivati su terreno Potato Dextrose Agar (PDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) per una settimana a 28–30 °C al buio. Sotto cappa biologica, le spore sono state delicatamente raschiate dalla superficie della piastra con 10 µL di soluzione di MgSO₄ utilizzando un'ansa sterile. La sospensione ottenuta è stata regolata per raggiungere una concentrazione di circa 10⁷ spore/mL, come descritto da Yedidia et al. (2001) [35].

Per ogni pianta di una settimana di età sono stati somministrati 20 mL della sospensione di *Trichoderma*.

- Raccolta dei VOCs e analisi

Il campionamento dei composti volatili è stato effettuato quattro settimane dopo l'inoculo e una settimana dopo l'infestazione con larve di *Phthorimaea absoluta*. Ogni settimana è stata testata una diversa specie di *Trichoderma*, sia singolarmente sia in combinazione con le larve di *P. absoluta*.

Sono state utilizzate le seguenti sigle sperimentali:

- TR = piante inoculate con diverse specie di *Trichoderma* (T1–T4)
- INF = piante infestate con larve di *P. absoluta*
- TR+INF = piante inoculate con *Trichoderma* e infestate con *P. absoluta*
- CNT = piante non inoculate, irrigate con soluzione di MgSO₄ 0,1 M

Per ciascun trattamento settimanale sono state utilizzate 20 piante.

Le analisi del volatiloma sono state effettuate su piante di cinque settimane di età. I VOCs sono stati raccolti per 5 ore mediante un sistema di campionamento a circuito ermetico

(airtight-entrainment system) (Figura 3.1) costituito da una pompa peristaltica impostata a un flusso di 200 mL/min, che generava un flusso continuo di aria in ingresso nel contenitore e in uscita attraverso cartucce adsorbenti in vetro borosilicato realizzate su misura (lunghezza 100 mm; diametro esterno 5 mm; diametro interno 4 mm; Cheimika, Italia).

I tubi adsorbenti sono stati riempiti manualmente sotto cappa chimica con 35 mg di Tenax[®] TA (60/80 mesh) e sigillati alle estremità con lana di vetro. Prima dell'uso, i tubi adsorbenti sono stati preparati e condizionati mediante tre lavaggi con esano puro, seguiti da essiccazione overnight a 60 °C in stufa ventilata.

Al termine del periodo di campionamento, i VOCs adsorbiti sono stati immediatamente desorbiti aggiungendo 1,5 mL di esano grado cromatografico direttamente in ciascuna cartuccia adsorbente. L'eluato ottenuto è stato trasferito in vial e conservato a +4 °C fino all'analisi GC-MS.

Il campionamento si è articolato dunque in una fase di adsorbimento dei composti volatili sulla matrice solida e in una fase di desorbimento mediante estrazione dinamica con solvente in preparazione all'analisi GC-MS.

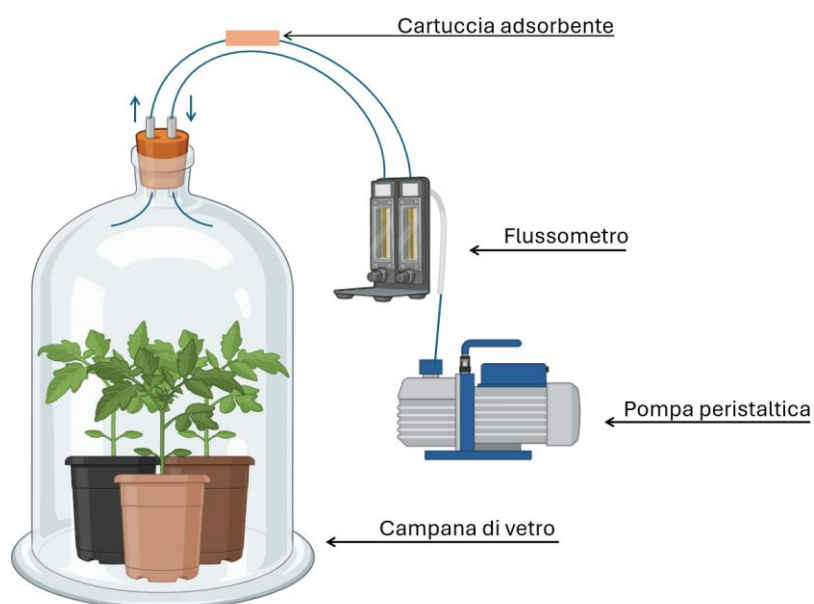


Figura 3.1. Schematizzazione del sistema di campionamento impiegato.

La scelta del materiale adsorbente è stata effettuata considerando le condizioni di elevata umidità necessaria al sistema biologico e la natura chimica degli analiti target [36]. Il Tenax® è stato selezionato per la sua stabilità, la bassa affinità per l'acqua e l'idoneità all'adsorbimento di composti organici volatili di medio-alta volatilità.

Prima dell'analisi GC–MS, i campioni sono stati filtrati con filtri in PTFE (0,22 µm) e addizionati con 500 µL di una soluzione di stirene (10 ppm), impiegato come standard interno.

- Analisi statistica

L'elaborazione statistica è stata condotta sul dataset contenente le concentrazioni degli analiti target espresse in µg·L⁻¹, ottenute dall'analisi GC–MS e normalizzate rispetto allo standard interno. Prima dell'elaborazione statistica, il dataset è stato sottoposto a verifica di coerenza numerica, uniformazione delle variabili e controllo della presenza di valori censurati.

I valori inferiori al limite di rilevabilità (<LOD) e quelli non determinabili (n.a.) sono stati trattati come dati censurati a sinistra e sostituiti con un valore pari a LOD/2. Tale procedura, comunemente adottata negli studi di chimica analitica per la gestione di dati sottosoglia, consente di evitare l'introduzione di valori nulli che potrebbero alterare la distribuzione statistica dei dati e determinare una sottostima sistematica dei valori medi [31].

Le differenze tra i gruppi sperimentali sono state valutate mediante analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) applicata separatamente a ciascun analita. L'analisi è stata condotta considerando quattro gruppi di campioni: piante di controllo (CNT), piante infestate da Tuta absoluta (INF), piante trattate con Trichoderma (TR) e piante trattate con Trichoderma e infestate da Tuta absoluta (INF + TR).

L'ipotesi nulla (H_0) prevede l'uguaglianza delle medie tra i gruppi analizzati, mentre l'ipotesi alternativa (H_1) indica la presenza di almeno una differenza statisticamente significativa. In presenza di risultati significativi ($p < 0,05$), i confronti multipli tra i gruppi sono stati effettuati mediante test post-hoc di Tukey, al fine di individuare le coppie di gruppi responsabili delle differenze osservate. Per tutte le analisi è stato adottato un livello di significatività pari a $\alpha = 0,05$, valore comunemente utilizzato negli studi chimico-analitici.

Al fine di esplorare la struttura multivariata del dataset e valutare eventuali pattern di raggruppamento tra i campioni, è stata inoltre applicata un'analisi delle componenti principali (Principal Component Analysis, PCA) ai dati quantitativi centrati e scalati. Questo approccio multivariato consente di ridurre la dimensionalità del dataset mantenendo la maggior parte della variabilità originale e di identificare le variabili che contribuiscono maggiormente alla separazione tra i campioni. L'analisi PCA è stata utilizzata come strumento complementare all'analisi univariata (ANOVA), fornendo una rappresentazione complessiva del comportamento del sistema.

3.2 Risultati e discussioni

In totale sono stati analizzati 80 campioni, suddivisi in quattro gruppi sperimentali (CNT, TR, INF, INF+TR), con 20 repliche biologiche per ciascun trattamento. Le concentrazioni dei composti volatili sono state determinate mediante analisi GC-MS e successivamente elaborate statisticamente.

Per ciascun analita target sono stati registrati i valori di concentrazione ottenuti, inclusi i casi in cui il segnale risultava inferiore ai limiti di rivelazione o quantificazione del metodo. I dati grezzi completi relativi agli 80 campioni analizzati sono riportati in Appendice A.

In Figura 3.2 è riportato un cromatogramma tipico dei campioni analizzati.

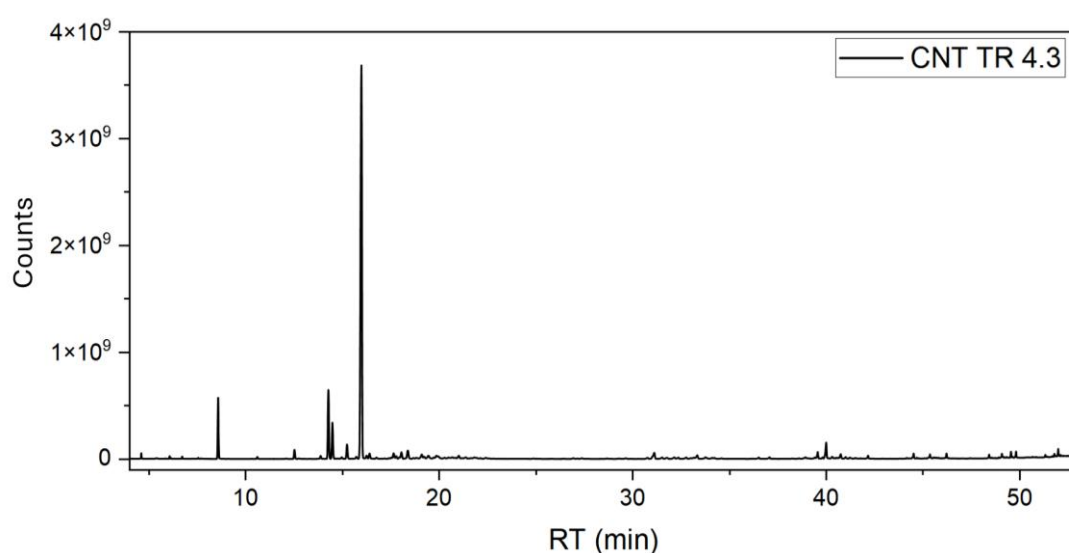


Figura 3.2. Cromatogramma registrato per il campione CNT TR 4.3.

I risultati presentati nel presente lavoro sono stati ottenuti utilizzando il metodo analitico GC–MS precedentemente sviluppato e validato nell’ambito dello stesso progetto di ricerca. L’applicazione del metodo al dataset sperimentale ha consentito la rilevazione e quantificazione di diversi composti appartenenti principalmente alla classe dei monoterpeni, evidenziando variazioni nelle concentrazioni dei VOCs tra i diversi gruppi di campioni analizzati. In particolare, già dall’osservazione preliminare dei dati quantitativi è possibile riconoscere differenze tra i campioni di controllo (CNT) e quelli trattati con *Trichoderma* (TR), con una generale riduzione delle concentrazioni di alcuni monoterpeni nei campioni trattati. Allo stesso tempo, alcuni analiti inclusi nel metodo target non sono stati rilevati nei campioni analizzati nel presente studio, nonostante fossero stati osservati in precedenti campagne sperimentali condotte con la stessa metodica. Questo suggerisce che le differenze osservate non siano attribuibili a limiti del metodo analitico, bensì a variazioni del profilo emissivo delle piante nelle diverse condizioni sperimentali

Nel corso di questo studio sono stati inoltre determinati, per ciascun analita, i fattori di risposta (RF) e gli indici di ritenzione (RI), al fine di completare la caratterizzazione cromatografica e migliorare l’affidabilità dell’identificazione dei composti volatili.

In Tabella 3.1 sono riportati i valori di R_F e RI_x per ciascun analita, e i valori di R^2 , LOD e LOQ ricalcolati.

Analita	RT	RI	RF	R^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
α -pinene	10,61	-	0,57302	0,9993	0,0162	0,0194
6-methyl-5-hepten-2-one	13,61	-	0,57302	0,9993	0,0162	0,0194
myrcene	13,88	-	0,58595	0,9970	0,0699	0,0702
(+)-2-carene	14,28	-	0,38920	0,9986	0,0001	0,0001
(R)-(+)-limonene	15,97	1012,02	0,91595	0,9988	0,0006	0,0007
Ocimene	17,41	1023,57	0,11426	0,9966	0,0787	0,0824
Terpinolene	19,85	1043,13	0,67425	0,9985	0,0502	0,0506
Linalool	20,75	1050,34	0,53393	0,9959	0,1053	0,1071
Methyl salicylate	26,31	1094,91	2,61205	0,9981	0,1338	0,1339
(-)- β -elemene	36,11	1195,62	0,18908	0,9925	0,1500	0,1521
Jasmone	36,33	1197,91	0,10455	0,9903	0,2489	0,2513
(-)-trans-caryophyllene	37,07	1209,59	0,33950	0,9909	0,0819	0,0826
α -humulene	38,22	1230,02	1,83879	0,9883	0,0337	0,0337
trans- β -farnesene	38,41	1233,39	0,56258	0,9943	0,1409	0,1416
2,4-di-tert-butylphenol	40,00	1261,63	0,94729	0,9891	0,1045	0,1140
Methyl jasmonate	43,23	1326,35	0,09038	0,9830	0,2622	0,2631

Tabella 3.1. Dati raccolti per ciascun analita target.

Per α -pinene, 6-methyl-5-hepten-2-one, myrcene e (+)-2-carene non è stato possibile calcolare il valore di RI_x a causa della mancata presenza di un picco antecedente al picco dell'analita.

Prima di procedere con l'analisi dei dati vengono riportati quattro cromatogrammi (Figura 3.3) sovrapposti, uno per tipologia di campione analizzato, registrati in full ms (range di misura: 45,0-350,0 m/z).

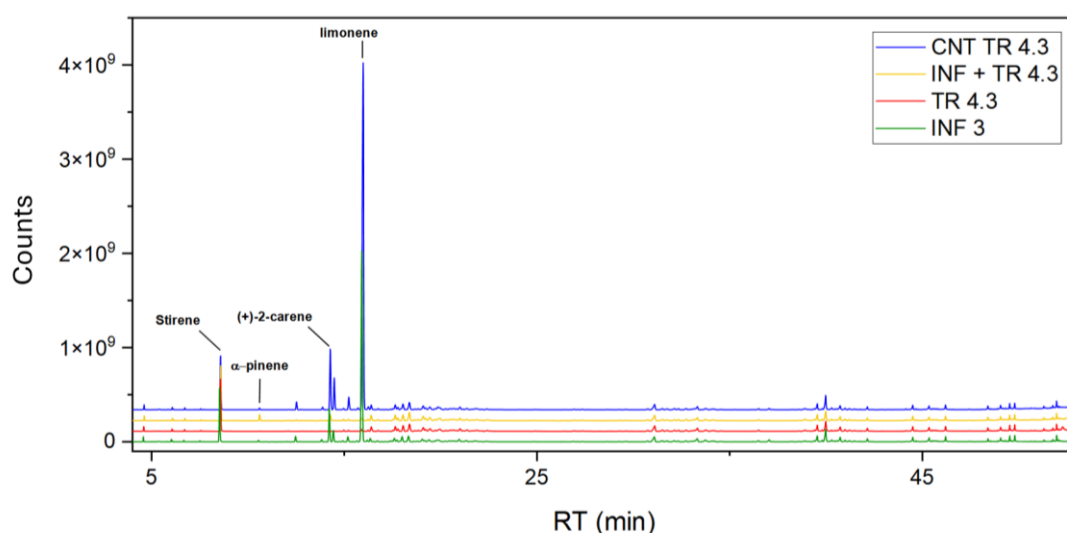


Figura 3.3. Cromatogrammi sovrapposti di quattro campioni analizzati.

Prima dell'elaborazione statistica dei dati, è stata effettuata un'analisi descrittiva delle variazioni relative nelle emissioni dei composti volatili tra i diversi trattamenti. A tale scopo è stato calcolato il fold change (FC) tra le concentrazioni medie dei campioni trattati con *Trichoderma* (TR) e quelle dei campioni di controllo (CNT) (Tabella 3.2).

Composto	Media CNT (µg/L)	Media TR (µg/L)	Fold change (TR/CNT)	Variazione %
α -pinene	154	25	0,16	-83,8 %
Myrcene	190	41	0,22	-78,4 %
(+)-2-carene	2406	157	0,07	-93,5 %
Limonene	1802	45	0,02	-97,5 %
Ocimene	32	3	0,09	-90,6 %
Linalool	176	161	0,91	-8,5 %

Tabella 3.2. *Fold change tra le concentrazioni medie dei monoterpeni.*

Il confronto tra le concentrazioni medie dei due gruppi evidenzia una marcata riduzione dell'emissione di diversi monoterpeni nelle piante inoculate con *Trichoderma*. In particolare, composti quali (+)-2-carene, limonene e ocimene mostrano le diminuzioni più significative, con riduzioni rispettivamente di circa il 93%, 97% e 91% rispetto ai controlli. Anche α -pinene e myrcene risultano significativamente ridotti, con diminuzioni rispettivamente dell'84% e del 78%.

Diversamente, linalool mostra una variazione molto più contenuta, suggerendo un comportamento relativamente stabile rispetto agli altri monoterpeni considerati.

Questa tendenza è coerente con quanto osservato qualitativamente dall'ispezione dei cromatogrammi registrati, nei quali i picchi relativi ai principali monoterpeni risultano visibilmente attenuati nei campioni TR rispetto ai controlli. Tale evidenza preliminare è stata successivamente verificata mediante analisi statistica inferenziale.

Di seguito sono riportate le analisi statistiche effettuate sulle emissioni monoterpeniche registrate negli 80 campioni analizzati.

3.2.1 Analiti monoterpenici

- **Analisi dei singoli monoterpeni**

I monoterpeni analizzati hanno rappresentato una componente rilevante del volatiloma delle piante di pomodoro analizzate e hanno mostrato una modulazione differenziale in funzione dei trattamenti sperimentali, costituiti da controllo (CNT), infestazione da *Tuta absoluta* (INF), trattamento con *Trichoderma* (TR) e combinazione infestazione + *Trichoderma* (INF+TR).

Per l' α -pinene sono emerse differenze altamente significative tra i trattamenti ($F(3,76) = 27,17$; $p < 0,001$). Il confronto multiplo ha evidenziato l'assenza di differenze tra CNT e INF, indicando che l'infestazione da *T. absoluta* non altera significativamente l'emissione del composto rispetto alle piante di controllo. Il trattamento con *Trichoderma* (TR) determina invece una riduzione significativa delle concentrazioni rispetto a tutti gli altri gruppi. Il

trattamento combinato INF+TR assume valori intermedi, significativamente inferiori a CNT e INF ma superiori a TR, delineando una struttura a due livelli distinti di emissione (Tabella 3.1).

Per il myrcene sono state osservate differenze significative ($F(3,76) = 11,04$; $p < 0,001$). Anche in questo caso CNT e INF risultano statisticamente sovrapponibili, mentre i trattamenti contenenti *Trichoderma* (TR e INF+TR) mostrano concentrazioni significativamente inferiori e non differiscono tra loro, configurando una separazione in due livelli distinti di emissione.

Il (+)-2-carene ha evidenziato una modulazione particolarmente marcata ($F(3,76) = 64,04$; $p < 0,001$). Il test di Tukey ha mostrato l'assenza di differenze tra CNT e INF, mentre TR e INF+TR risultano significativamente inferiori. Inoltre, TR presenta concentrazioni significativamente inferiori rispetto a INF+TR, delineando una risposta graduale articolata su due livelli.

Anche per il limonene sono state osservate differenze estremamente significative ($F(3,76) = 36,45$; $p < 0,001$). CNT e INF non differiscono tra loro, così come TR e INF+TR. Le differenze risultano invece significative tra i gruppi ad alta emissione (CNT, INF) e quelli a bassa emissione (TR, INF+TR), evidenziando una risposta dicotomica associata alla presenza di *Trichoderma*.

Un andamento analogo è stato osservato per l'ocimene ($F(3,76) = 13,76$; $p < 0,001$), per il quale CNT e INF risultano sovrapponibili, mentre TR e INF+TR mostrano concentrazioni significativamente inferiori e non differiscono tra loro.

Per il linalool non sono emerse differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($F(3,76) = 0,034$; $p = 0,992$). Le concentrazioni risultano sovrapponibili tra CNT, INF, TR e INF+TR, indicando che l'emissione di questo composto non è influenzata né dall'infestazione da *Tuta absoluta* né dalla presenza di *Trichoderma* nelle condizioni

sperimentali adottate. Questo comportamento differenziale rispetto agli altri monoterpeni potrebbe riflettere una regolazione distinta o una minore sensibilità ai fattori sperimentali considerati.

Il terpinolene è stato rilevato solo sporadicamente all'interno degli 80 campioni analizzati (n = 3 nel gruppo CNT), risultando inferiore al limite di rivelabilità nella maggior parte dei casi; pertanto, non è stata condotta un'analisi statistica comparativa per questo composto.

In Tabella 3.3 vengono riportati i valori appena descritti:

Analita	F (3,76)	p-value	CNT	INF	INF + TR	TR	Pattern statistico
α -pinene	27,17	< 0,001	a	a	b	b	Due livelli
Myrcene	11,04	< 0,001	a	a	b	b	Due livelli
(+)-2-carene	64,04	< 0,001	a	a	b	b	Due livelli
Limonene	36,45	< 0,001	a	a	b	b	Due livelli
Ocimene	13,76	< 0,001	a	a	b	b	Due livelli
Linalool	0,034	0,968	a	a	a	a	Un livello
Terpinolene	/	/	/	/	/	/	Non analizzato

Tabella 3.3. *Pattern statistici osservati nei monoterpeni.*

Lettere diverse (a e b) indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Tukey, $\alpha = 0,05$).

I risultati riportati nell'istogramma sottostante (Figura 3.4) evidenziano che l'infestazione da *Tuta absoluta* non determina variazioni significative rispetto al controllo per i monoterpeni analizzati. La presenza di *Trichoderma* rappresenta invece il principale fattore di modulazione, inducendo una riduzione marcata delle emissioni riscontrate. In ogni composto considerato, tale modulazione si manifesta come separazione dicotomica tra trattamenti con e senza microrganismo.

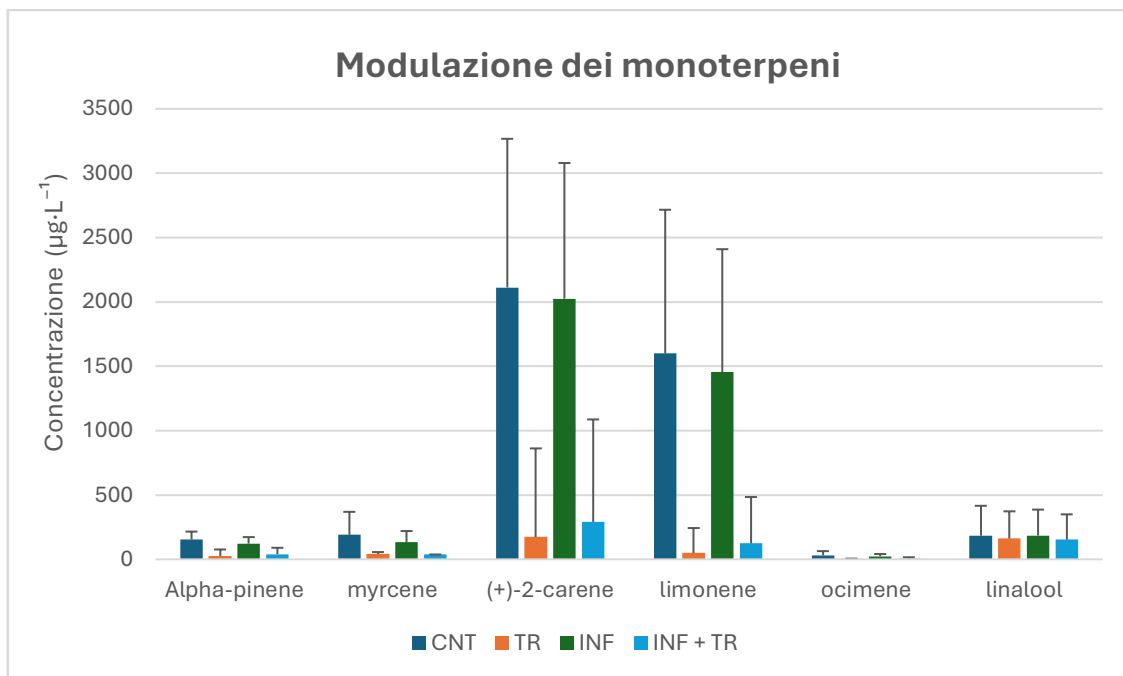


Figura 3.4. Concentrazioni medie ($\pm$ SD) dei singoli monoterpeni emessi dalle piante di pomodoro nei quattro trattamenti.

- **Analisi della frazione monoterpenica totale**

Al fine di valutare se le variazioni osservate a livello dei singoli composti riflettessero una modulazione complessiva della via monoterpenica, è stata calcolata la somma totale dei monoterpeni quantificabili per ciascun campione (Tabella 3.4).

L'ANOVA condotta sui dati ha evidenziato differenze altamente significative tra i trattamenti ($F(3,76) = 66,70$; $p = 3,08 \times 10^{-21}$).

Concentrazioni medie espresse in $\mu\text{g/L}$ ($\pm$ SD)				
Trattamento	CNT	TR	INF	INF + TR
Valore	4759 ± 1931	433 ± 894	4302 ± 1540	317 ± 221

Tabella 3.4. Concentrazioni medie della somma totale dei monoterpeni per ogni trattamento.

Il test di Tukey indica che CNT e INF non differiscono significativamente tra loro, mentre TR e INF+TR risultano significativamente inferiori rispetto ai primi due gruppi, senza differenze significative reciproche.

Nel complesso, tali risultati (Figura 3.5) indicano che l'infestazione da *Tuta absoluta* non determina una variazione sostanziale della produzione totale di monoterpeni, mentre la colonizzazione con *Trichoderma* è associata a una marcata riduzione della frazione monoterpenica del volatiloma.

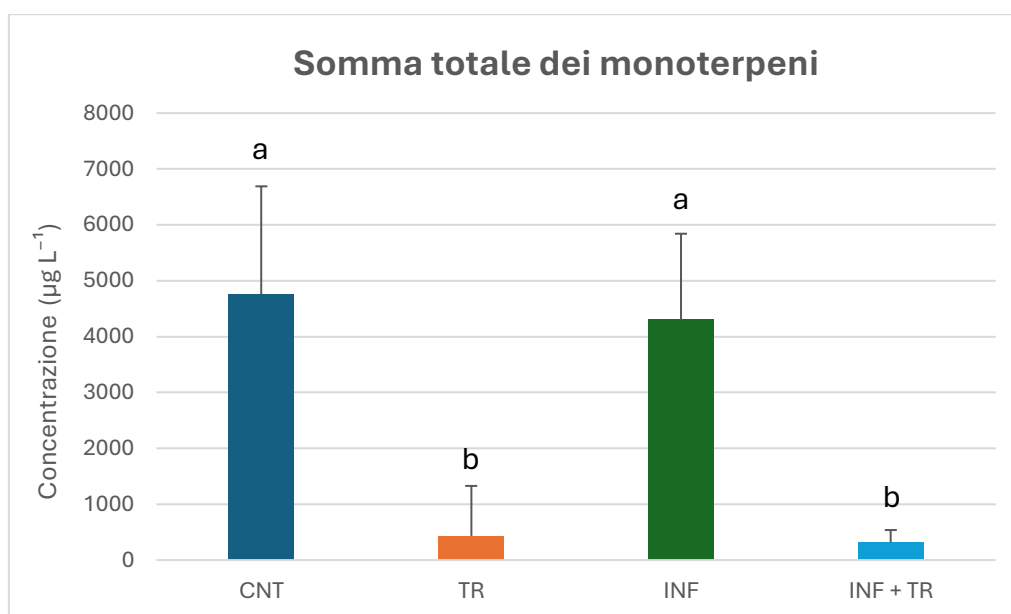


Figura 3.5. Somma totale dei monoterpeni ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nei quattro trattamenti. Lettere differenti indicano differenze significative (Tukey, $p < 0,05$).

I risultati ottenuti evidenziano una chiara modulazione della frazione monoterpenica del volatiloma in presenza di *Trichoderma*. La riduzione significativa osservata per α -pinene, myrcene, (+)-2-carene, limonene e ocimene, confermata dall'analisi della somma totale dei monoterpeni ($F(3,76) = 66,70$; $p = 3,08 \times 10^{-21}$), suggerisce una regolazione coordinata della produzione monoterpenica.

L'assenza di differenze tra CNT e INF indica che, nelle condizioni sperimentali adottate, l'infestazione da *Tuta absoluta* non determina un incremento o una riduzione sostanziale

dell'emissione complessiva di monoterpeni. Al contrario, la presenza del simbionte fungino è associata a una marcata diminuzione della componente monoterpenica, indipendentemente dallo stato di infestazione.

La coerenza del pattern osservato su più composti appartenenti alla stessa classe chimica suggerisce che l'effetto non sia riconducibile a variazioni isolate di singoli metaboliti, ma rifletta una possibile modulazione sistemica della frazione monoterpenica del metabolismo secondario.

- **Considerazioni generali sulla modulazione del volatiloma**

L'analisi combinata dei singoli monoterpeni e della frazione totale evidenzia una possibile modulazione coordinata della componente monoterpenica nei trattamenti contenenti il simbionte fungino.

Al contrario, l'infestazione da *Tuta absoluta* non produce variazioni statisticamente rilevanti nella frazione monoterpenica complessiva, indicando che, nelle condizioni sperimentali adottate, l'effetto predominante sulla modulazione del volatiloma è riconducibile alla presenza del fungo simbionte.

3.2.2 Confronto inter-annuale e valutazione della robustezza del sistema analitico

Al fine di rafforzare ulteriormente la valutazione della robustezza del metodo sviluppato, è stato effettuato un confronto con i dati ottenuti in una precedente annualità nell'ambito dello stesso progetto di ricerca. Tale confronto consente di verificare la stabilità del sistema analitico nel tempo e la sua capacità di restituire pattern coerenti in condizioni sperimentali analoghe.

L'analisi comparativa è stata limitata ai monoterpeni comuni ai due studi (α -pinene, myrcene, (+)-2-carene, limonene, ocimene e linalool) e ai gruppi sperimentali direttamente sovrapponibili (CNT e TR), escludendo trattamenti non comparabili per disegno sperimentale. Entrambi i dataset risultano espressi in $\mu\text{g L}^{-1}$ e ottenuti mediante curve di calibrazione costruite secondo il medesimo protocollo. Nel presente studio è stata inoltre

applicata la normalizzazione con standard interno, con conseguente riduzione della variabilità strumentale intra-run.

La comparazione dei dati è stata condotta secondo due livelli di valutazione:

- I. Confronto delle emissioni basali (CNT vs CNT), volto a verificare la comparabilità dell'ordine di grandezza dei segnali;
- II. Valutazione dell'effetto del trattamento TR rispetto al controllo interno di ciascuna annualità, espresso come differenza tra le medie logaritmiche ($\Delta TR = TR - CNT$).

Al fine di rendere più chiaro il confronto tra annualità, le medie dei gruppi CNT e TR per ciascun analita sono state riassunte in Tabella 3.5, insieme alla differenza TR–CNT calcolata per ciascun anno. Tale approccio consente di distinguere tra variazioni assolute dei livelli emissivi e variazioni relative indotte dal trattamento.

Analita	Anno 2025 CNT ($\pm$SD)	TR ($\pm$SD)	Δ 2025	Anno 2024 CNT ($\pm$SD)	TR ($\pm$SD)	Δ 2024
α -pinene	154 $\pm$ 62	25 $\pm$ 52	-129	59 $\pm$ 5	66 $\pm$ 22	7
Myrcene	190 $\pm$ 179	41 $\pm$ 15	-149	15 $\pm$ 6	8 $\pm$ 3	-7
(+)-2-carene	2406 $\pm$ 984	157 $\pm$ 653	-2249	35 $\pm$ 42	196 $\pm$ 65	-161
Limonene	1802 $\pm$ 1009	45 $\pm$ 184	-1757	23 $\pm$ 66	187 $\pm$ 62	164
ocimene	32 $\pm$ 33	3 $\pm$ 2	-29	44 $\pm$ 12	28 $\pm$ 9	-16
Linalool	176 $\pm$ 236	161 $\pm$ 203	-15	94 $\pm$ 22	96 $\pm$ 32	2

Tabella 3.5. Confronto inter-annuale delle concentrazioni medie espresse in $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dei principali monoterpeni nei gruppi CNT e TR. Per ciascun anno è riportata anche la differenza tra le medie ($\Delta = TR - CNT$), al fine di evidenziare l'entità relativa della modulazione indotta dal trattamento.

Il confronto tra i risultati ottenuti nel presente studio e quelli registrati nella precedente campagna sperimentale evidenzia differenze sia nei valori assoluti delle concentrazioni sia nell'andamento delle variazioni osservate tra campioni di controllo (CNT) e campioni trattati con *Trichoderma* (TR).

Nel dataset relativo al 2025 si osserva una marcata diminuzione delle concentrazioni per la maggior parte dei monoterpeni analizzati nei campioni trattati rispetto ai controlli, in

particolare per α -pinene, myrcene, (+)-2-carene e limonene. Al contrario, nei dati della campagna 2024 l'effetto del trattamento risulta meno uniforme, con alcuni analiti che mostrano una riduzione (ad esempio myrcene e ocimene) e altri che presentano valori comparabili o superiori nei campioni trattati rispetto ai controlli.

Le differenze osservate tra le due annualità non sono necessariamente attribuibili a variazioni del metodo analitico, che risulta in grado di rilevare gli stessi composti in entrambe le campagne sperimentali, ma possono riflettere variazioni del profilo emissivo delle piante associate a fattori biologici o ambientali. In particolare, le emissioni di composti organici volatili nelle piante sono note per essere influenzate da molteplici variabili, tra cui condizioni di crescita, stato fisiologico delle piante e intensità degli stimoli biotici.

Nel complesso, il confronto tra le due campagne sperimentali evidenzia come il trattamento con *Trichoderma* possa influenzare il profilo emissivo dei monoterpeni, sebbene l'entità e la direzione delle variazioni osservate possano differire tra diverse condizioni sperimentali.

3.2.3 Analisi multivariata mediante PCA

Al fine di esplorare la struttura del dataset e individuare eventuali pattern globali nelle emissioni dei composti volatili, i dati sono stati sottoposti ad analisi delle componenti principali (PCA). Prima dell'elaborazione, il dataset è stato autoscalato (mean-centering e scaling alla deviazione standard) al fine di eliminare differenze di scala tra le variabili e consentire un confronto diretto tra i diversi analiti.

L'analisi PCA evidenzia che la prima componente principale (PC1) spiega circa il 52% della varianza totale del dataset, mentre l'inclusione della seconda componente porta la varianza cumulativa spiegata a circa il 70% (Figura 3.6). Questo indica che la struttura principale dei dati può essere efficacemente descritta nel piano bidimensionale definito da PC1 e PC2.

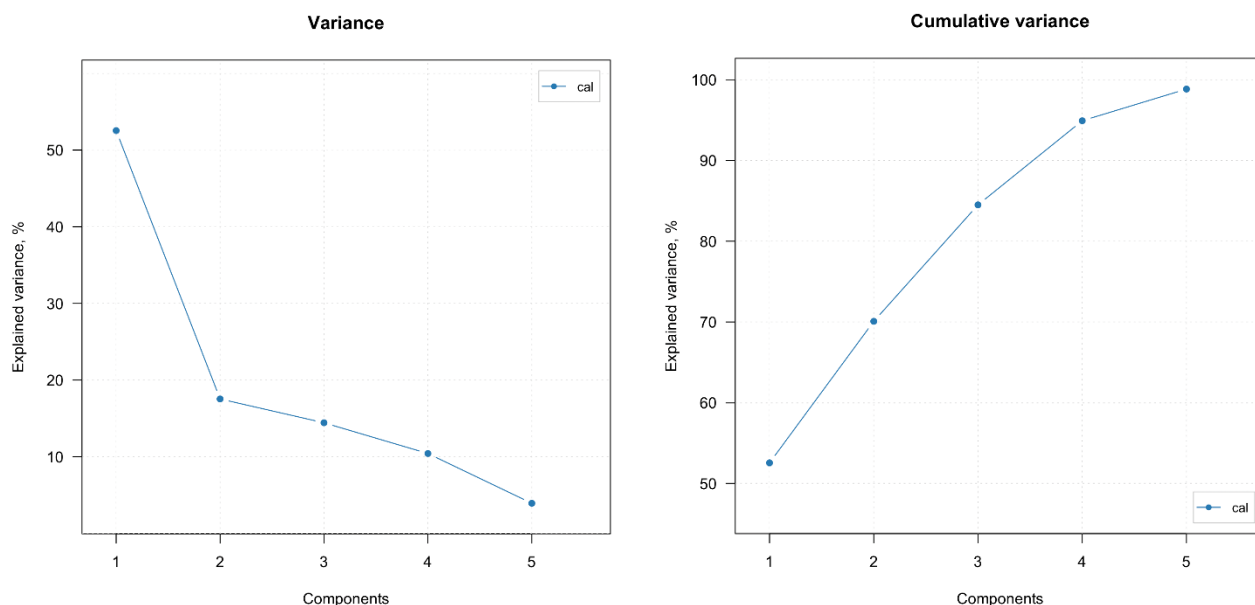


Figura 3.6. Scree plot della PCA che mostra la percentuale di varianza spiegata dalle diverse componenti principali.

Lo score plot (Figura 3.7) mostra una chiara separazione tra i campioni trattati con *Trichoderma* e quelli non trattati, indicando che il trattamento rappresenta uno dei principali fattori di variabilità del dataset. In particolare, i campioni CNT e INF tendono a raggrupparsi in una regione distinta dello spazio multivariato rispetto ai campioni TR e INF+TR, suggerendo che il trattamento influenzi in maniera sistematica il profilo dei composti volatili emessi dalle piante.

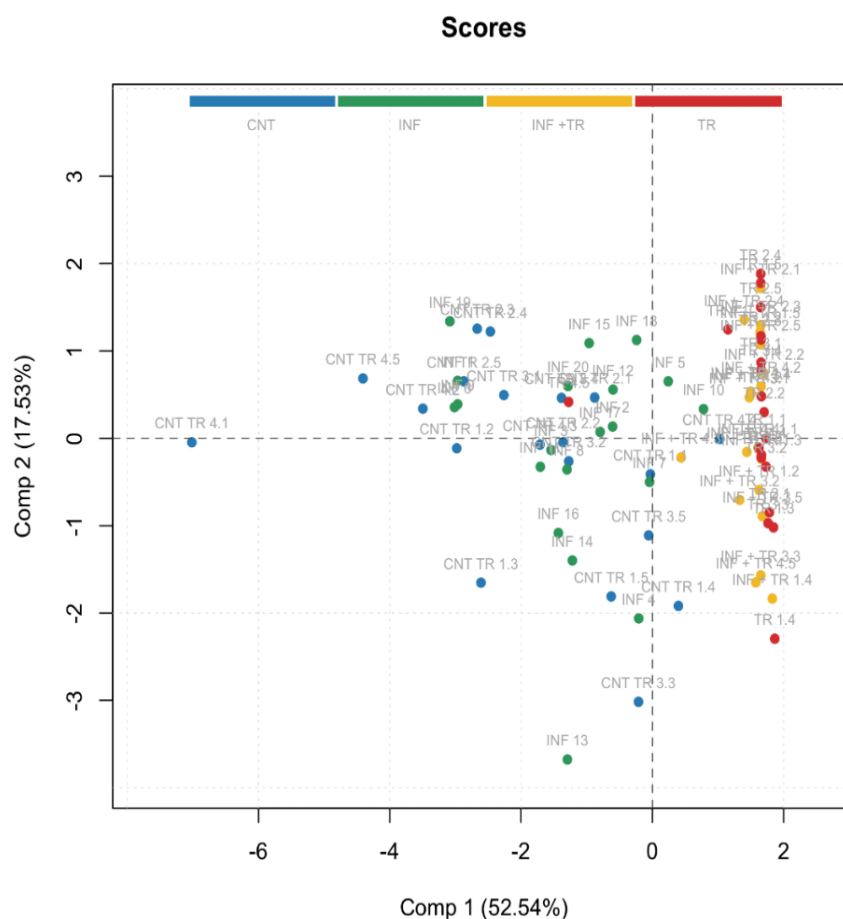


Figura 3.7. Score plot della PCA ottenuto dai dati autoscalati.

L'analisi dei loadings (Figura 3.8) evidenzia una forte correlazione positiva tra diversi monoterpeni, tra cui myrcene, ocimene, (+)-2-carene, α -pinene e limonene, che risultano raggruppati nella stessa regione dello spazio multivariato. Questi composti contribuiscono in modo significativo alla separazione osservata lungo PC1 e risultano maggiormente associati ai campioni non trattati.

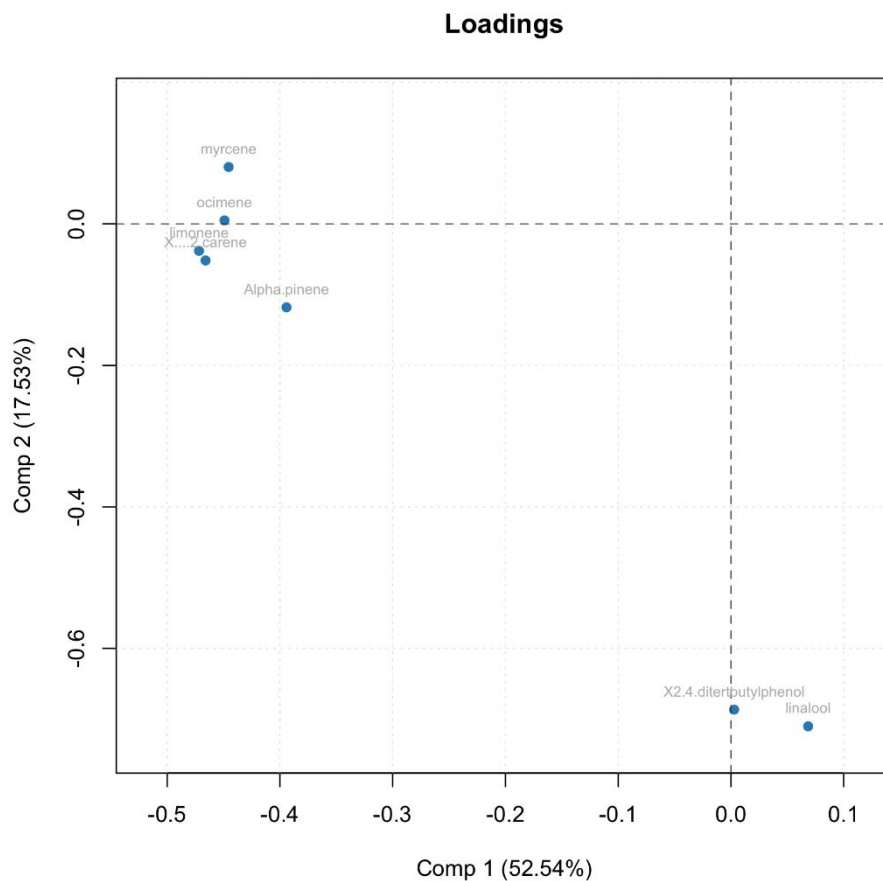


Figura 3.8. Loading plot (PC1 vs PC2) della PCA.

Al contrario, linalool e 2,4-di-tert-butylphenol mostrano un comportamento distinto rispetto agli altri analiti, risultando poco correlati con il gruppo dei monoterpeni e contribuendo marginalmente alla separazione tra i trattamenti.

Nel biplot (Figura 3.9), che combina score plot e loading plot, si osserva chiaramente che i campioni di controllo presentano valori più elevati delle variabili associate ai monoterpeni, mentre i campioni trattati risultano collocati nella direzione opposta, indicando una riduzione complessiva delle emissioni di tali composti in seguito al trattamento con *Trichoderma*.

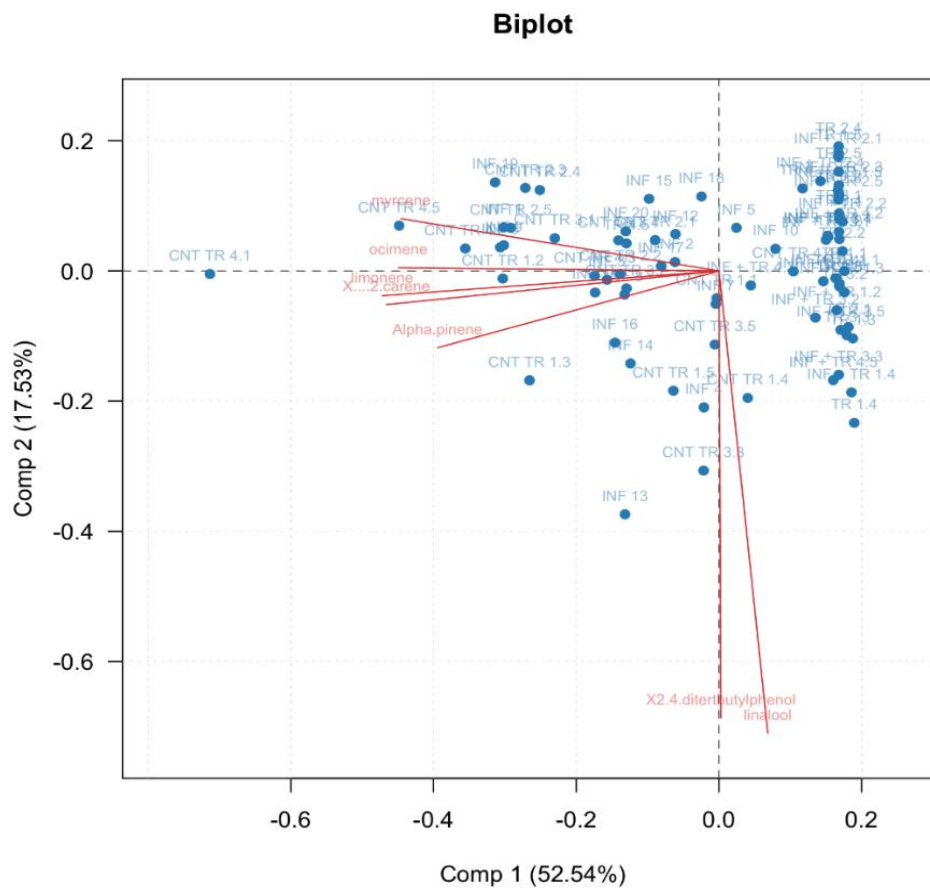


Figura 3.9. Biplot della PCA che combina score plot e loading plot.

Le componenti principali successive (PC2 e PC3) (Figura 3.10) spiegano una quota molto minore della varianza totale e non mostrano raggruppamenti evidenti, suggerendo che tali componenti riflettano principalmente variabilità biologica individuale o rumore sperimentale.

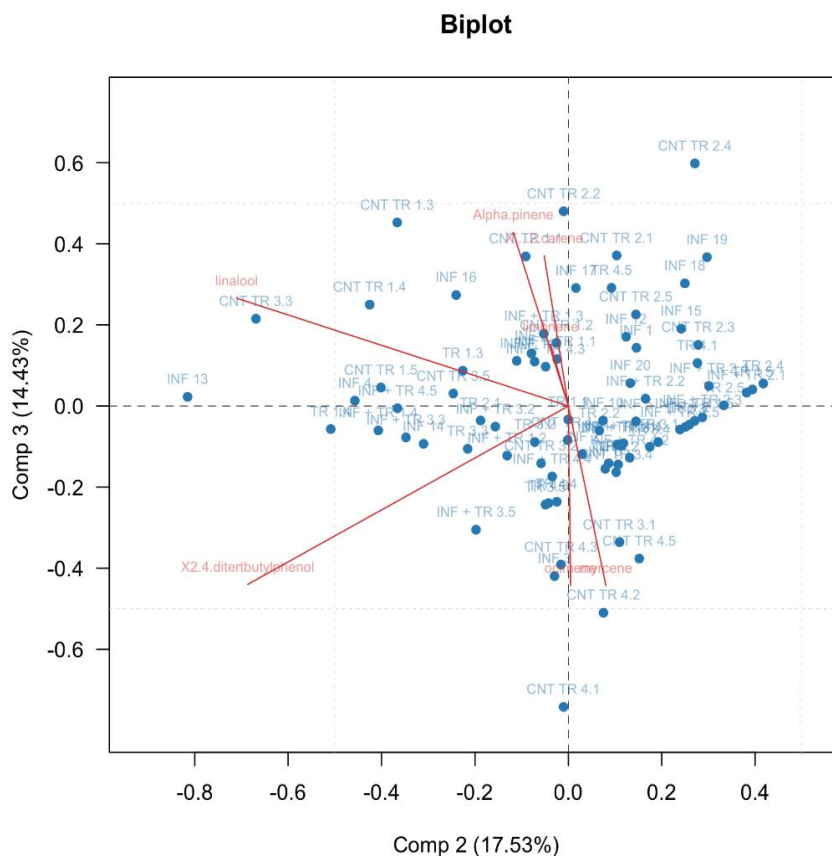


Figura 3.10. Biplot (PC2 vs PC3) della PCA.

L'analisi PCA conferma in maniera indipendente e multivariata i risultati ottenuti mediante approccio univariato. La netta separazione dei campioni lungo la prima componente principale indica che la principale fonte di variabilità del dataset è associata al trattamento applicato alle piante. In particolare, la distribuzione dei campioni nello spazio delle componenti principali evidenzia come il trattamento con *Trichoderma* sia associato a una riduzione coordinata dell'emissione di diversi monoterpeni, tra cui α -pinene, myrcene, (+)-2-carene e limonene, che risultano fortemente correlati tra loro nel loading plot.

L'elevata percentuale di varianza spiegata dalla prima componente principale, unita alla distribuzione compatta dei campioni all'interno dei gruppi sperimentali e all'assenza di outlier evidenti, supporta la robustezza del dataset e la buona riproducibilità delle misure analitiche. Nel complesso, la PCA conferma che le differenze osservate tra i gruppi sperimentali riflettono variazioni chimiche reali nel profilo dei composti volatili e non artefatti derivanti dal trattamento statistico dei dati o dalla variabilità strumentale.

3.2.4 Altri analiti target

- **Analisi degli ulteriori analiti target**

Il 2,4-di-tert-butylphenol non ha evidenziato variazioni significative tra i gruppi. L'elevata abbondanza e la costanza tra i trattamenti suggeriscono che la sua presenza non sia direttamente correlata alle risposte biologiche indotte da infestazione o colonizzazione fungina nelle condizioni esaminate.

Diversi analiti inizialmente inclusi nel set di composti target, tra cui i sesquiterpeni β -caryophyllene, α -humulene, β -elemene e trans- β -farnesene, nonché methyl salicylate, methyl jasmonate, jasmone e 6-methyl-5-hepten-2-one, non sono risultati quantificabili nei campioni analizzati, presentando concentrazioni sistematicamente inferiori al limite di rilevabilità o non determinabili.

L'assenza di tali composti può essere interpretata alla luce di considerazioni metodologiche e biologiche. Dal punto di vista del campionamento, l'impiego di Tenax® come materiale adsorbente rappresenta una scelta consolidata per la raccolta di composti organici volatili a media massa molecolare e relativamente apolari. Tuttavia, l'efficienza di ritenzione e recupero può dipendere dalle proprietà chimico-fisiche dei singoli analiti e dalle condizioni operative di campionamento e desorbimento. In particolare, composti quali methyl jasmonate e methyl salicylate presentano una certa polarità e gruppi funzionali ossigenati che possono influenzarne il comportamento nelle fasi di adsorbimento sul sorbente e successiva eluizione con solvente organico. È tuttavia importante sottolineare che tali composti erano stati osservati in precedenti campagne sperimentali condotte con la stessa metodica, suggerendo che la loro mancata rilevazione nel presente dataset non sia attribuibile esclusivamente a limiti del metodo analitico, ma piuttosto a una combinazione di fattori sperimentali e biologici.

Anche le condizioni sperimentali di raccolta possono aver influenzato il profilo rilevato. Il sistema a circuito chiuso con flusso costante e durata di campionamento di cinque ore è idoneo per la caratterizzazione di emissioni costitutive o relativamente abbondanti; tuttavia, eventuali emissioni transitorie o fortemente dinamiche potrebbero non essere state intercettate con sufficiente sensibilità. In particolare, la produzione di sesquiterpeni e di

derivati della via jasmonica è spesso associata a risposte di difesa dipendenti dall'intensità e dalla natura dello stimolo, nonché da specifiche finestre temporali di attivazione [37].

Non si può infine escludere una componente strettamente biologica. La varietà Heinz 1301, lo stadio fenologico delle piante e le condizioni di coltivazione in serra controllata potrebbero aver determinato un profilo emissivo differente rispetto a quanto riportato in altri sistemi sperimentali. Pertanto, l'assenza di tali composti nei campioni analizzati non deve essere interpretata esclusivamente come limite tecnico, ma piuttosto come risultato dell'interazione tra sensibilità del metodo, caratteristiche chimico-fisiche degli analiti e specificità del sistema biologico studiato.

3.2.5 Analiti incogniti identificati e valutazione semi-quantitativa

Nel corso dell'analisi cromatografica sono stati individuati, con ricorrenza nella quasi totalità dei campioni, due ulteriori segnali attribuibili a monoterpeni non inclusi inizialmente nel set di analiti quantificati. L'identificazione è stata effettuata mediante confronto degli spettri di massa acquisiti in modalità EI (70 eV) con la libreria NIST, ottenendo elevati fattori di corrispondenza. I composti (Figura 3.11) sono stati attribuiti presumibilmente a *p*-cymene (CAS 99-87-6, RT = 12,55 min) e α -terpinene (CAS 99-86-5, RT = 15,24 min).

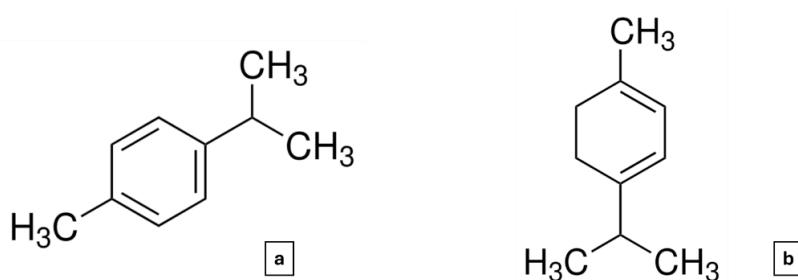


Figura 3.11 Struttura chimica del *p*-cymene (a) e del α -terpinene (b).

In assenza di standard certificati e di curve di calibrazione dedicate, non è stato possibile procedere a una loro quantificazione assoluta. È stata pertanto effettuata una valutazione semi-quantitativa, esprimendo l'abbondanza relativa (RA) dei due segnali come rapporto tra l'area del picco dell'analita e l'area dello standard interno.

Anche per questi composti è stata eseguita un'analisi della varianza a una via (one-way ANOVA), seguita da test post-hoc di Tukey per il confronto multiplo tra trattamenti. I dati ottenuti evidenziando differenze altamente significative tra i gruppi sperimentali.

I valori di queste analisi sono riportati in Tabella 3.6.

	RA CNT	RA TR	RA INF	RA INF + TR	F (3,76)	p-value
p-cymene	0,16 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,08	0,01 ± 0,00	37,20	$7,79 \times 10^{-15}$
α-terpinene	0,23 ± 0,18	0,04 ± 0,01	0,18 ± 0,09	0,04 ± 0,01	19,31	$2,23 \times 10^{-9}$

Tabella 3.6. Medie delle abbondanze relative per ciascun trattamento e valori di *F* e *p* derivanti dall'ANOVA.

Il pattern osservato risulta coerente con quanto emerso per i monoterpeni quantificati tramite curve di calibrazione: le piante trattate con *Trichoderma* (TR e INF+TR) mostrano una riduzione significativa del segnale rispetto ai controlli (CNT) e alle piante esclusivamente infestate (INF), mentre non si evidenziano differenze significative tra CNT e INF.

Tale coerenza tra composti quantificati e composti valutati in modo semi-quantitativo rafforza l'ipotesi di una modulazione sistematica della frazione monoterpenica associata alla colonizzazione radicale, piuttosto che all'infestazione da fitofago.

3.2.6 Conclusioni

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano una modulazione selettiva del volatiloma delle piante di pomodoro in relazione ai trattamenti sperimentali considerati. L'analisi dei singoli monoterpeni, supportata dalla valutazione della frazione monoterpenica totale, indica che la colonizzazione con *Trichoderma* rappresenta il principale fattore in grado di alterare quantitativamente l'emissione volatile, determinando una marcata riduzione della componente monoterpenica. Al contrario, l'infestazione da *Tuta absoluta*, nelle condizioni adottate, non induce variazioni statisticamente significative della produzione complessiva di monoterpeni.

La coerenza del pattern osservato su più composti appartenenti alla stessa classe chimica suggerisce che la modulazione non sia riconducibile a fluttuazioni isolate, ma rifletta una regolazione coordinata del metabolismo secondario. L'assenza di variazioni per il linalool e per il 2,4-di-tert-butylphenol evidenzia inoltre che non tutte le componenti del bouquet

volatile rispondono in modo uniforme ai trattamenti, indicando una possibile selettività nella regolazione biosintetica.

Parallelamente, la mancata rilevazione di alcuni analiti target sottolinea come il profilo emissivo osservato sia il risultato dell'interazione tra sistema biologico e metodologia analitica adottata. L'insieme dei dati suggerisce pertanto che, nelle condizioni sperimentali investigate, la presenza del simbionte fungino eserciti un effetto predominante sulla componente monoterpenica del volatiloma, mentre l'attacco erbivoro non si traduce in una risposta quantitativamente rilevabile a livello delle emissioni analizzate.

Il confronto tra le due annualità evidenzia differenze nei valori assoluti delle concentrazioni e nell'andamento delle variazioni osservate tra campioni di controllo e campioni trattati. Tuttavia, in entrambe le campagne sperimentali il metodo analitico ha consentito la rilevazione degli stessi principali composti della frazione monoterpenica, confermando la capacità del sistema di campionamento e analisi GC–MS di caratterizzare il profilo emissivo delle piante.

Le differenze quantitative osservate tra le due annualità possono essere attribuite principalmente alla variabilità biologica intrinseca del sistema vegetale e alle condizioni sperimentali, piuttosto che a limitazioni del metodo analitico. Nel complesso, questi risultati indicano che la piattaforma GC–MS utilizzata rappresenta uno strumento adeguato allo studio comparativo del volatiloma vegetale, pur evidenziando come le emissioni di VOCs possano mostrare una significativa variabilità tra diverse campagne sperimentali.

L'analisi multivariata mediante PCA ha fornito una rappresentazione sintetica della struttura del dataset, evidenziando come la variazione coordinata dei principali monoterpeni contribuisca alla separazione tra campioni trattati e non trattati nello spazio delle componenti principali. La coerenza tra i risultati ottenuti con approcci statistici univariati e multivariati rafforza l'interpretazione secondo cui il trattamento con *Trichoderma* determina una modulazione sistematica del profilo dei composti volatili emessi dalle piante.

Nel complesso, l'analisi multivariata conferma quanto osservato attraverso il confronto delle concentrazioni medie e l'analisi dei fold change, indicando che il trattamento è associato a una riduzione coordinata delle emissioni della frazione monoterpenica. La distribuzione relativamente compatta dei campioni all'interno dei gruppi sperimentali e l'assenza di outlier evidenti suggeriscono inoltre una buona coerenza interna del dataset e una soddisfacente riproducibilità delle misure analitiche.

Appendice A

Tabella 1 (campioni della serie CNT TR)

Sample	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
CNT TR 1.1	105	<LOD	<LOD	2087	1263	<LOQ	<LOD	453	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	188
CNT TR 1.2	194	<LOD	190,94	3901	2798	28	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	325
CNT TR 1.3	253	<LOD	169,43	3403	2198	30	<LOD	654	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	235
CNT TR 1.4	136	<LOD	<LOD	1290	704	<LOQ	<LOD	615	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	323
CNT TR 1.5	<LOQ	n.a.	n.a.	13	5	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	118
CNT TR 2.1	218	<LOD	<LOD	2655	1104	<LOQ	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	238
CNT TR 2.2	246	<LOD	<LOD	2883	1559	10	<LOD	208	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	218
CNT TR 2.3	115	n.a.	225,10	2786	3548	29	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	155
CNT TR 2.4	263	n.a.	107,67	4449	1844	11	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	114
CNT TR 2.5	167	<LOD	192,85	3610	3170	26	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	223
CNT TR 3.1	93	<LOD	319,49	1553	1641	61	<LOD	86	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	269
CNT TR 3.2	122	<LOD	174,75	1548	1245	42	<LOD	155	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	324
CNT TR 3.3	112	<LOD	<LOD	2123	1466	12	<LOD	749	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	410
CNT TR 3.4	102	<LOD	218,03	1630	1457	36	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	286
CNT TR 3.5	169	n.a.	<LOD	1647	747	<LOD	<LOD	74	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	461

CNT TR 4.1	173	<LOD	656,13	3168	4194	128	259,82	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	365
CNT TR 4.2	105	<LOD	453,09	2199	1957	75	120,50	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	321
CNT TR 4.3	62	<LOD	273,86	1775	1530	48	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	375
CNT TR 4.4	76	<LOD	<LOD	493	182	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	352
CNT TR 4.5	141	<LOD	515,11	2878	2459	77	159,39	82	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	242

Tabella 2 (campioni della serie INF + TR)

Sample	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
INF + TR 1.1	39	n.a.	<LOD	60	15	<LOD	<LOD	422	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	192
INF + TR 1.2	24	<LOD	<LOD	56	13	n.a.	<LOD	229	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	356
INF + TR 1.3	33	<LOD	<LOD	76	25	<LOD	<LOD	536	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	156
INF + TR 1.4	<LOQ	<LOD	<LOD	24	10	<LOD	<LOD	571	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	370
INF + TR 1.5	<LOQ	<LOD	<LOD	35	12	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	197
INF + TR 2.1	<LOQ	n.a.	n.a.	17	7	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	126
INF + TR 2.2	<LOQ	<LOD	n.a.	17	7	<LOD	<LOD	197	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	186
INF + TR 2.3	<LOQ	<LOD	n.a.	14	5	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	187
INF + TR 2.4	53	<LOD	<LOD	72	17	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	168

Sample	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
INF + TR 2.5	<LOQ	<LOD	n.a.	23	7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	217
INF + TR 3.1	43	<LOD	<LOD	31	5	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	296
INF + TR 3.2	80	<LOD	<LOD	84	10	<LOD	<LOD	235	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	357
INF + TR 3.3	34	<LOD	<LOD	46	12	n.a.	<LOD	450	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	386
INF + TR 3.4	36	<LOD	<LOD	40	6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	291
INF + TR 3.5	<LOQ	n.a.	n.a.	7	3	n.a.	<LOD	80	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	474
INF + TR 4.1	40	<LOD	n.a.	17	4	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	288
INF + TR 4.2	<LOQ	<LOD	<LOD	17	2	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	286
INF + TR 4.3	234	<LOD	<LOD	161	7	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	350
INF + TR 4.4	48	<LOD	<LOD	56	8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	383
INF + TR 4.5	53	<LOD	<LOD	52	7	n.a.	<LOD	522	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	358

Tabella 3 (campioni della serie INF)

Sample	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
INF 1	262	<LOD	246,88	3234	1306	43	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	218
INF 2	81	<LOD	135,09	1796	1030	25	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	330
INF 3	123	<LOD	243,68	947	774	61	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	376

Sample	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
INF 4	105	n.a.	123,46	1169	777	28	<LOD	635	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	349
INF 5	70	<LOD	94,67	1251	461	15	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	261
INF 6	174	<LOD	313,46	3022	1477	56	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	287
INF 7	169	<LOD	<LOD	1528	388	13	<LOD	152	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	339
INF 8	141	n.a.	100,20	3382	1372	16	<LOD	88	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	347
INF 9	163	<LOD	321,33	2935	1315	61	<LOD	125	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	245
INF 10	38	<LOD	<LOD	1005	785	<LOQ	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	307
INF 11	90	<LOD	131,81	2282	3032	29	<LOD	282	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	261
INF 12	112	<LOD	<LOD	2179	1411	20	<LOD	77	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	230
INF 13	147	<LOD	82,01	3040	1721	25	<LOD	589	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	572
INF 14	75	<LOD	125,49	1930	2434	30	<LOD	299	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	412
INF 15	86	<LOD	89,09	2385	2133	15	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	180
INF 16	104	<LOD	106,03	2213	2914	25	<LOD	564	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	227
INF 17	98	<LOD	78,95	2549	1947	11	<LOD	290	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	197
INF 18	131	n.a.	<LOD	2185	1056	<LOQ	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	167
INF 19	183	<LOD	179,55	3955	3146	29	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	119
INF 20	93	n.a.	142,89	2520	1941	21	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	254

Tabella 4 (campioni della serie TR)

Sample	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
TR 1.1	<LOQ	<LOD	n.a.	14	6	<LOD	<LOD	268	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	257
TR 1.2	<LOQ	n.a.	n.a.	11	4	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	204
TR 1.3	<LOQ	<LOD	n.a.	8	5	<LOD	<LOD	613	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	235
TR 1.4	<LOQ	<LOD	n.a.	10	5	<LOD	<LOD	661	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	392
TR 1.5	227	<LOD	<LOD	2036	971	<LOQ	<LOD	77	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	542
TR 2.1	<LOQ	<LOD	n.a.	9	4	n.a.	<LOD	422	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	303
TR 2.2	<LOQ	<LOD	n.a.	10	4	<LOD	<LOD	178	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	259
TR 2.3	<LOQ	<LOD	n.a.	10	2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	210
TR 2.4	<LOQ	<LOD	n.a.	12	4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	103
TR 2.5	<LOQ	n.a.	n.a.	17	5	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	157
TR 3.1	<LOQ	<LOD	n.a.	10	3	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	247
TR 3.2	<LOQ	<LOD	n.a.	8	2	n.a.	<LOD	256	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	309
TR 3.3	<LOQ	<LOD	n.a.	7	4	<LOD	<LOD	354	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	353
TR 3.4	<LOQ	<LOD	n.a.	6	2	n.a.	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	258
TR 3.5	<LOQ	n.a.	n.a.	14	4	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	401

Sample	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
TR 4.1	104	n.a.	n.a.	35	5	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	172
TR 4.2	<LOQ	n.a.	n.a.	4	1	n.a.	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	302
TR 4.3	<LOQ	<LOD	n.a.	6	1	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	397
TR 4.4	<LOQ	<LOD	n.a.	6	4	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	<LOD	385
TR 4.5	225	<LOD	106,15	2933	826	11	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	<LOD	n.a.	n.a.	<LOD	n.a.	250

Note:

Le concentrazioni sono espresse in $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

n.a. = segnale non rilevato.

LOD = limite di rivelazione del metodo.

LOQ = limite di quantificazione del metodo.

a = Alpha-pinene, **b** = 6-methyl-5-hepten-2-one, **c** = myrcene, **d** = (+)-2-carene, **e** = limonene, **f** = ocimene, **g** = terpinolene, **h** = linalool, **i** = methyl salicylate, **j** = beta-elemene, **k** = jasmone, **l** = caryophyllene, **m** = alpha-humulene, **n** = beta-farnesene, **o** = methyl, **p** = jasmonate, **q** = 2,4-ditertbutylphenol

Capitolo 4 – Bibliografia

- [1] A. R. Fernie, S. De Vries, e J. De Vries, «Evolution of plant metabolism: the state-of-the-art», *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 379, fasc. 1914, p. 20230347, nov. 2024, doi: 10.1098/rstb.2023.0347.
- [2] P. Medina-van Berkum et al., «Plant diversity influences plant volatile emission with varying effects at the species and community levels», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 123, fasc. 3, p. e2518326123, gen. 2026, doi: 10.1073/pnas.2518326123.
- [3] M. E. Maffei, «Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles», *South Afr. J. Bot.*, vol. 76, fasc. 4, pp. 612–631, ott. 2010, doi: 10.1016/j.sajb.2010.03.003.
- [4] G. Vivaldo, E. Masi, C. Taiti, G. Caldarelli, e S. Mancuso, «The network of plants volatile organic compounds», *Sci. Rep.*, vol. 7, fasc. 1, p. 11050, set. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10975-x.
- [5] K. K. Viswanath, P. Varakumar, R. R. Pamuru, S. J. Basha, S. Mehta, e A. D. Rao, «Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology», *J. Plant Biol.*, vol. 63, fasc. 2, pp. 83–95, apr. 2020, doi: 10.1007/s12374-020-09241-x.
- [6] A. O. Chatzivasileiou, V. Ward, S. M. Edgar, e G. Stephanopoulos, «Two-step pathway for isoprenoid synthesis», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, fasc. 2, pp. 506–511, gen. 2019, doi: 10.1073/pnas.1812935116.
- [7] M. Erb et al., «Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize», *Nat. Commun.*, vol. 6, fasc. 1, p. 6273, feb. 2015, doi: 10.1038/ncomms7273.
- [8] F. Brilli, F. Loreto, e I. Baccelli, «Exploiting Plant Volatile Organic Compounds (VOCs) in Agriculture to Improve Sustainable Defense Strategies and Productivity of Crops», *Front. Plant Sci.*, vol. 10, p. 264, mar. 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00264.
- [9] V. Lazazzara et al., «Biogenic volatile organic compounds in the grapevine response to pathogens, beneficial microorganisms, resistance inducers, and abiotic factors», *J. Exp. Bot.*, vol. 73, fasc. 2, pp. 529–554, gen. 2022, doi: 10.1093/jxb/erab367.
- [10] J. Midzi, D. W. Jeffery, U. Baumann, S. Rogiers, S. D. Tyerman, e V. Pagay, «Stress-Induced Volatile Emissions and Signalling in Inter-Plant Communication», *Plants*, vol. 11, fasc. 19, p. 2566, set. 2022, doi: 10.3390/plants11192566.

- [11] M. Heil, «Indirect defence via tritrophic interactions», *New Phytol.*, vol. 178, fasc. 1, pp. 41–61, apr. 2008, doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x.
- [12] M. Hilker e N. E. Fatouros, «Plant Responses to Insect Egg Deposition», *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 60, fasc. 1, pp. 493–515, gen. 2015, doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020620.
- [13] G. A. Howe e G. Jander, «Plant Immunity to Insect Herbivores», *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 59, fasc. 1, pp. 41–66, giu. 2008, doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825.
- [14] C. M. De Moraes, M. C. Mescher, e J. H. Tumlinson, «Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females», *Nature*, vol. 410, fasc. 6828, pp. 577–580, mar. 2001, doi: 10.1038/35069058.
- [15] M. Ferretti et al., «Accurate and robust method for plant volatilome analysis by GC-MS», *Talanta Open*, vol. 12, p. 100578, dic. 2025, doi: 10.1016/j.talo.2025.100578.
- [16] S. Gargiulo, M. Ruocco, F. Loreto, L. Faino, e M. M. Monti, «Volatile organic compounds in *Solanum lycopersicum* leaves and their roles in plant protection», *Hortic. Res.*, vol. 12, fasc. 10, p. uhaf181, ott. 2025, doi: 10.1093/hr/uhaf181.
- [17] I. E. Peralta, D. M. Spooner, e S. Knapp, *Systematic Botany Monographs*, vol. 84. Stati Uniti d'America: Christiane Anderson, 2008.
- [18] «*Phthorimaea absoluta* - Invasive Species List of California - [Internet]. Invasive Species List of California. [citato il 20 febbraio 2026]. Disponibile su: <https://calinvasives.ucdavis.edu/species/phthorimaea-absoluta>».
- [19] M. Giorgini, E. Guerrieri, P. Cascone, e L. Gontijo, «Current Strategies and Future Outlook for Managing the Neotropical Tomato Pest *Tuta absoluta* (Meyrick) in the Mediterranean Basin», *Neotrop. Entomol.*, vol. 48, fasc. 1, pp. 1–17, feb. 2019, doi: 10.1007/s13744-018-0636-1.
- [20] «*Trichogramma brassicae* (Trichox B) - [Internet]. Agrimag. [citato il 20 febbraio 2026] Disponibile su: <https://www.agrimag.it/prodotto/trichogramma-brassicae-trichox-b>».
- [21] L. Makhoul, K. El Fakhouri, S. A. Kemal, A. Aasfar, I. Meftah Kadmiri, e M. El Bouhssini, «Advances in analytical techniques for assessing volatile organic compounds in pulse crops: a comprehensive review», *Front. Hortic.*, vol. 3, p. 1394041, giu. 2024, doi: 10.3389/fhort.2024.1394041.

- [22] S. Mokh, T. Portoles, e J. Gamir, «Analytical approaches for volatile organic compounds to understand plant communication», *Curr. Plant Biol.*, vol. 44, p. 100547, dic. 2025, doi: 10.1016/j.cpb.2025.100547.
- [23] F. Zhu et al., «Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review», *Anal. Chim. Acta*, vol. 794, pp. 1–14, set. 2013, doi: 10.1016/j.aca.2013.05.016.
- [24] R. R. Arnts, «Evaluation of adsorbent sampling tube materials and Tenax-TA for analysis of volatile biogenic organic compounds», *Atmos. Environ.*, vol. 44, fasc. 12, pp. 1579–1584, apr. 2010, doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.01.004.
- [25] R. Luo et al., «A Review of Biogenic Volatile Organic Compounds from Plants: Research Progress and Future Prospects», *Toxics*, vol. 13, fasc. 5, p. 364, apr. 2025, doi: 10.3390/toxics13050364.
- [26] D. Materić, D. Bruhn, C. Turner, G. Morgan, N. Mason, e V. Gauci, «Methods in plant foliar volatile organic compounds research», *Appl. Plant Sci.*, vol. 3, fasc. 12, p. 1500044, dic. 2015, doi: 10.3732/apps.1500044.
- [27] S. A. Schmidt, E. Y. Mesfin, C. D. S. Weeraddana, A. P. De La Mata, A. C. Costamagna, e J. J. Harynuk, «Analysis of In Vivo Plant Volatiles Using Active Sampling and TD-GC×GC-TOFMS», *Metabolites*, vol. 14, fasc. 11, p. 623, nov. 2024, doi: 10.3390/metabo14110623.
- [28] T. Majchrzak, W. Wojnowski, e A. Wasik, «Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry for Plant Metabolomics», *Trends Plant Sci.*, vol. 25, fasc. 3, pp. 313–314, mar. 2020, doi: 10.1016/j.tplants.2019.08.002.
- [29] «NIST [Internet]. 2025 [citato 20 febbraio 2026]. National Institute of Standards and Technology. Disponibile su: <https://www.nist.gov/>».
- [30] «<https://de.wikipedia.org/wiki/Van-Deemter-Gleichung>».
- [31] D. R. Helsel, *Statistics for Censored Environmental Data Using Minitab® and R: Helsel/Statistics for Environmental Data 2E*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. doi: 10.1002/978111816272.

- [32] J. Lötsch, D. Kringel, e A. Ultsch, «Revisiting Fold-Change Calculation: Preference for Median or Geometric Mean over Arithmetic Mean-Based Methods», *Biomedicines*, vol. 12, fasc. 8, p. 1639, lug. 2024, doi: 10.3390/biomedicines12081639.
- [33] D. C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, Ninth edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2017.
- [34] I. T. Jolliffe, *Principal component analysis*, 2nd ed. in Springer series in statistics. New York: Springer, 2002.
- [35] I. Yedidia, A. K. Srivastva, Y. Kapulnik, e I. Chet, «Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants», *Plant Soil*, vol. 235, fasc. 2, pp. 235–242, ago. 2001, doi: 10.1023/A:1011990013955.
- [36] L. Makhlouf, K. El Fakhouri, S. A. Kemal, A. Aasfar, I. Meftah Kadmiri, e M. El Bouhssini, «Advances in analytical techniques for assessing volatile organic compounds in pulse crops: a comprehensive review», *Front. Hortic.*, vol. 3, p. 1394041, giu. 2024, doi: 10.3389/fhort.2024.1394041.
- [37] C. Wasternack e B. Hause, «Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*», *Ann. Bot.*, vol. 111, fasc. 6, pp. 1021–1058, giu. 2013, doi: 10.1093/aob/mct067.

Capitolo 5 – Conclusioni e prospettive future

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la caratterizzazione del profilo dei composti organici volatili emessi da piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L., cv. Heinz 1301) sottoposte a differenti condizioni sperimentali, con particolare attenzione agli effetti del trattamento con *Trichoderma* e dell'infestazione da fitofagi. L'analisi è stata condotta mediante un approccio di chimica analitica basato sull'impiego della gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC–MS), applicata a campioni di VOCs raccolti tramite sistemi di adsorbimento su Tenax®.

L'applicazione del metodo analitico ha consentito di identificare e quantificare diversi composti appartenenti principalmente alla classe dei monoterpeni, tra cui α -pinene, myrcene, (+)-2-carene, limonene, ocimene e linalool. I risultati ottenuti hanno evidenziato differenze nelle concentrazioni di tali composti tra i gruppi sperimentali analizzati, suggerendo che il trattamento con *Trichoderma* può influenzare il profilo emissivo delle piante. In particolare, nel dataset relativo alla campagna sperimentale analizzata nel presente studio è stata osservata una generale diminuzione delle concentrazioni di diversi monoterpeni nei campioni trattati rispetto ai controlli, indicando una possibile modulazione del volatiloma vegetale associata alla presenza del microrganismo simbiote.

L'analisi statistica dei dati ha permesso di supportare quantitativamente tali osservazioni. L'applicazione dell'analisi della varianza (ANOVA) e del test post-hoc di Tukey ha consentito di valutare la significatività delle differenze tra i gruppi sperimentali per ciascun analita, mentre l'analisi multivariata mediante Principal Component Analysis (PCA) ha fornito una rappresentazione complessiva della struttura del dataset. L'approccio multivariato ha evidenziato come la variazione coordinata di più composti contribuisca alla separazione dei campioni nello spazio delle componenti principali, confermando le tendenze osservate nell'analisi univariata.

Dal punto di vista analitico, i risultati ottenuti dimostrano l'idoneità della piattaforma GC–MS utilizzata per lo studio del volatiloma delle piante. Il metodo impiegato ha consentito la rilevazione e la quantificazione di composti presenti a basse concentrazioni in matrici complesse, evidenziando una buona capacità di discriminazione tra differenti condizioni sperimentali. Inoltre, l'osservazione degli stessi principali analiti in diverse campagne sperimentali conferma la robustezza del metodo e la sua applicabilità a studi comparativi del profilo dei VOCs emessi dalle piante.

Il confronto con dati ottenuti in precedenti campagne sperimentali ha evidenziato come le emissioni di VOCs possano presentare una significativa variabilità tra diverse annualità. Le differenze osservate nei valori assoluti delle concentrazioni e nell'andamento delle variazioni tra campioni di controllo e trattati suggeriscono che il profilo emissivo delle piante sia fortemente influenzato da fattori biologici e ambientali. Questo risultato evidenzia la complessità dei sistemi biologici studiati e sottolinea l'importanza di considerare la variabilità intrinseca delle emissioni vegetali nell'interpretazione dei dati analitici.

Nel complesso, il lavoro svolto ha permesso di confermare la validità dell'approccio analitico utilizzato per lo studio dei composti organici volatili emessi dalle piante e di ottenere nuove informazioni sulla modulazione del volatiloma in presenza di microrganismi simbiotici e di stress biotici. L'integrazione tra tecniche analitiche sensibili, strategie di campionamento controllate ed elaborazione statistica dei dati rappresenta uno strumento efficace per l'analisi di sistemi biologici complessi.

Dal punto di vista delle prospettive future, diversi aspetti emersi nel corso dello studio potrebbero essere approfonditi. In primo luogo, sarebbe interessante estendere l'analisi a un numero maggiore di campagne sperimentali al fine di valutare in modo più sistematico la variabilità inter-annuale delle emissioni di VOCs e identificare eventuali pattern ricorrenti. Un ulteriore sviluppo potrebbe riguardare l'ampliamento del numero di analiti monitorati, includendo altre classi di composti volatili potenzialmente coinvolti nelle risposte di difesa delle piante.

Dal punto di vista metodologico, ulteriori studi potrebbero essere dedicati all'ottimizzazione delle condizioni di campionamento e desorbimento dei VOCs, al fine di migliorare la sensibilità del metodo nei confronti di composti presenti a concentrazioni estremamente basse o caratterizzati da proprietà chimico-fisiche differenti. L'integrazione con tecniche analitiche complementari o con approcci di metabolomica non target potrebbe inoltre consentire una caratterizzazione più ampia e completa del volatiloma vegetale.

Infine, l'approfondimento delle relazioni tra profilo dei composti volatili e interazioni pianta–microrganismo–fitofago rappresenta una prospettiva di grande interesse sia dal punto di vista scientifico sia in termini di possibili applicazioni in ambito agronomico. Una migliore comprensione dei meccanismi che regolano l'emissione dei VOCs potrebbe contribuire allo sviluppo di strategie innovative per il monitoraggio e la gestione delle colture.

Ringraziamenti

Nelle ultime righe di questa tesi sento il bisogno di ringraziare tutte le persone che hanno reso possibile la realizzazione di questo lungo lavoro.

Per cominciare desidero ringraziare sinceramente la Prof.ssa Valentina Gianotti per avermi accolto nel suo gruppo di ricerca e nei suoi laboratori subito dopo aver sostenuto l'esame di Chimica Analitica Superiore. Aver avuto la possibilità di eseguire esperimenti liberamente e utilizzare strumenti visti e studiati solo sui libri è stata un'esperienza veramente illuminante. Il suo è un gruppo di ricerca solido e unito dal quale traspaiono con chiarezza la sua professionalità e le sue grandi conoscenze in ambito analitico.

Un ringraziamento speciale va anche alla mia correlatrice e alla sua infinita pazienza, Marysol ha sempre rimediato ai mille pasticci che ho combinato in questi mesi senza mai farmi pesare nulla. Avere a che fare con un testone come me deve essere stato a tratti frustrante ma arrivato a questo punto penso di aver capito la lezione: errare è umano ma perseverare è diabolico. Cercherò di portare con me i tuoi insegnamenti – magari segnandomeli da qualche parte – il più a lungo possibile.

Giungere fin qui senza l'aiuto dei ragazzi dell'ufficio dottorandi sarebbe stato decisamente più difficile e sicuramente meno divertente. Tutti i dottorandi, i borsisti e gli assegnisti che si sono susseguiti nel corso di questi anni mi hanno insegnato tanto, da voi ho imparato le basi della ricerca scientifica – e spesso anche quelle della chimica elementare – ma non solo, da voi ho imparato che non bisogna mai sottovalutarsi e che bisogna sempre credere in quello che si fa.

Tra le mille scadenze e i mille progetti da iniziare e concludere che avevate siete sempre riusciti a trovare del tempo per me quando ne avevo bisogno e di questo non posso che ringraziarvi con tutto il cuore. Quando diventerete ricercatori famosi mi vanterò di essere stato il vostro allievo prediletto.

Vanessa e Alessia sono state le amicizie più vere che ho stretto in questi ultimi anni di università, costanti fisse nei giorni che precedevano un esame. Con voi in aula studio le ore di produttività si riducevano della metà e concentrarsi e studiare diventava un'impresa perché i momenti gossip e le pause caffè (e non solo) prendevano sempre il sopravvento.

La maggior parte dei risultati che ho ottenuto negli ultimi mesi sono in parte anche merito vostro. Non avete mai smesso di credere in me e sono sicurissimo del fatto che i vostri incoraggiamenti sono sempre stati sinceri. Anche se probabilmente le nostre strade si divideranno, so che quando troveremo il modo di vederci torneremo a ridere, scherzare e ripensare a quei giorni, un po' belli e un po' brutti, che ci hanno legato così profondamente. Vi auguro di riuscire a superare tutte le vostre sfide future a testa alta.

Anche fuori dall'università ci sono state persone che mi sono state vicine in questi due lunghi anni.

Chiavette Cheung Fender 2 è un gruppo nato ormai 7 anni fa, la nostra chat contiene informazioni che dicono molto su di noi e sulla nostra amicizia; tuttavia, non possiamo negare che essa nasconda anche messaggi in grado di scatenare conflitti internazionali. Siamo condannati a rimanere amici per sempre.

Dato che il nome del nostro gruppo non ha un senso, ho deciso che è arrivato il momento di rendergli giustizia attribuendo a ciascuno di voi un ruolo speciale. Fate la foto a queste parole perché non mi sentirete dirle mai più in vita mia.

Martina è la chiave di violino, colei che armonizza tutte le nostre uscite e dà il ritmo ai nostri viaggi in macchina (purtroppo), senza di lei sarei perso e non sarei in grado di fare ordine nel pentagramma quando le note iniziamo a essere troppe e a mescolarsi facendo solo rumore. Negli ultimi anni sei maturata tanto, trasformavi e levigavi parti del tuo carattere così velocemente da farmi temere che ci stessimo allontanando. Nonostante in passato non sia riuscito a starti dietro, ti avverto che d'ora in poi non riuscirai a sfuggirmi tanto facilmente: terrò d'occhio i tuoi cambiamenti e ogni qual volta ti butterai a capofitto nel bosco dei tuoi pensieri per seminarli verrò a cercarti, per riportarti ai ricordi felici che condividiamo. Invece di pensare sempre a dove vuoi arrivare, ogni tanto fermati a guardare quanto lontano sei già arrivata.

Gaia è il passe-partout, la chiave in grado di superare qualsiasi ostacolo le si pari davanti, il suo unico problema è che si dimentica sempre più spesso di questa sua grande capacità. Per me è sempre stata un modello da seguire, l'esempio vivente del fatto che l'impegno viene sempre ripagato. Tu sei la chiavetta più tenace e i sacrifici che fai quando si tratta di preparare gli esami ne sono una dimostrazione lampante. Non vedo l'ora di tornare con te nelle nostre valli per ascoltare e valutare tutte le storie che avrai da raccontarmi. Ti scrivo anche che ti voglio bene così sei contenta.

Simone è la chiavetta USB, sempre carico di informazioni da condividere e avventure da raccontare, il tuo supporto per placare la pazzia di quelle due fenomeni è indispensabile e le risate quando ci sei tu non mancano mai. I ricordi che ho di noi da piccoli sono inestimabili, la complicità che si è creata tra di noi all'epoca è qualcosa che riesco a percepire ancora oggi. Sebbene il tempo libero da spendere dietro ai videogiochi non sia più quello di una volta sono sicuro che un giorno riusciremo a rivivere e a replicare quei pomeriggi infiniti che hanno visto nascere il nostro legame.

Anche le Crostatine ormai sono parte integrante della mia vita; Stefania e Veronica sono state le mie migliori alleate in questi anni di battaglia contro il genere umano. Vi ringrazio per essermi state dietro anche durante la magistrale e per avermi supportato nell'ultimo periodo. So benissimo quanto per voi l'università sia stata un tabù in passato e vedervi felici ora che avete trovato entrambe la vostra strada mi riempie di gioia. Continuate così negli studi: siete forti e meritate il meglio, vi voglio bene.