



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

Determinazione di VOC su foglie di *Vitis
vinifera* di diversi genotipi in condizioni di
stress idrico tramite tecniche TD-GC-MS

Relatore:

Prof. Luca Cappellin

Correlatori:

Dr. Michele Faralli

Dr. Pier Luigi Bianchedi

Laureando:

Emanuele Augusto La Bella

Matricola:

2048572

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Sommario

Abstract	4
1. Introduzione	5
1.1. Origine della vite e importanza della viticoltura	6
1.2. Funzione dei VOC nelle piante	8
1.3. Composti tipicamente presenti nelle foglie di vite	9
1.4. Severità idrica nella viticoltura	11
1.5. Metodi per la determinazione dei VOC	13
1.6. Confronto con metodi tradizionali	15
1.7. Correlazione tra emissione di VOC e stress idrico.....	16
1.8. Obiettivo della tesi	17
2. Materiali e metodi	18
2.1. Strumenti.....	18
2.2. Varietà di vite analizzate	18
2.2.1. Sangiovese.....	19
2.2.2. Montepulciano.....	19
2.3. Campionamento	21
2.4. Preparativa dei campioni	24
2.5. Procedura sperimentale	26
2.5.1. Parametri strumentali TD.....	28
2.5.2. Parametri strumentali GC-MS.....	32
3. Risultati e discussione	34
3.1. Ottimizzazione dei parametri dei metodi strumentali	34
3.1.1. Fibra	34
3.1.2. Trappola	37
3.1.3. Colonna	39
3.1.4. Parametri TD.....	40
3.1.5. Parametri GC.....	47
3.1.6. Parametri MS.....	50
3.2. Messa a punto dei metodi.....	53
3.3. Controllo strumentale.....	62
3.4. Risultati delle analisi statistiche	63
3.5. Comparazione con la letteratura esistente	74
3.6. Prospettive future	75
4. Conclusioni	77

5. Bibliografia	78
6. Appendice	83
Ringraziamenti	103

Abstract

Questo lavoro di tesi ha lo scopo di affrontare la tematica della analisi di VOC su foglie di *Vitis vinifera* tramite moderne e innovative tecniche di termodesorbimento accoppiate a gascromatografia e spettrometria di massa (TD-GC-MS).

Sono svolte analisi su campioni raccolti nell'ambito di un progetto su più larga scala, che vede la collaborazione del Dipartimento di Scienze Chimiche (DiSC) dell'Università degli Studi di Padova con la Fondazione Edmund Mach (F.E.M.).

Il progetto si propone il confronto tra due specie di *Vitis vinifera*, Sangiovese e Montepulciano, in condizioni di stress idrico attraverso tecniche di desorbimento termico ad alta capacità.

Il disegno sperimentale prevede due varietà (Sangiovese e Montepulciano), due trattamenti (controllo e stress idrico), tre repliche tecniche, due tempi di campionamento (primo campionamento all'ultimo giorno di stress; secondo campionamento dopo una settimana di recovery).

Per l'analisi è stata messa a punto una metodica basata su termodesorbimento accoppiato a GC-MS, utilizzando il sistema Centri 360 in combinazione con *HiSorb*TM di Markes International.

L'analisi è di tipo non-target e mette in correlazione i VOC rilevati nelle varie tipologie di campioni.

1. Introduzione

L'attuale cambiamento climatico ha tra le caratteristiche principali l'aumento di velocità nelle fluttuazioni climatiche stagionali con una tendenza globale all'aumento delle temperature. Consultando il bollettino della siccità (ISPRA,2023) il quale si avvale dello Standardized Precipitation Index (SPI) (McKee et al., 1993), si evince che nel caso delle zone inferiori della fascia temperata, dove quindi viene coltivata maggiormente la specie *Vitis vinifera*, vi è una diminuzione significativa delle precipitazioni; quindi, le condizioni potrebbero risultare più avverse per le coltivazioni vitivinicole.

Il lavoro che questa trattazione andrà a svolgere è quello di verificare se vi è una correlazione diretta tra emissione di Composti Organici Volatili (VOC) dalle foglie di *Vitis vinifera* e lo stress idrico (HS), mettendo a confronto foglie di viti sottoposte ad idratazione normale (WW) e in condizioni di HS.

1.1. Origine della vite e importanza della viticoltura

Si hanno tracce della prima domesticazione della *Vitis vinifera, sativa* in Mesopotamia attorno al IV millennio a.C. Successivamente prese piede dapprima nella parte più orientale del bacino Mediterraneo (Grecia fine III millennio a.C.) per poi passare nel bacino ovest fino ad essere, intorno al 1000 a.C., coltivata dai popoli dell'Italia centrale come gli Etruschi ed infine diffondersi attraverso anche altre tratte parallele nei secoli a seguire in tutta l'Europa (R. Buono, G. Vallariello, 2002).

La viticoltura è importante per molte ragioni, come l'importanza storica, la facilità di coltivazione rispetto ad altri alberi da frutto. L'abbondanza nell'uva di sostanze utili dal punto di vista organolettico. Ad esempio, nei suoi frutti sono presenti alte concentrazioni di antiossidanti naturali come i polifenoli (Šikuten et al., 2020).

Dal punto di vista industriale gli scarti di lavorazione vengono, in un'ottica di economia circolare, sfruttati anche in altri settori che ricercano costantemente delle materie prime più ecosostenibili per andare incontro alla forte richiesta del mercato presente e futuro, come ad esempio quello cosmetico. Infatti, alcuni dei composti presenti nei semi e nelle vinacce, vengono utilizzati come protettori della pelle contro stress ossidativi e radicalici (Sharafan et al., 2023).

Infine, l'aspetto più importante da non sottovalutare è sicuramente quello economico, infatti la coltivazione di vite, considerando solo il settore industriale mondiale del vino, è stato stimato che nel 2021 valeva 341,23 miliardi di dollari (Fortune, 2022) e come previsto dal report di Global Industry Analysts di marzo 2023 entro il 2030 arriverà a toccare la soglia record di 528 miliardi di dollari (Report Linker, 2023). Questi risultati sono ottenuti non solo grazie al bisogno del mercato ma anche al continuo investimento nel settore della ricerca in questo

campo, ecco perché risulta fondamentale continuare ad esplorare nuove possibilità e tecnologie all'interno di questo settore.

1.2. Funzione dei VOC nelle piante

Quando si parla di VOC ci si riferisce a tutta quella classe di composti organici che a 293,15 K (20°C) presentano una tensione di vapore pari a $P^\circ \geq 0,01\text{KPa}$ (D. Lgs. 152/2006).

Le piante in determinate condizioni possono trasformare fino al 20% della componente misurabile della sostanza organica del suolo in VOC (Kesselmeier *et al.*, 2002). I VOC si possono trovare in varie zone della pianta grazie all'elevata capacità di migrazione, dovuta sia alla loro scarsa idrofilicità e alle ridotte dimensioni delle molecole, le quali consentono loro di migrare attraverso barriere come cuticole cerose e membrane fosfolipidiche.

Nelle piante, i VOC consentono di agevolare parte di alcune vie metaboliche, interagendo con i recettori anche a bassissime concentrazioni, inoltre servono a comunicare anche a grandi distanze nell'ordine dei chilometri agli insetti impollinatori l'avanzamento dello stadio di maturazione della pianta.

Tra le molteplici funzioni dei VOC, abbiamo anche l'emissione in risposta ad attacchi di patogeni e predatori. Infine, alcuni composti, come i terpeni e terpenoidi, ad esempio, vengono emessi in condizioni di stress idrico, con il compito di regolare la normale attività delle membrane cellulari.

1.3. Composti tipicamente presenti nelle foglie di vite

I VOC sono emessi dalle foglie di vite per svolgere svariate funzioni, come ad esempio in risposta ad agenti patogeni. Servono anche a beneficiare microorganismi che lavorano in sinergia con la pianta. Vengono inoltre prodotti quando la pianta è sottoposta a stress biotici ed abiotici (Lazazzara, 2022).

Le categorie di VOC tipicamente emessi dalle foglie di vite sono generalmente (P. Štambuk et al.,2023; C.Lemaitre-Guiller et al.,2022 ; V. Lazazzara et al.,2018):

- Green Leaf Volatile (GLV)
- Alcoli alifatici
- Fenoli
- Monoterpeni
- Sesquiterpeni
- Terpenoidi
- Idrocarburi
- Chetoni
- Esteri

Composti simili a quelli che si possono ritrovare dentro gli acini e quindi dentro al vino, sostanze che conferiscono i gusti caratteristici alla bevanda (Palai et al., 2023).

La loro emissione è influenzata anche dai diversi momenti della giornata; infatti, di notte i VOC emessi dalla pianta hanno in generale una minore concentrazione rispetto a quelli emessi durante il giorno (Rodríguez-Delet et al.,2022).

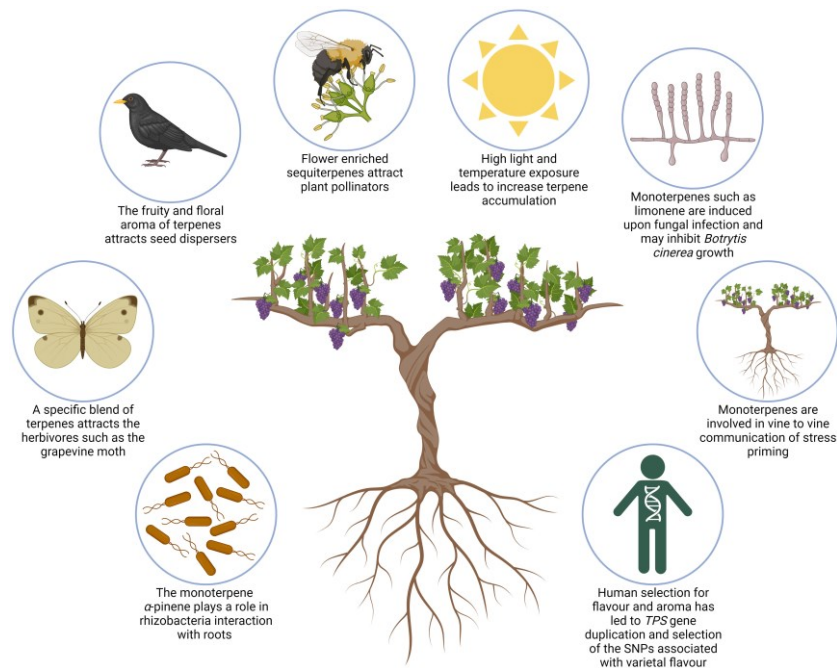


FIGURA 1 RUOLO DEI TERPENI E SESQUITERPENI NELLA VITE (BOSMAN, LASHBROOKE, 2023).

Come si nota dalla Figura 1 tra i più importanti metaboliti secondari ci sono i terpeni e sesquiterpeni, i quali servono a svolgere delle funzioni metaboliche estremamente specifiche come l'interazione tra la pianta ed un patogeno, la protezione dagli erbivori attirando i rispettivi predatori; fungono anche da attrattori per specie impollinatrici ed animali dispersori dei semi (Dudareva et al., 2013).

Come riportato da Bosman e Lashbrooke, in condizioni di radiazioni di tipo UV-B e/o uno stress idrico, si nota che i livelli di concentrazione di VOC aumentano, in particolar modo per quanto riguarda i terpeni (Bosman, Lashbrooke, 2023).

Come è stato dimostrato le condizioni di stress idrico durante lo sviluppo degli acini del Sangiovese giocano un ruolo fondamentale sulla produzione dei VOC alterando di fatto la qualità e quindi l'appetibilità del prodotto finale (Palai, 2023).

Ciò che questo lavoro andrà ad analizzare, a differenza di ciò che si trova in letteratura, è la tipologia di VOC che vengono accumulati sulle foglie e non prodotti de novo.

1.4. Severità idrica nella viticoltura

La severità idrica è un fenomeno sul quale si sta ponendo l'accento negli ultimi anni, soprattutto nelle zone che hanno un clima di tipo mediterraneo, dato che la maggior parte delle viti vengono coltivate in queste parti del mondo (OIV,2017).

Una delle caratteristiche principali che lega il cambiamento climatico e le zone temperate è l'aumento delle temperature e la riduzione delle precipitazioni, in generale durante l'anno e soprattutto nei mesi estivi (ARPAT,2021).

Durante il Vinitaly 2023 il professor Paolo Tarolli, docente di idraulica agraria dell'Università degli Studi di Padova, ha riportato che oltre il 43% del suolo agricolo destinato alla viticoltura è stato colpito dalla siccità e fenomeni legati ad essa (Moschetta, 2023).

Le tecniche di coltivazione andate sviluppandosi negli anni hanno permesso di ottenere il giusto equilibrio fra tre fattori fondamentali, ovvero:

- Produzione
- Qualità
- Costi

L'equilibrio che porta ad un prodotto con determinate caratteristiche è raggiunto soprattutto tenendo conto di una variabile fondamentale come il clima. Anche piccoli cambiamenti possono dover costringere a cambiare tecniche di coltivazione per mantenere l'equilibrio sopracitato facendo lievitare di fatto i costi, quando è possibile intervenire.

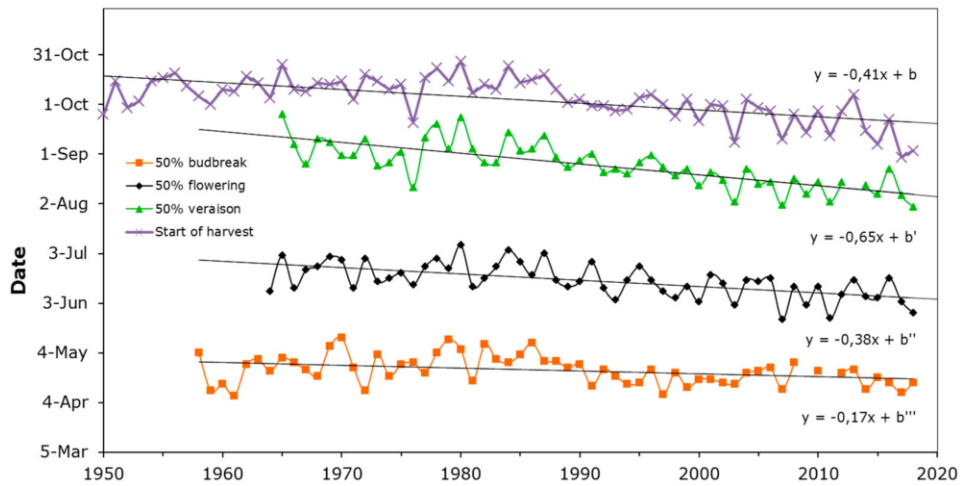


FIGURA 2 PERIODI DI: SBOCCIAMENTO, FIORITURA, INVAIATURA E RACCOLTA DAL 1950 AL 2020 (VAN LEEUWEN ET AL., 2019).

Dalla figura si evince che il cambiamento climatico porta ad uno spostamento dei vari periodi nelle fasi della produzione (van Leeuwen et al., 2019).

Parallelamente a questo fenomeno, si può osservare anche la parziale modifica delle aree geografiche adatte alla coltivazione della vite.

Le zone alle latitudini dove prima le temperature non consentivano la coltivazione, si stanno trasformando in climi adatti alla vite e in maniera speculare luoghi che precedentemente erano adatti alla coltivazione ora non lo sono più (Mosedale et al., 2016).

Si deve tener conto anche del fatto che questo tipo di indagini sono spesso svolte a bassa risoluzione geografica e trascurano la variabilità a livello capillare, fattore che potrebbe consentire alla vite la capacità di adattamento a climi mutevoli (van Leeuwen, et al. 2019).

D'altro canto, una leggera riduzione delle piogge in alcune tipologie di viti provoca un aumento della concentrazione zuccherina aumentando il valore del prodotto finale. Ciò, tuttavia, succede meno frequentemente rispetto a fenomeni estremi come siccità e inondazioni che danneggiano proporzionalmente in maniera più significativa i raccolti (van Leeuwen, Darriet, 2016).

1.5. Metodi per la determinazione dei VOC

I metodi più utilizzati per la determinazione di VOC sono quelli usati in accoppiata con la gas-cromatografia (GC) e alla spettrometria di massa (MS).

Alcuni tra i più comuni:

- GC-MS
- TD-GC-MS
- P&T-GC-MS

Queste tecniche solitamente prima del detector ionizzano i composti sfruttando la ionizzazione elettronica, mentre, tra le metodologie che utilizzano una ridotta frammentazione, si possono annoverare le tecniche per analisi dei VOC che sfruttano la ionizzazione chimica come:

- SIFT-MS
- PTR-MS

Capita spesso che le concentrazioni di VOC nei materiali vegetali e non solo, risulti esiguo, per questo spesso si adottano tecniche e strategie di accumulo dei composti in fase di analisi o in fase di campionamento e in alcuni casi anche in entrambe.

Accumulo in fase di analisi:

Per le tecniche di accumulo in fase di analisi si può citare ad esempio la tecnica head space solid phase microextraction (HS-SPME), la quale sfrutta lo spazio di testa di una vial contenente del campione in forma solida e consente di accumulare composti su varie tipologie di fibre adsorbenti.

Aumentando il tempo di contatto tra una fibra adsorbente e i composti volatili presenti nella vial si riesce di fatto ad incrementare la concentrazione di quest'ultimi che poi verranno portati al detector a livelli che consentono di generare un segnale strumentale apprezzabile.

Accumulo in fase di campionamento:

Per le strategie di accumulo in fase di campionamento *in vivo* esistono varie tecniche, tra quelle note adatte alla tipologia di VOC emessi direttamente in vivo dalla pianta si possono illustrare quattro tecniche principali

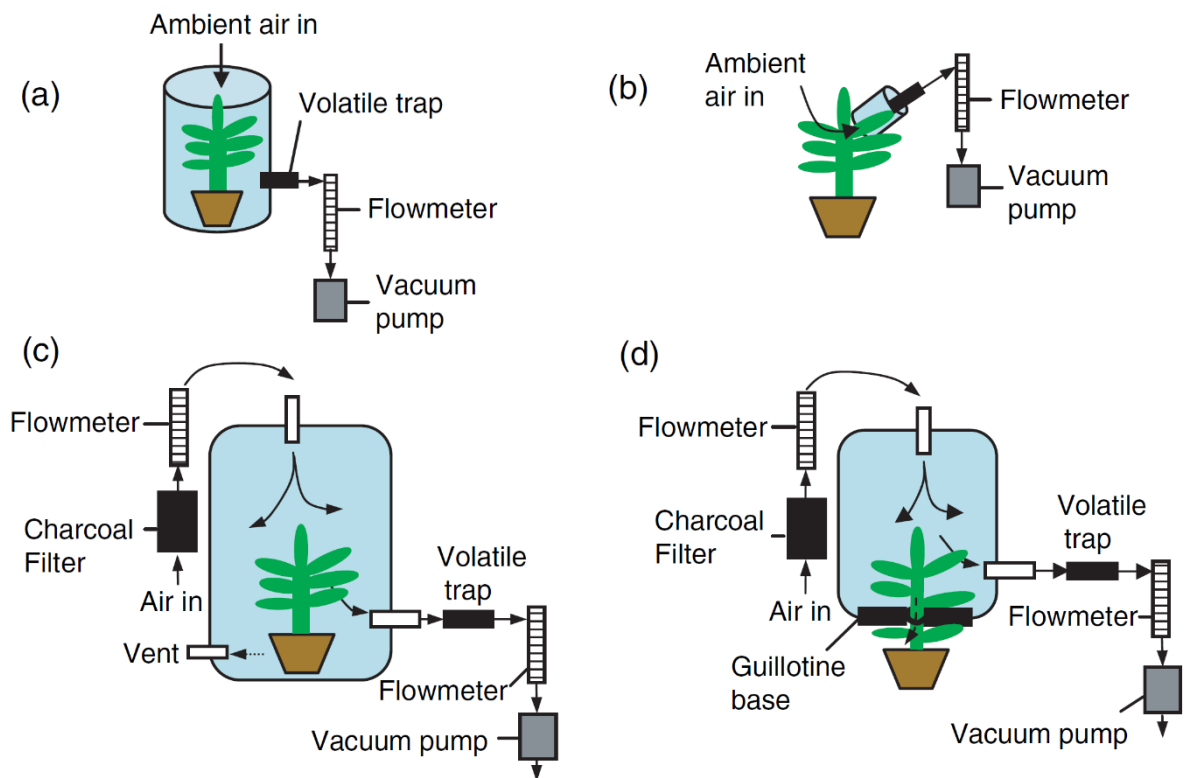


FIGURA 3.4 TIPOLOGIE DI CAMPIONAMENTO DEI VOC PRESENTI NELLE PIANTE (THOLL ET AL. 2006).

Come si vede in Figura 3 si possono adottare varie modalità a seconda dell'analisi necessaria come il campionamento dei VOC prodotti sopra il terreno di tutta la pianta (a), oppure scegliere di campionare specifiche parti della pianta (b). In caso di necessità riduzione di interferenti è possibile applicare dei filtri a valle del campionamento (c,d).

Il costo di questo tipo di raccolta campioni è sicuramente l'elevata laboriosità di campionamento; infatti, a seconda degli analiti target oltre all'apparato che viene applicato alla pianta, i tempi di campionamento possono risultare particolarmente lunghi, il vantaggio è sicuramente l'analisi di VOC emessi *de novo* dalla pianta.

1.6. Confronto con metodi tradizionali

Il principale metodo tradizionale con il quali si può comparare il sistema Centri 360 e il sistema HiSorb è l'SPME automatizzata. Le principali differenze tra HiSorb e SPME sono:

Centri 360 con HiSorb:

- Maggiore capacità estrattiva degli analiti.
- Maggiore risposta strumentale.
- Possibilità di criofocalizzazione.
- Possibilità, durante il desorbimento della trappola di raccogliere parte dello splittato in un tubo adsorbente, utile nel caso di campioni preziosi o per avere un back-up del campione stesso.
- Maggiore robustezza dei materiali.

SPME con sistema completamente automatizzato:

- Migliori performance in estrazione liquido-liquido

Quindi il sistema Centri 360 con HiSorb è sicuramente un modo, per l'identificazione di VOC e SVOC, che presenta di minori limiti di rivelabilità e maggiore robustezza rispetto ai tradizionali metodi esistenti; tuttavia, va sempre valutata quale tecnica è più opportuno valutare soprattutto in base ad ogni caso specifico (Hearn et al., 2022; Cheng et al., 2021)

1.7. Correlazione tra emissione di VOC e stress idrico

La maggior parte dei lavori svolti sullo studio della correlazione tra i VOC e lo stress idrico, sono svolti tramite analisi in vivo, analizzando l'emissione direttamente delle foglie.

La tendenza delle piante, come evidenziato da molti studi, è quella di presentare una variazione di emissione di VOC in risposta allo stato a cui è sottoposto. Ad esempio, in condizioni di stress idrico le piante presentano una variazione di emissione di VOC. Solitamente si nota un aumento, specialmente in classi di composti come monoterpeni e sesquiterpeni (Simpraga et al., 2011).

È stato inoltre confermato che questo fenomeno si manifesta in maniera maggiore, influenzando di più le fasi di vita della pianta, in periodo di maturazione, dove appunto la produzione di VOC totali in risposta a condizioni di stress abiotici è maggiore (Bonn et al., 2019).

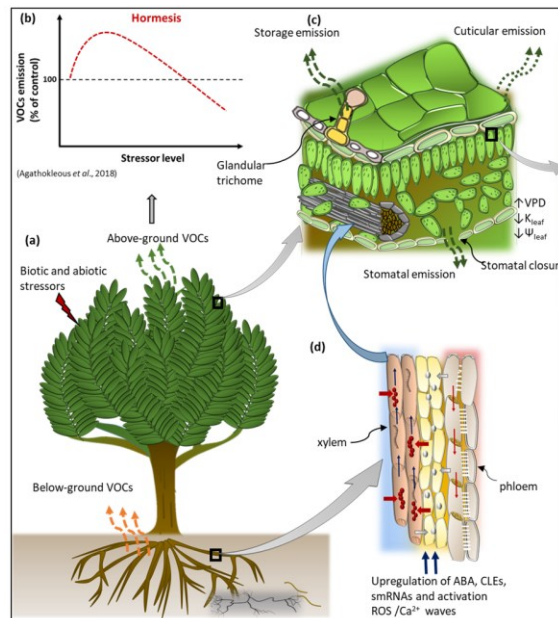


FIGURA 4 SCHEMA PRODUZIONE VOC DI PIANTE IN RISPOSTA A STRESS ABIOTICO E BIOTICO (MIDZI ET AL. 2022).

Come mostrato in figura esistono vari canali di emissione dei VOC, quello che attraverso questa analisi si andrà a determinare sono i VOC accumulati nei vacuoli.

1.8. Obiettivo della tesi

Questa tesi fa parte di un progetto più grande in collaborazione con la Fondazione Edmund Mach (F.E.M.) che cerca di caratterizzare e poi comprendere la variabilità intravarietale clonale per caratteri di tolleranza agli stress abiotici nella vite da vino.

L'obiettivo che si pone questo elaborato è lo sviluppo e l'ottimizzazione di una metodica di analisi per un sistema analitico innovativo e l'identificazione dei composti tipicamente presenti nelle foglie di vite cercando una correlazione tra la severità idrica e la loro relativa produzione.

In particolare, sarà indagata l'ipotesi che all'interno delle varietà di Sangiovese e Montepulciano possano esserci delle risposte fisiologiche differenziali a livello di emissione di metaboliti secondari, nella fattispecie VOC.

2. Materiali e metodi

2.1. Strumenti

Strumento	Marca e modello
Sample Automated Preparation (SAP)	Markes international HiSorb™ Tool HS Tool
Termodesorbitore (TD)	Markes International Centri 360
Gascromatografo (GC)	Agilent Technologies 8860
Spettrometro di massa (MS)	Agilent Technologies 5977B

2.2. Varietà di vite analizzate

Le varietà di vite analizzate sono state scelte in base a due caratteristiche principali:

- Isoidricità:

Le piante isoidriche, presentano una limitata apertura stomaica in risposta agli stress idrici, una minore traspirazione, hanno una minore fotosintesi netta in condizioni di stress idrico, quindi, complessivamente risultano meno sensibili alla carenza idrica.

- Anisoidricità:

Le piante anisoidriche presentano apertura stomaica che permane anche durante gli stress idrici, una maggiore traspirazione, hanno una maggiore fotosintesi netta in condizioni di stress idrico, quindi, complessivamente risultano più sensibili alla carenza idrica.

Sono state scelte queste due tipologie di varietà con l'obiettivo di aumentare la differenza di risposta allo stress idrico indotto e di conseguenza una significativa differenza potenziale nei composti emessi.

2.2.1. Sangiovese

La varietà Sangiovese è una delle viti a bacca nera da vino più diffuse al mondo, nonché la varietà più coltivata in Italia, infatti, l'11% del suolo dedicato alla coltivazione di vino, 71600 ha, è occupato da quest'ultima (Quattrocaldi, 2019).



FIGURA 5 DIFFUSIONE VITIGNI SANGIOVESE IN ITALIA (QUATTROCALICI, 2019).

Questa varietà è stata scelta, non solo per la sua elevata diffusione, come rappresentato in figura, ma soprattutto per le sue accentuate caratteristiche isoidriche, cosa che la rende importante per la sua spiccata resistenza alle condizioni di stress idrico.

2.2.2. Montepulciano

La varietà Montepulciano è una delle viti a bacca nera da vino diffusa principalmente in Italia, il vino prodotto è molto corposo e profumato, merito anche dei VOC in esso presenti, tra i quali, polifenoli, alcoli ed esteri (Baiano et al., 2016). Occupa più del 5% del suolo vitivinicolo italiano.



FIGURA 6 DIFFUSIONE VITIGNI MONTEPULCIANO IN ITALIA (QUATTROCALICI, 2019).

Questa varietà è stata scelta soprattutto per le sue caratteristiche anisoidriche, cosa che la rende importante per la sua suscettibilità nei confronti degli stress idrici, rispetto al più resistente Sangiovese.

2.3.Campionamento

Disegno sperimentale:

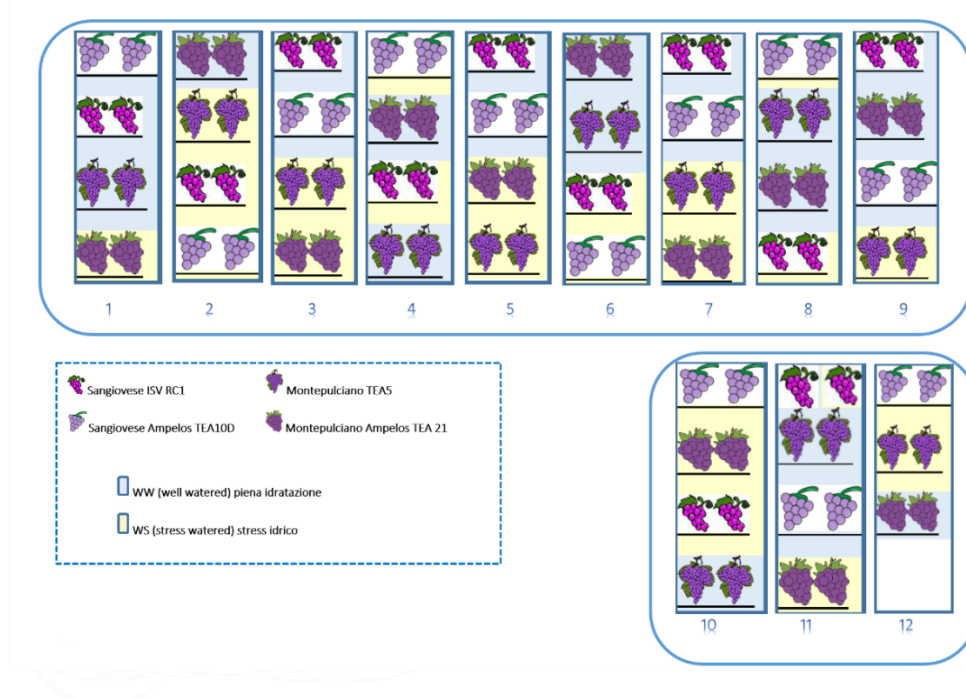


FIGURA 7 BLOCCHI COLTIVAZIONE VITI E CONDIZIONI CONTROLLATE (FARKAS,2023).

Come si evince dalla figura sono state messe in ordine randomizzato sia le posizioni che i trattamenti delle piante così da ottenere una randomizzazione più omogenea possibile delle condizioni per tutte le viti.

L'esperimento consiste nell'analisi delle foglie di due varietà di viti, ciascuna di due cloni differenti, due diversi tipi di trattamento in due momenti di campionamenti diversi ognuna per sei ripetute biologiche, per un totale di 96 campioni come mostrato in figura.

Le piante sono state coltivate in serra, le condizioni di stress idrico sono state indotte togliendo la normale irrigazione e inserendo il vaso contenente la vite all'interno di un involucro di plastica, così da limitare l'evaporazione dell'acqua dalla terra, il campionamento è avvenuto alla fine della fase di maturazione delle foglie.

Dopo che le barbatelle hanno raggiunto il livello di maturazione necessaria



FIGURA 9 BARBATELLE POSTE IN CONDIZIONI CONTROLLATE (FARKAS, 2023).



FIGURA 8 GEMME DI MONTEPULCIANO (FARKAS, 2023).

è avvenuto il campionamento nella serra a condizione controllate.



FIGURA 10 FOGLIE DI MONTEPULCIANO IN CONDIZIONI DI STRESS IDRICO (FARKAS, 2023).

Come si evince dalla Figura 10, la varietà Montepulciano in condizioni di stress idrico presenta foglie ingiallite e avvizzite che conferma le sue caratteristiche anisoidriche.

È stata scelta una foglia matura per ogni pianta nella parte mediana della vite, successivamente è stata tagliata lasciando intatto il peduncolo; quindi, arrotolata ed inserita in una falcon da 50mL ed infine la falcon è stata inserita in un contenitore contenente azoto liquido.

Una volta congelata la foglia, dopo avere preraffreddato un mulino a sfere con azoto liquido, viene estratta dalla provetta, macinata per circa 1 min e riposta sottoforma di polvere all'interno della falcon. Questa viene poi messa in un Ultracongelatore a -80°C fino alla preparativa dei campioni.

La fase di campionamento è stata svolta alla Fondazione Edmund Mach dalle persone responsabili del progetto complessivo.

2.4.Preparativa dei campioni

La preparativa dei campioni è avvenuta nei laboratori della Fondazione Edmund Mach. I materiali utilizzati sono:

- Bilancia Gibertini Crystal 100 (0,1 mg)
- Spatole di varie dimensioni
- Vial da 20 mL crimp top
- Setti e tappi in silicone microcentrati per HiSorb™ (gas tight)¹
- Crimper
- Na₂SO₄ anidro
- Toluene (LC-MS grade)
- Metanolo (LC-MS grade)
- Soluzione 2ppm di Toluene (LC-MS grade) in Metanolo (LC-MS grade)
- Mulino a sfere
- Azoto liquido
- Ghiaccio secco (uso logistico)
- Dispositivi di protezione individuale (DPI)

Dopo aver indossato correttamente i DPI necessari per l'attività è iniziata la preparativa dei campioni.

Dapprima sono state contrassegnate le vial, con un codice univoco, successivamente è stato preparato un contenitore coibentato riempito con azoto liquido, dove sono state riposte insieme alle spatole. A temperatura ambiente sono state preparate delle vial con circa 500 mg di sale, (Na₂SO₄ anidro) e chiuse con il crimper, le quali costituiscono i bianchi.

I campioni di foglie già macinate sono stati prelevati dall'Ultracongelatore posto a -80°C ed inseriti in un ulteriore contenitore coibentato.

¹ I setti microcentrati dato il diametro elevato dei probe una volta forati non possono essere utilizzati per eventuali ulteriori analisi, ne ripetute.

Dopo aver pesato ed inserito circa 500 mg di sale, grazie all'ausilio delle spatole refrigerate vengono pesati ed inseriti 500 mg di materiale biologico all'interno di ogni vial e chiuse con il crimper. L'operazione è stata ripetuta per tutti i campioni sui quali è stato possibile.

Alcuni campioni all'apertura delle falcon dove erano contenuti risultavano impaccati. Per questi, si è proceduto nel seguente modo: sono state prese delle giare del mulino con la rispettiva sfera di acciaio e raffreddate con azoto liquido, successivamente sono stati inseriti i campioni impaccati² e portati al mulino roto-oscillante e macinate per circa 2/3 minuti, infine pesati e inseriti nelle vial.

Una volta preparate le vial sono state inserite in un contenitore termicamente isolato per il trasporto insieme a ghiaccio secco. Dopo essere state trasferite al Dipartimento di Scienze Chimiche di Padova (DiSC) sono state nuovamente stoccate in un Ultracongelatore a -80 °C. Tutte le operazioni svolte sui campioni e successivamente sulle vial sono state eseguite mantenendo il ciclo del freddo ad almeno -80 °C, così da limitare la perdita di VOC.

Infine, al DiSC sono state preparate delle vial contenenti 1 mL di una soluzione 2 ppm di toluene in metanolo che fungeranno da standard per il controllo della stabilità dello strumento.

² Per ogni campione è stata utilizzata una diversa giara così da ottimizzare le operazioni ed evitare contaminazioni incrociate.

2.5. Procedura sperimentale

La procedura sperimentale consta di due sistemi in accoppiata, TD e GC-MS, per ognuno dei quali è stato dapprima testato e poi ottimizzato un metodo e sono stati definiti dei parametri strumentali ottimali, successivamente messi in serie per l'esperimento.

La procedura sperimentale prevede l'analisi delle vial con i campioni precedentemente preparati alternando bianchi e standard per il controllo strumentale.

Dopo aver verificato il corretto funzionamento dei sistemi con dei campioni non appartenenti all'esperimento per via dell'irripetibilità dell'analisi su ogni campione, data la loro complessità interna (il termodesorbitore in totale contiene più di 13 valvole tra elettriche e pneumatiche), verranno eseguite le misurazioni dei campioni come segue.

Dopo aver condizionato il probe attraverso le procedure indicate dal produttore si procede con l'analisi, all'inizio alternando bianchi ad ogni campione, verificando quindi che l'assenza di effetti memoria. Una volta determinata la stabilità dei sistemi e della fibra si procede con un'analisi più sistematica indicativamente come segue:

1. Bianco
2. Quattro campioni
3. Bianco
4. Quattro campioni
5. Bianco
6. Condizionamento del probe
7. Condizionamento della trappola
8. Standard
9. Bianco

10. Quattro campioni

11. Bianco

12. Quattro campioni

Si procede in questo modo condizionando il sistema dopo ogni tipo di campionamento (sotto stress e dopo recovery) per randomizzare il più possibile le varietà, i trattamenti e il periodo di campionamento dei campioni.

2.5.1. Parametri strumentali TD



FIGURA 11 TERMODESORBITORE MARKES INTERNATIONAL CENTRI 360 (MARKES,2023).

Il termodesorbitor Centri 360 (Figura 11) è uno strumento molto versatile, in quanto consente varie tipologie e modalità di termodesorbimento come:

- Tube Desorption (desorbimento tubi adsorbenti)
- Direct Desorption (desorbimento di liner di vetro riempiti con il campione e successivamente inseriti all'interno dei tubi adsorbenti)
- SPME
- SPME-trap (SPME con criofocalizzazione)
- HS
- HS-trap (HS con criofocalizzazione)
- HiSorb™ (SPME ad alta capacità con criofocalizzazione)

Tra tutte le possibilità è stata scelta la tecnologia proprietaria HiSorb™ dato che in letteratura non esistono ad oggi molte analisi di questo tipo svolte con questa

modalità, inoltre come dichiarato dal produttore, su alcune classi di composti rispetto alla più tradizionale SPME consente, a parità di condizioni sperimentali, di arrivare a limiti di rilevabilità (LOD) fino a due ordini di grandezza superiore (Markes,2023).

La tecnica HiSorb™ consente di raggiungere tali prestazioni anche grazie alla sua maggiore superficie adsorbente rispetto ad una normale SPME come mostrato nella figura sottostante. Oltre a ciò, all'interno dello strumento è

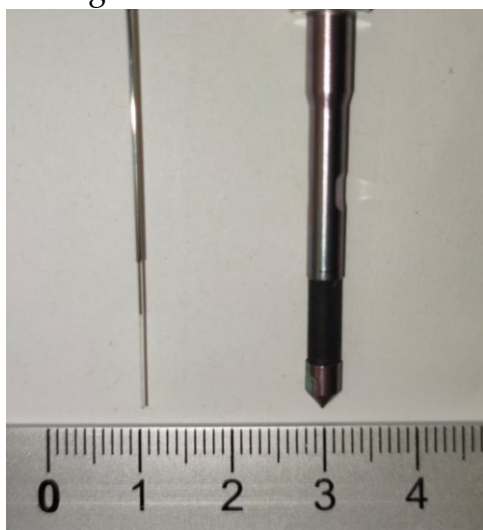


FIGURA 13 CONFRONTO SUPERFICIE ADSORBENTE SPME (SX) E HISORB (DX).



FIGURA 12 ELETTROVALVOLE DI INGRESSO IN TRAPPOLA E CELLA PELTIER.

presente una trappola criofocalizzante, la quale, grazie ad una cella di Peltier può essere posta ad una temperatura fino a -30°C che consente di intrappolare i composti in fase di desorbimento della fibra.

I parametri del metodo per questa analisi sono stati inseriti attraverso il software del Centri 360 e i materiali sono stati installati dopo aver seguito un corso di formazione specifico e sono:

Parametro/Materiali	Valore/tipologia
Temperatura di incubazione	60°C
Tempo di incubazione	30 min.
Predesorbimento del probe	0.5 min. a 50mL/min.
Temperatura di desorbimento probe	250°C
Tempo di desorbimento probe	10 min.
Flusso desorbimento probe	50ml/min.
Splittaggio di desorbimento probe	OFF (tutto il flusso desorbito finisce in trappola)
Purge della trappola	1 min. a 50mL/min.
Temperatura trappola (durante criofofocalizzazione)	-5°C
Temperatura di desorbimento trappola verso GC-MS	280°C
Gradiente temperatura desorbimento trappola	≈100°C/s
Tempo di desorbimento trappola	3 min.
Splittaggio di desorbimento trappola	15 mL/min.
Temperatura Transfer-Line	170°C
Probe HiSorb™	CarbonWideRange (DVB/CWR/PDMS)
Trappola	Material Emission (setacci molecolari carbonizzati e polimeri porosi)

TABELLA 1 METODO E PARAMETRI STRUMENTALI TERMODESORBITORE

Probe HiSorb™ DVB/CWR/PDMS (nella figura sottostante di colore nero): Il materiale della fibra adsorbente è composto da divinilbenzene,



FIGURA 14 HiSORB (MARKES,2023).

polidimetilsilossano e materiali specifici come cere, non specificate dal produttore, che riescono ad adsorbire composti organici volatili e semivolatili a basso numero di carboni (Markes,2023).

Trappola Material Emission: I materiali della trappola sono costituiti da un corpo di quarzo riempito con circa 60mm di materiale adsorbente composto da setacci molecolari carbonizzati e polimeri porosi che riescono ad adsorbire composti organici volatili e semivolatili che vanno da C₄ a C₃₂.



FIGURA 15 TRAPPOLE CRIOFOCALIZZANTI (MARKES,2023).

2.5.2. Parametri strumentali GC-MS

Il sistema GC-MS è composto da due parti interconnesse tra di loro e a loro (ovvero gas cromatografo e spettrometro di massa) volta collegate al

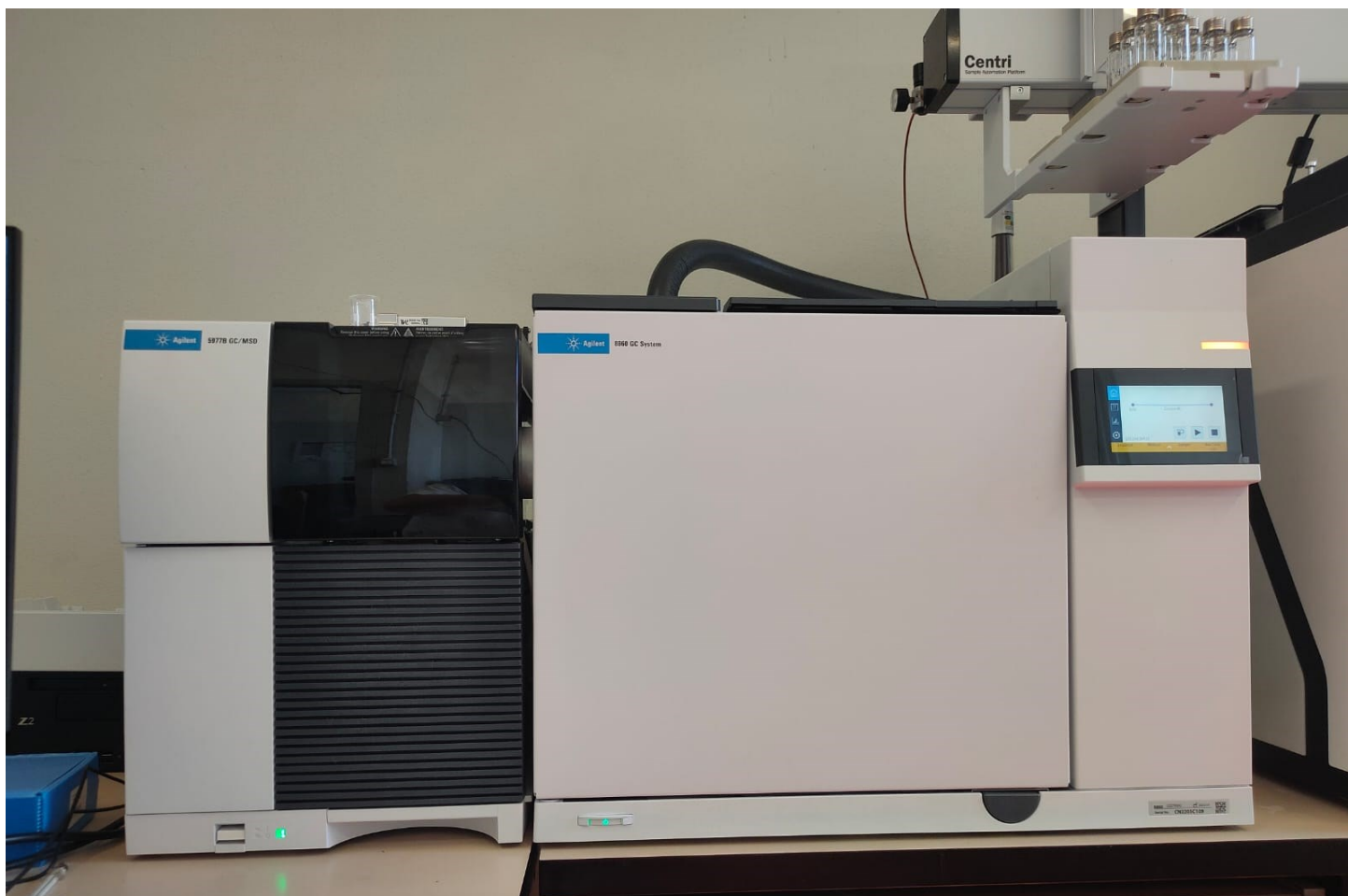


FIGURA 16 SISTEMA GC-MS AGILENT (8860 GC E 5977B MSD).

termodesorbitore attraverso una transfer-line.

I parametri e i materiali del metodo per questa analisi sono stati inseriti attraverso il software MassHunter GC/MS Data Acquisition versione 10.0. come riportato di seguito:

Parametro/Materiali	Valore/tipologia
GC	
Flusso	1 mL/min.
Carrier gas	He
Temperatura iniziale GC	40°C
Hold Time iniziale	1 min.
Gradiente 1	6°C/min.
Temperatura 1	190°C
Hold Time 1	2 min.
Gradiente 2	15°C/min.
Temperatura 2	280°C
Hold Time 2	1 min.
Post Run Temp.	290°C
Post Run Flow	1.2 mL/min.
Post Run Time	2 min.
Colonna	Agilent HP-5ms Ultra Inert 30m x 250µm x 0.25µm
MS	
Temperatura sorgente	230°C
Temperatura quadrupolo	150°C
Mass range	35-400 amu
Solvent Delay	2 min.
Modalità di acquisizione	Scan
Sorgente	SST EI (350)

TABELLA 2 METODO E PARAMETRI STRUMENTALI GC-MS

3. Risultati e discussione

3.1. Ottimizzazione dei parametri dei metodi strumentali

3.1.1. Fibra

Sono stati inizialmente scelti la tipologia di probe necessari. Infatti, a seconda del loro utilizzo, in fase liquida o con campioni solidi, ne esistono di diversi tipi:

- Standard length stainless steel
- Standard length tipo Siltek
- Short version stainless steel
- Short version tipo Siltek

È stato scelto il probe di tipo Short version tipo Siltek, ciò perché andando ad analizzare quantitativi esigui di composti si temeva una possibile interazione dell'acciaio con gli analiti e quindi di trovare alla fine dell'analisi una risposta strumentale poco rappresentativa, mentre, optando per questa tipologia di probe, sicuramente viene ridotta l'interazione analita/metallo.



FIGURA 17 TIPOLOGIE DI PROBE PER HISORB

Dalla figura 17 si nota chiaramente come il probe standard length sia più indicato per dei campioni liquidi che devono entrare in contatto con la fibra mentre lo short length sia più indicato per microestrazioni di tipo solido.

Successivamente, per la scelta della tipologia di fibra necessaria sono state valutate sia la letteratura che le application note a riguardo. Le principali fibre sono:

- PDMS
- PDMS/CWR
- PDMS/DVB
- DVB/CWR/PDMS

PDMS:

La fibra costituita da Polidimetilsilossano è molto usata per l'analisi dei composti volatili e semivolatili non polari (Fies, Püttmann, 2006).

PDMS/CWR:

La fibra costituita da Polidimetilsilossano e "carbon wide range", viene usata per l'analisi dei composti volatili non polari a basso peso molecolare.

PDMS/DVB:

La fibra è costituita da Polidimetilsilossano e Divinilbenzene, viene spesso utilizzata per la determinazione di composti volatili polari, è nota inoltre per la sua elevata riproducibilità (Stenerson et al.,2016).

DVB/CWR/PDMS:

La fibra è costituita da Divinilbenzene, "carbon wide range" e Polidimetilsilossano, viene utilizzata per composti volatili, semivolatili e sostanze presenti nel settore delle fragranze e aromi alimentari, inoltre è stato dimostrato come questa tipologia di strato adsorbente presenti la più alta risposta, per tutte le classi dei VOC presenti nelle bucce d'uva (Šikuten,2021).

Il venditore aveva incluso nello starter kit delle fibre in PDMS non nuove, che sono state testate con vari materiali, ottenendo delle buone risposte, ma dopo

alcune analisi si è scelto di acquistare le fibre in DVB/CWR/PDMS data la loro migliore idoneità per la tipologia di analisi, come mostrano i seguenti risultati.

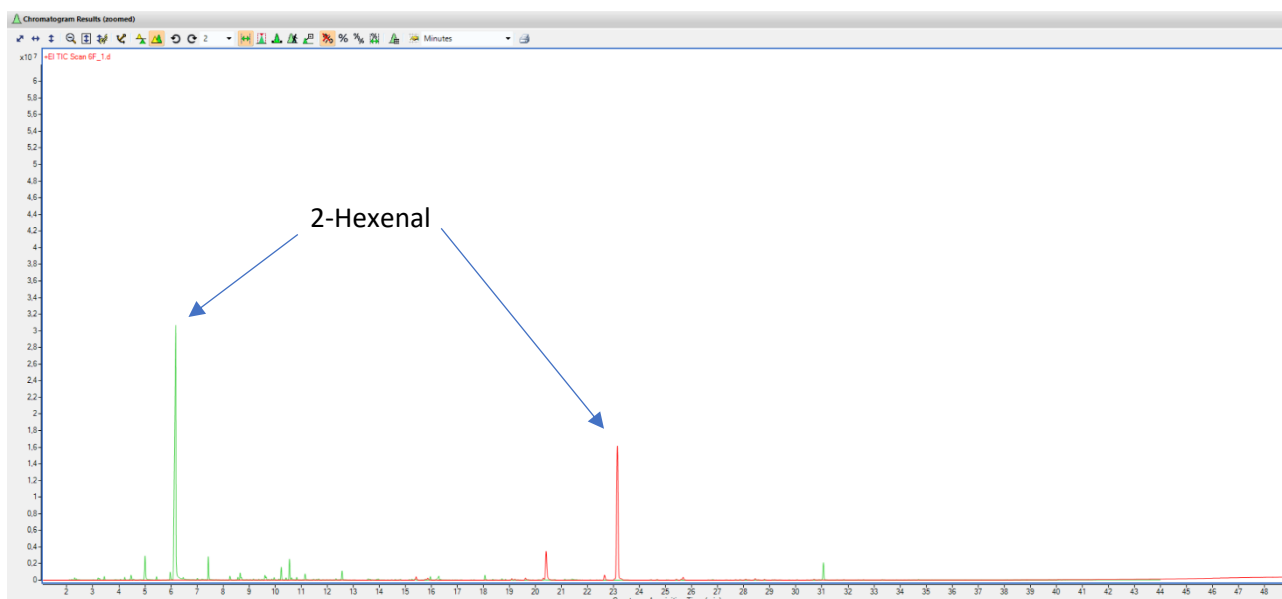


FIGURA 18 CONFRONTO CROMATOGRAMMA OTTENUTO CON FIBRA PDMS 149MG FOGLIE (ROSSO) E FIBRA CWR 140MG FOGLIE (VERDE). I TEMPI DI RITENZIONE SONO SPOSTATI NEI DUE CASI PER MOTIVI TECNICI.

Il cromatogramma in Figura 18 serve a mettere in risalto solo le differenze di intensità di segnale tra i due metodi posti a confronto, nei quali variano anche i tempi di ritenzione che non hanno influenze sull'intensità.

3.1.2. Trappola

Le trappole disponibili nel sito del produttore sono molte e spaziano a seconda delle applicazioni, alcune anche molto specifiche, come trappole per metodi EPA e identificazioni di armi chimiche (Markes, 2023).

Lo strumento già presentava una trappola “General porpouse” con un riempimento di 60 mm di materiale polimerico poroso, probabilmente Tenax, non sono state trovate molte informazioni a riguardo né in letteratura né nel sito del produttore, dalle indicazioni del produttore questa trappola è adatta per composti volatili da C₆ a C_{30/32}.

Sono state svolte delle analisi con la trappola “General pourpose” ottenendo delle risposte poco intense se rapportate ai segnali di disturbo generati da composti rilasciati da colonna, probe e setti.

La scelta della trappola è stata fatta in base alle specifiche tecniche dichiarate dal produttore, si è optato quindi per una “Material emission” ovvero una trappola che presenta un riempimento misto di setacci molecolari carbonizzati e polimeri porosi che riescono ad adsorbire composti organici volatili e semivolatili che vanno da C₄ a C₃₂ ed inoltre è stata scelta perché aiuta ad eliminare selettivamente l’acqua.

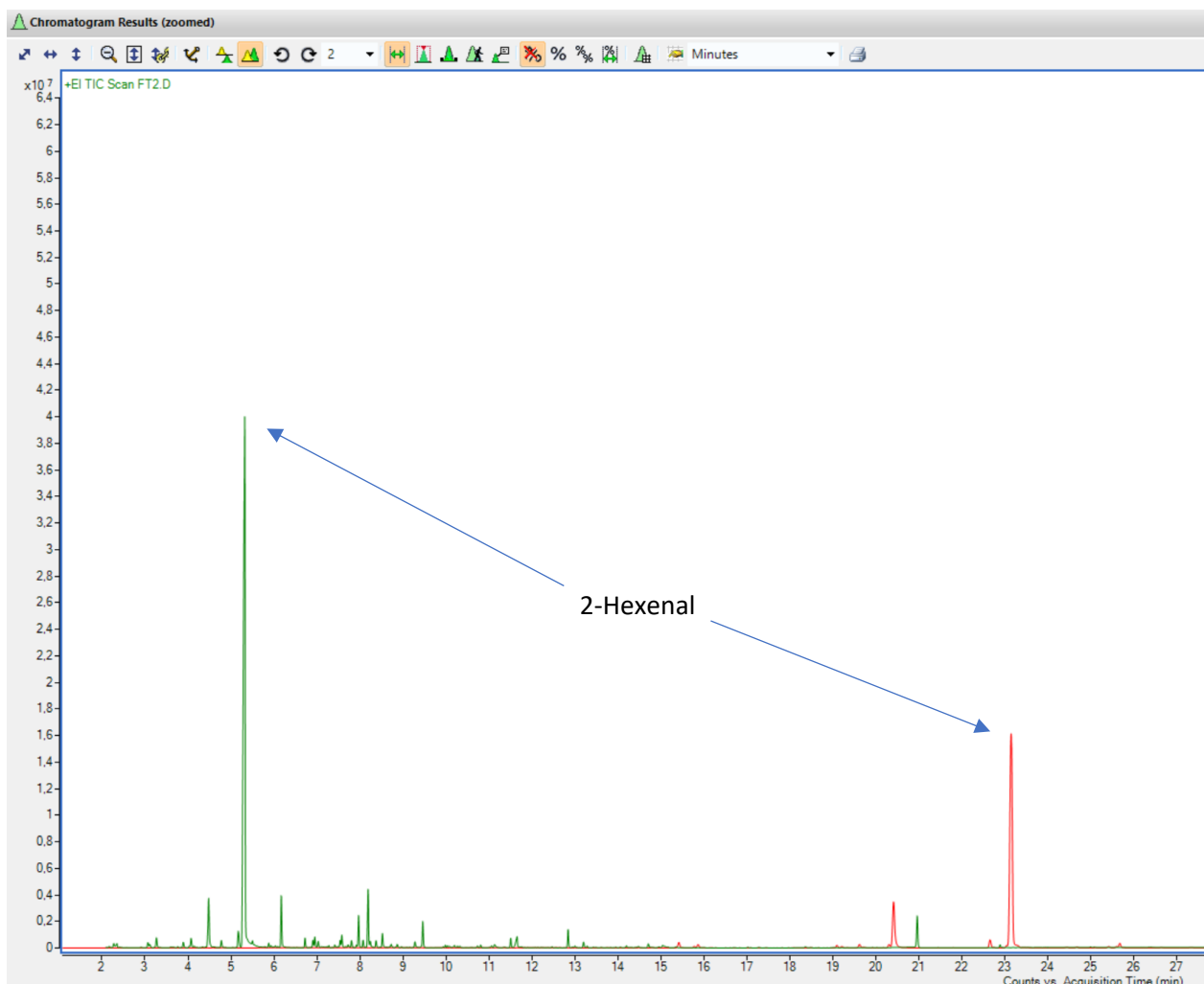


FIGURA 19 SOVRAPPOSIZIONE CROMATOGRAMMI OTTENUTI CON TRAPPOLA GENERAL POURPOSE 149,3MG FOGLIE (ROSSO) E TRAPPOLA MATERIAL EMISSION 136,22MG FOGLIE (VERDE).

Il cromatogramma in Figura 19 serve a mettere in risalto solo le differenze di intensità l'intensità di segnale dato che tra i due metodi posti a confronto, nei quali variano anche i tempi di ritenzione, i quali non hanno influenze sull'intensità.

3.1.3. Colonna

La colonna cromatografica utilizzata durante la fase di installazione dello strumento era una Agilent HP-5ms Ultra Inert 30m x 250 μ m x 0.25 μ m, la quale presentava delle prestazioni sufficienti per la risoluzione dei composti, ma si è optato per una colonna più indicata e con delle prestazioni migliori, ovvero una Restek Rxi-624Sil MS 60m x 250 μ m x 1.4 μ m.

La quale infine è stata risostituita con Agilent HP-5ms Ultra Inert 30m x 250 μ m x 0.25 μ m per motivi tecnici.

3.1.4. Parametri TD

I parametri principali del termodesorbitore impostabili sono:

- Temperature (ad esempio, di incubazione)
- Tempi (ad esempio, di incubazione)
- Splittaggi
- Flussi
- Condizionamenti di sistema e tool

Le varie prove sono state svolte tenendo in considerazione il pattern che seguono il campione e i composti che contiene all'interno del Centri 360:

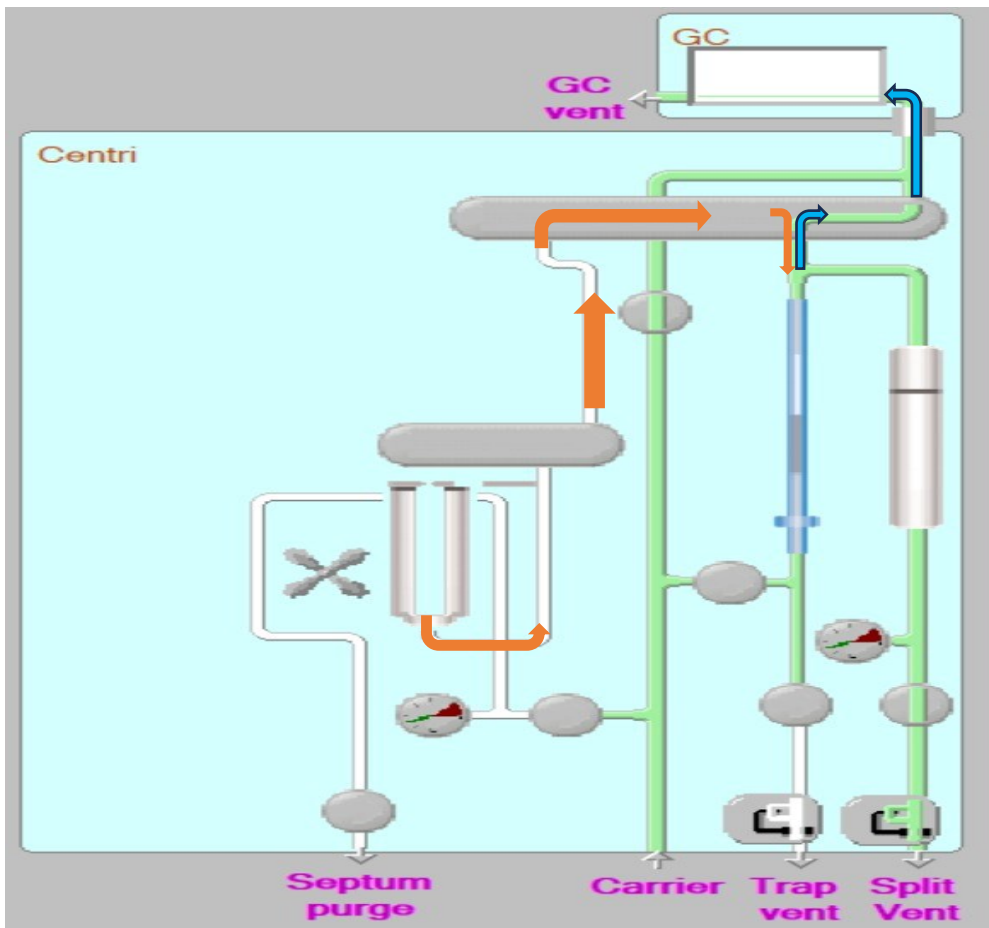


FIGURA 20 PERCORSO GENERALE SEMPLIFICATO PER IL TERMODESORBIMENTO ESEGUITO.

Lo schema precedente è una versione rappresentativa semplificata del circuito del TD.

Incubazione:

Per i tempi di incubazione, sono stati testati 3 diversi tempi: 30min./45min./60min.

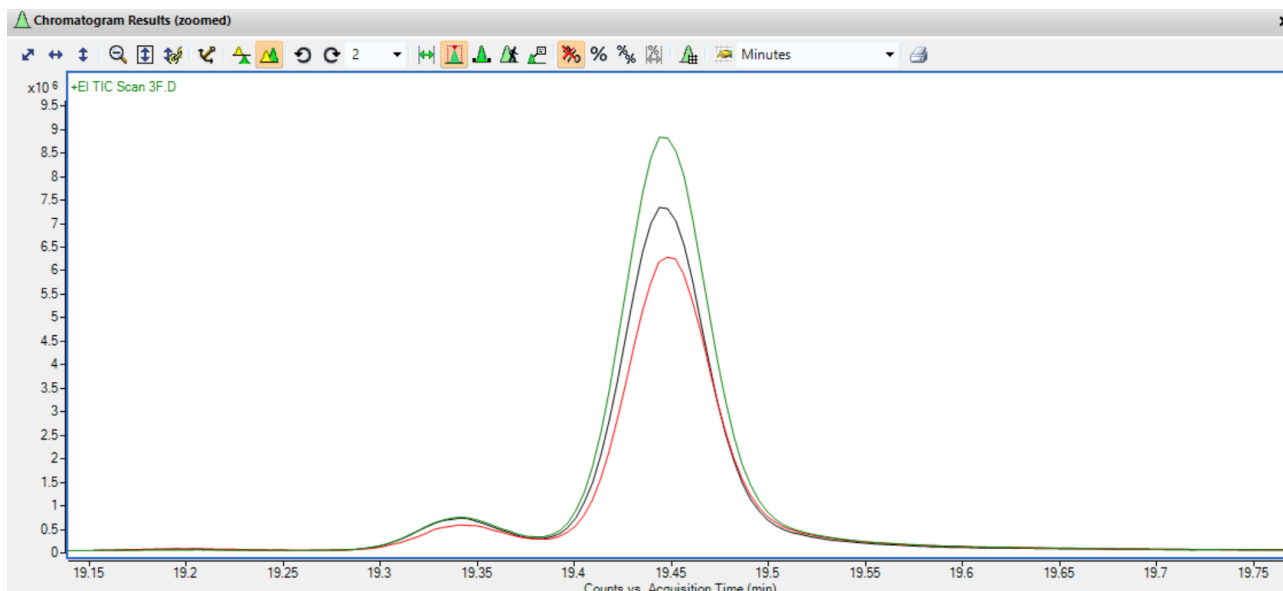


FIGURA 21 SOVRAPPOSIZIONE CROMATOGRAMMI A DIVERSI TEMPI DI INCUBAZIONE, GLV A 30 MIN. (ROSSO),45 MIN. (NERO), 60 MIN. (VERDE).

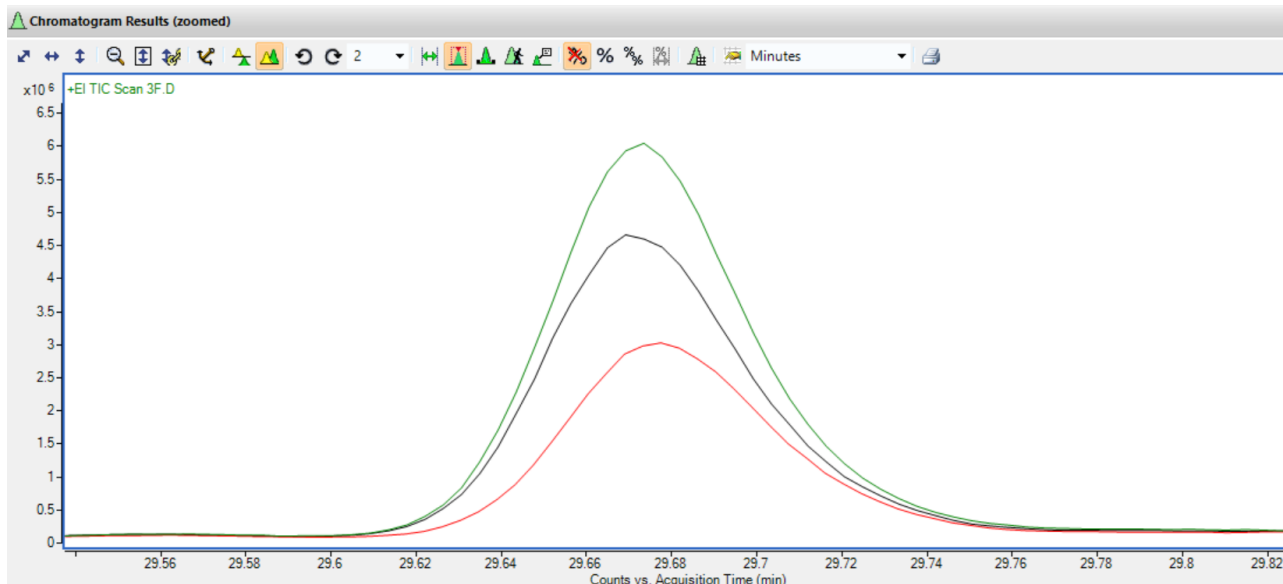


FIGURA 22 SOVRAPPOSIZIONE CROMATOGRAMMI A DIVERSI TEMPI DI INCUBAZIONE, ALCOL BENZILICO A 30 MIN. (ROSSO),45 MIN. (NERO), 60 MIN. (VERDE).

Come mostrato nei cromatogrammi il tempo di incubazione è proporzionale all'intensità dell'area del picco, questo risultato è stato verificato per i GLV e per i Fenoli, composti che sono stati scelti per la loro elevata presenza nelle foglie di vite.

In letteratura si trovano diverse temperature di incubazione che vanno dalla temperatura ambiente fino ai 90°C (Dias et al.,2019). Il criterio seguito per la temperatura è stato quello di portarla più in alto possibile considerando due limiti importanti, ovvero, evitare la degradazione dei volatili di interesse e limitare l'evaporazione dell'acqua dalle foglie che poi sarebbe finita nel sistema causando problemi strumentali e analitici.

Per il tempo di incubazione di 30 min. si riescono comunque ad apprezzare tutti i segnali, anche se con un'intensità proporzionalmente minore.

Quindi il giusto compromesso tra tempo di analisi e segnale strumentale si è deciso di eseguire un'incubazione di 30min. alla temperatura di 60°C

Desorbimento probe:

Per il tempo, la temperatura e il flusso di desorbimento si è deciso di mantenere le condizioni costanti indicate nelle tabelle soprastanti sia in fase di sviluppo metodo che durante l'esperimento, in quanto, facendo dei bianchi successivi alle analisi si è notato che nulla veniva trattenuto, e nemmeno lungo la durata delle prove sequenziali si è osservato un aumento di segnale da possibili accumuli. Tali parametri, quindi, erano idonei ad assicurare l'assenza di effetti memoria.

Perciò il desorbimento della fibra è stato mantenuto sempre a 250°C per 10 min. a flusso costante di 50 ml/min.

Adsorbimento sulla trappola di criofocalizzazione:

L'adsorbimento in trappola del flusso proveniente dal desorbimento del probe è stato uno dei parametri chiave da ottimizzare.

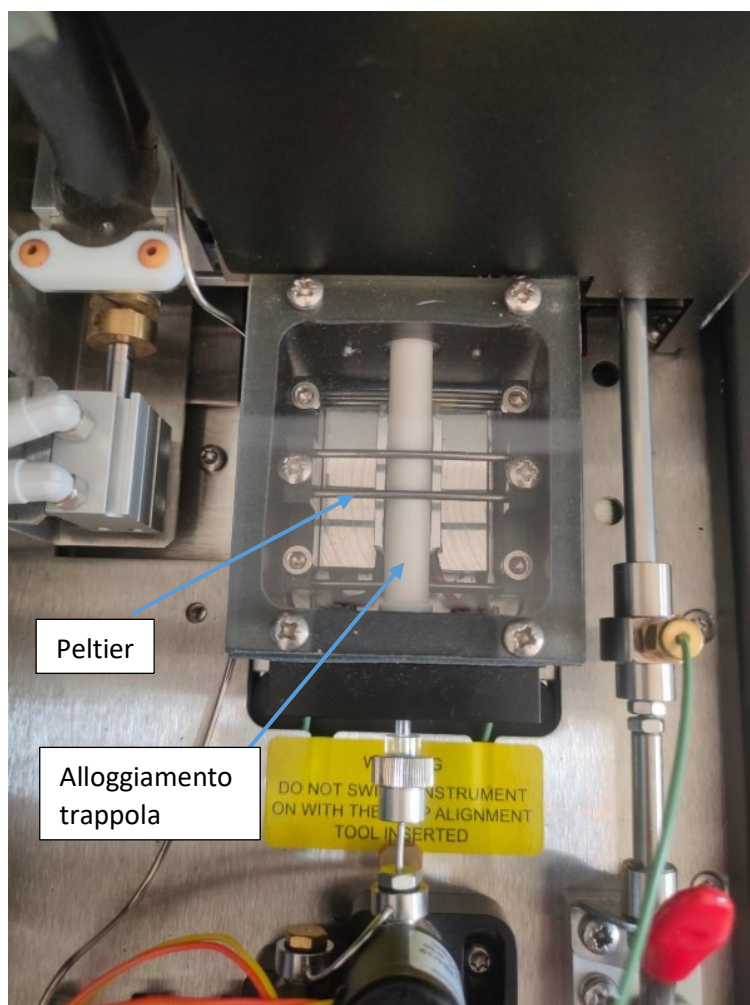


FIGURA 23 CELLA PELTIER E ALLOGGIAMENTO TRAPPOLA.

Nella trappola avviene la criofocalizzazione, ovvero la concentrazione degli analiti di interesse a seconda di tre parametri:

- Il riempimento
- La temperatura
- Il flusso di splittaggio

Per il primo parametro si rimanda al paragrafo precedente [Trappola](#), per quanto riguarda la temperatura, il limite inferiore dichiarato dal produttore è di -30°C .

Inizialmente si è optato per una temperatura di circa 10 °C ossia appena al di sotto di quella ambientale, criofocalizzando così a 10 °C. Ciò serviva a capire diversi aspetti, come la risposta strumentale e l'intensità del segnale.

Nelle fasi iniziali del progetto non si è mai scesi sotto gli 0 °C per una ragione fondamentale, ovvero, non essendo liofilizzate le foglie contenevano molta acqua, problema che dal punto di vista analitico è stato risolto come indicato nel paragrafo [Parametri MS](#) mentre dal punto di vista strumentale poteva risultare un problema in quanto se si fosse adsorbita acqua in trappola a temperature al di sotto degli 0°C sarebbe potuta congelare e quindi espandendosi avrebbe rotto il quarzo di cui è costituito il corpo, dato il basso coefficiente di espansione di questo materiale.

In fase di sviluppo metodo, per evitare il precedente problema, si è optato per due possibili soluzioni a questo problema, ovvero, la scelta di una trappola il cui riempimento aiuta la rimozione selettiva dell'acqua e l'inserimento in fase di preparativa dei campioni di Na₂SO₄ anidro il quale, essendo igroscopico, elimina o aiuta ad eliminare l'acqua presente nei campioni che vengono scongelati in fase di incubazione.

Grazie alle accortezze sopracitate si è arrivati fino alla temperatura di criofocalizzazione di -5°C, un'ulteriore osservazione è il fatto che l'eventuale acqua che passa all'interno della trappola non è stazionaria bensì è un flusso, fattore che ne diminuisce il tempo di contatto.

Il flusso di splittaggio della trappola nel corso delle prove è stato oculatamente diminuito da 50:1, fino ad arrivare ad uno splittaggio di 15:1 aumentando sensibilmente la risposta strumentale, sfortunatamente non si è potuto né eliminare né scendere al di sotto di questo valore per la conformazione strumentale; infatti, al di sotto di questo valore, per effetto Venturi sarebbe entrata aria attraverso lo split vent.

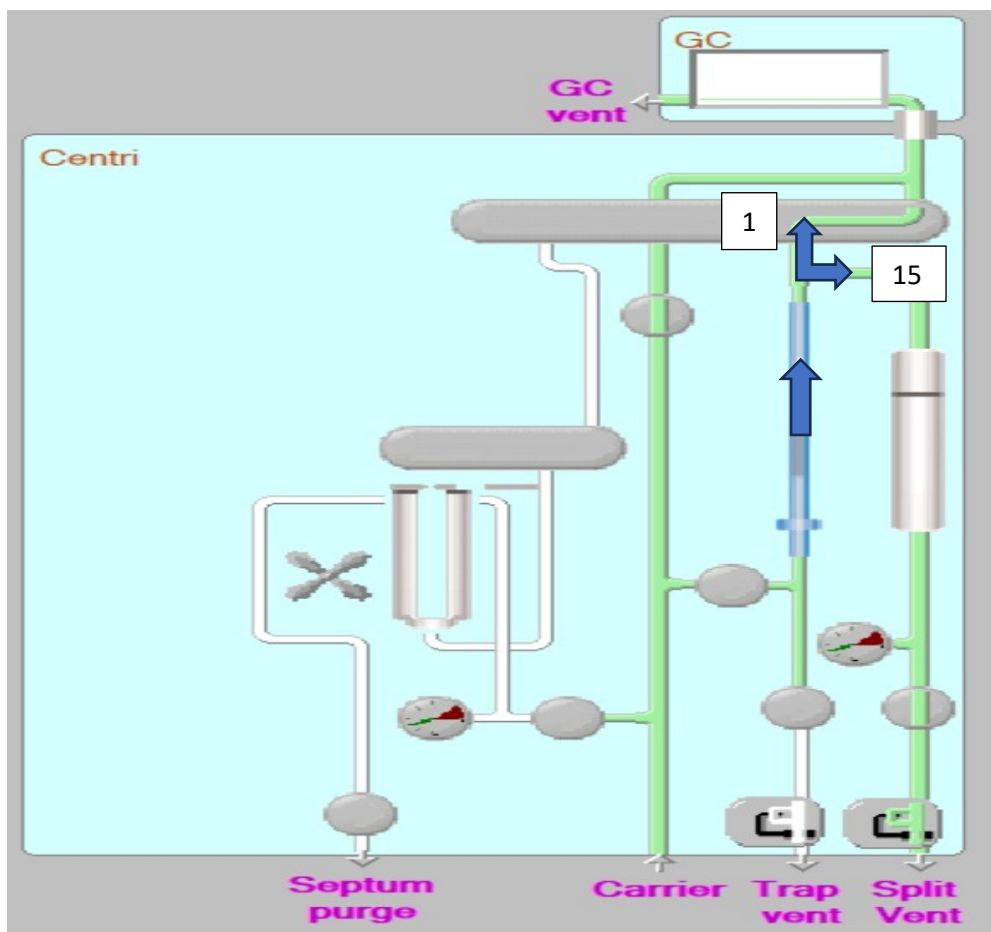


FIGURA 24 SPLITTAGGIO TRAPPOLA IN FASE DI DESORBIMENTO VERSO IL GC.

Desorbimento della trappola:

Il desorbimento della trappola non è altro che un gradiente di temperatura applicato alla trappola, che di fatto può anche essere considerato esso stesso un flash termico.

È molto importante dal punto di vista di risoluzione del cromatogramma, inquanto maggiore sarà la velocità di desorbimento maggiore sarà la risoluzione dei picchi.

La velocità del gradiente può essere decisa in funzione dell'analisi svolta, per questo motivo si è deciso di optare per la massima velocità di desorbimento, ovvero $\approx 100^\circ\text{C/s}$ e poi continuare il desorbimento per altri 3 minuti così da desorbire anche gli analiti più pesanti e consequenzialmente preparare la trappola per la nuova analisi. Attraverso l'acquisizione di bianchi successivi ai

campioni di prova si è potuto dimostrare che la trappola non presenta effetti di memoria per i composti di interesse.

Transfer-line:

La transfer line non è altro che un capillare, tipo colonna cromatografica ma senza fase stazionaria e con un rivestimento inerte lungo la superficie interna, coibentato e termostato, che mette in collegamento il TD con il GC.

La temperatura della transfer-line è stata mantenuta a 170 °C. Poteva essere aumentata per evitare eventuali condensazioni di composti più alto bollenti all'interno della stessa, ma considerata la scarsa affinità delle pareti e la velocità di flusso e le classi di composti prese in esame, si è preferito rimanere a 170 °C così da non danneggiare il componente che risulta essere più fragile rispetto ad una colonna capillare normale.



FIGURA 25 TRANSFER LINE IN USCITA DAL TD (IN ALTO NELLA FIGURA) E IN INGRESSO NEL BACK INLET DEL GC (IN BASSO NELLA FIGURA).

3.1.5. Parametri GC

I parametri principali del gascromatografo in questa configurazione impostabili sono:

- Temperatura
- Tempi
- Flussi
- Condizionamenti di sistema

I parametri, che corrispondono al metodo cromatografico, sono stati ottimizzati partendo con il testare i metodi presenti in letteratura, quindi con un tempo di analisi (per quanto concerne il gascromatografo) di 1 ora circa mantenendo un gradiente fisso di temperatura, 5°C/min., dai 40°C fino ai 280°C così da avere uno screening iniziale di risposta strumentale.

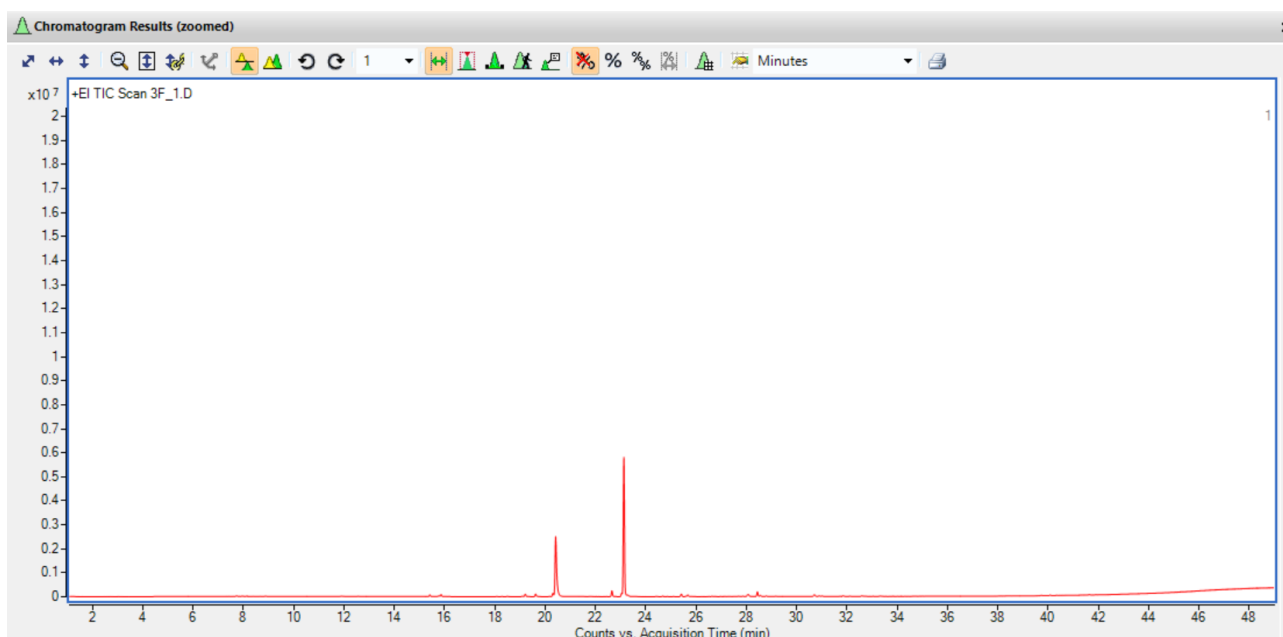


FIGURA 26 CROMATOGRAMMA CON DURATA CORSA SIMILE ALLA LETTERATURA.

Come si nota dal cromatogramma la corsa inizialmente presentava una durata eccessiva e uno scarso segnale da parte degli analiti e riscaldando il cromatogramma verso la fine, dal minuto 44 sarebbe emerso un eccessivo bleeding di colonna rispetto al segnale ottenuto.

Successivamente, con questo sistema, tra i valori ottimizzabili troviamo le rampe di temperatura; quindi, attraverso un calcolatore cromatografico si è associata una temperatura al tempo di ritenzione degli analiti di interesse, così si sono potuti creare dopo svariate prove due gradienti:

- 6°C/min. da 40 °C a 190 °C : gradiente lento per la migliore separazione degli analiti più presenti
- 15°C/min. da 190 °C a 270°C: gradiente più veloce in quanto zona termica dove la quantità di composti eluiti non risultava essere eccessiva

All'inizio e alla fine di ogni intervallo è stato deciso di aggiungere un holdup time così da lasciare il tempo allo strumento di stabilizzare le temperature e di far eluire i componenti.

Dalla tabella presente nel paragrafo [Parametri strumentali GC-MS](#) è possibile notare come la temperatura iniziale sia di 40 °C. Inizialmente è stata testata una temperatura di 35 °C, per verificare la presenza di composti molto leggeri il cromatogramma è stato riscaldato aumentando di tre ordini di grandezza rispetto agli altri cromatogrammi come si può vedere in Figura 27.

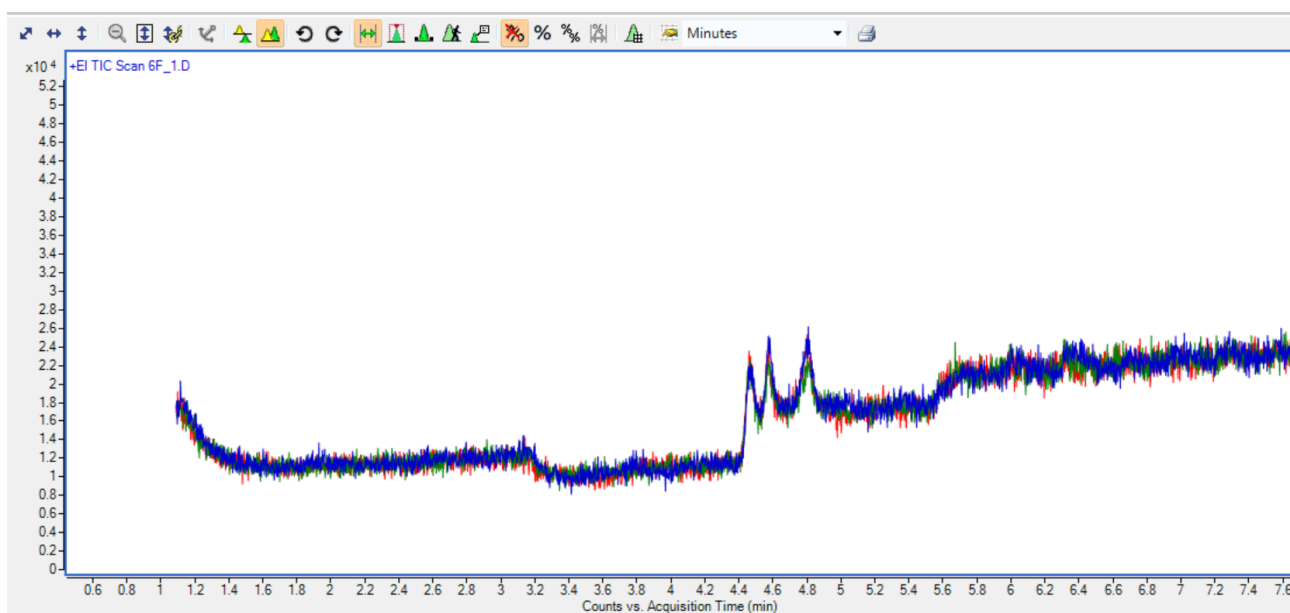


FIGURA 27 SOVRAPPOSIZIONE CROMATOGRAMMI INGRANDITI, PER LA VERIFICA DELLA PRESENZA DI COMPOSTI LEGGERI.

Una volta determinata la loro assenza, riscaldando di tre ordini di grandezza il segnale, si è potuta portare la temperatura iniziale del forno a 40 °C migliorando sensibilmente il tempo nel quale il sistema passava da uno stato di pre-run a ready, passando dai circa 20 min a 7 min.

Successivamente in base all'ultima temperatura raggiunta lungo la corsa cromatografica è stata impostata una temperatura di post-run di 10 °C superiore così da eliminare eventuali composti ancora ritenuti, e calcolando il volume della colonna e sommandolo a quello della transfer line, si è impostato un flusso maggiore rispetto a quello di analisi (1.2 mL/min.) per un tempo di 2 min così da essere sicuri di non avere contaminazioni tra una corsa e l'altra. Ciò è stato successivamente confermato dai bianchi di sequenza successivi.

3.1.6. Parametri MS

Lo spettrometro di massa è uno strumento molto potente e versatile in ambito analitico, per questo si è cercato di dare un approccio più conservativo negli altri due sistemi così da limitare la quantità di possibili interferenti e, da poter ottenere dei risultati più intensi senza rinunciare eccessivamente al rapporto segnale/rumore.

Range m/z:

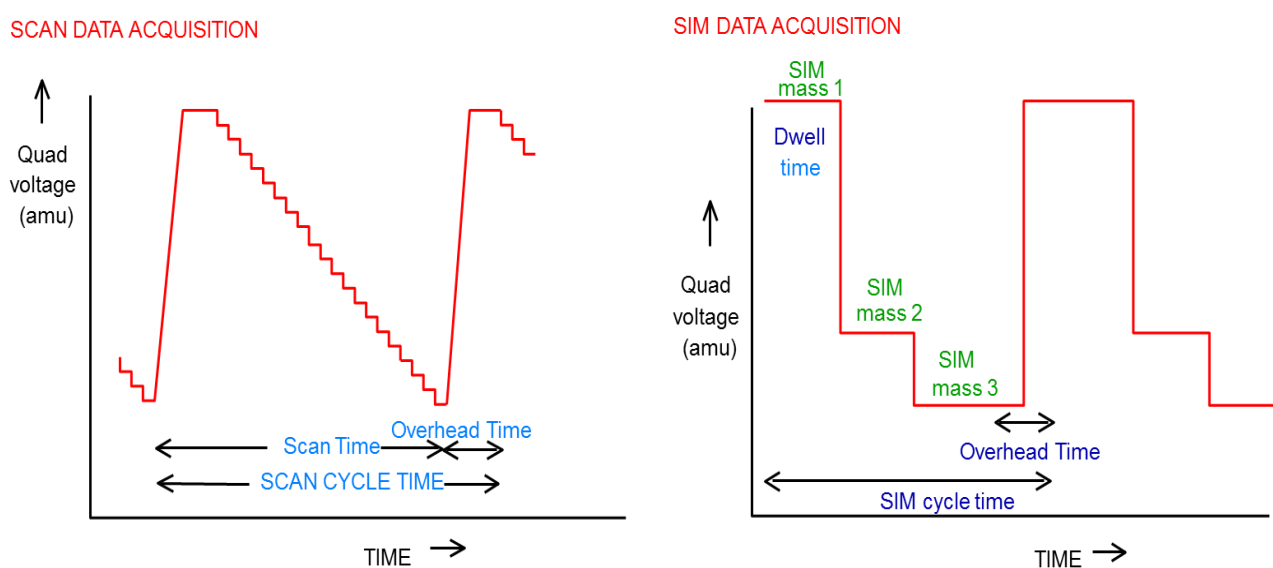


FIGURA 28 MODALITÀ DI ACQUISIZIONE SCAN (SINISTRA) E SIM (DESTRA).

Conoscendo anche questo aspetto dello strumento è possibile ottimizzare la risposta sfruttando la sua potenza, restringendo il range delle masse quanto più possibile, in quanto la grandezza del range è inversamente proporzionale al tempo che il quadrupolo passa a selezionare una determinata massa, ottenendo così, dopo aver individuato i composti trovati nelle analisi e in letteratura il range di massa minore possibile, che per quanto concerne questa analisi è stato di 35-400 m/z, il limite superiore è volutamente più alto di quanto necessario per individuare eventuali composti non considerati nelle analisi preliminari.

Solvent delay:

Come anticipato nel paragrafo precedente è stato considerato il volume di colonna e transferline, ciò è stato utile non solo per il calcolo del tempo e il flusso di post-run, ma anche per il solvent delay time, ovvero il tempo che intercorre dall'inizio della corsa cromatografica fino all'accensione del filamento della sorgente. Si è deciso di impostarlo a 2 min ma ad un flusso di 1 mL/min. Ciò porta a due vantaggi: uno analitico, perché tutto quello che rileva il detector corrisponde ai composti eluiti e non ai volumi morti di sistema; ed un altro di tipo strumentale, ovvero l'attivazione ritardata del filamento evita il contatto con il solvente da acceso.

Scan Speed:

Lo scan speed è la velocità che impiega lo strumento ad eseguire le scansioni, risulta essere direttamente proporzionale al numero di scansioni che esegue il sistema per unità di secondo. Come compromesso è stato utilizzare uno scan speed di 2, che corrisponde ad una frequenza di scansione di 3.9 scansioni per secondo. Si sarebbe potuto impostare a valori più bassi per ottenere un maggior numero di scansioni ma ciò avrebbe comportato uno scan cycle time più corto, che di fatto avrebbe reso più ripida la curva e complessivamente diminuito la sensibilità strumentale nei confronti degli analiti target.

Gain factor:

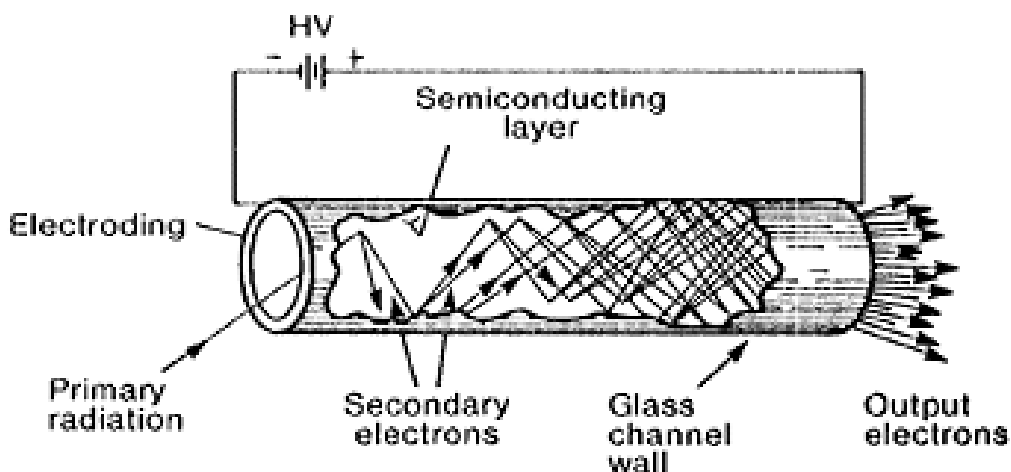


FIGURA 29 SCHEMA ELETTROMOLTIPLICATORE A DINODO CONTINUO.

Il gain factor è quel parametro che a seconda del tipo di analisi può essere modificato e consente di applicare il potenziale desiderato all'elettromoltiplicatore. Il segnale è direttamente proporzionale al potenziale applicato, tuttavia un suo incremento porta ad un aumento del rumore di fondo. Per questa analisi si è deciso di applicare un gain factor di tre e ciò ha portato ad un aumento della tensione dell'elettromoltiplicatore rimanendo largamente sotto i valori soglia consentiti al fine di non usurare il sistema.

3.2. Messa a punto dei metodi

La messa a punto del metodo è stata svolta in varie fasi. Inizialmente sono stati risolti dei problemi relativi all'approccio strumentale, in quanto ad oggi (2023) lo strumento Centri 360 della Markes International è presente solo in due esemplari in Italia e in letteratura ci sono pochissime informazioni a riguardo.

Dopo aver eseguito dei corsi specifici sulla parte software e hardware sono state testate varie componentistiche; infatti, attraverso il cambio di configurazione si possono utilizzare diverse tecniche analitiche.

Inizialmente, per approcciare alla tecnica proprietaria del produttore, sono state fatte delle prove con il tool HiSorb™ con del materiale vegetale (1000-2000 mg) noto per l'emissione di VOC come bucce di mandarini e piante aromatiche. Da subito si è notato l'elevata capacità di assorbimento dei probe; infatti, alcuni composti come il limonene rimanevano anche nei cromatogrammi dei bianchi successivi ai campioni, ciò portava a dei condizionamenti multipli prima di ogni analisi e per questo si è deciso di diminuire il quantitativo di campione.

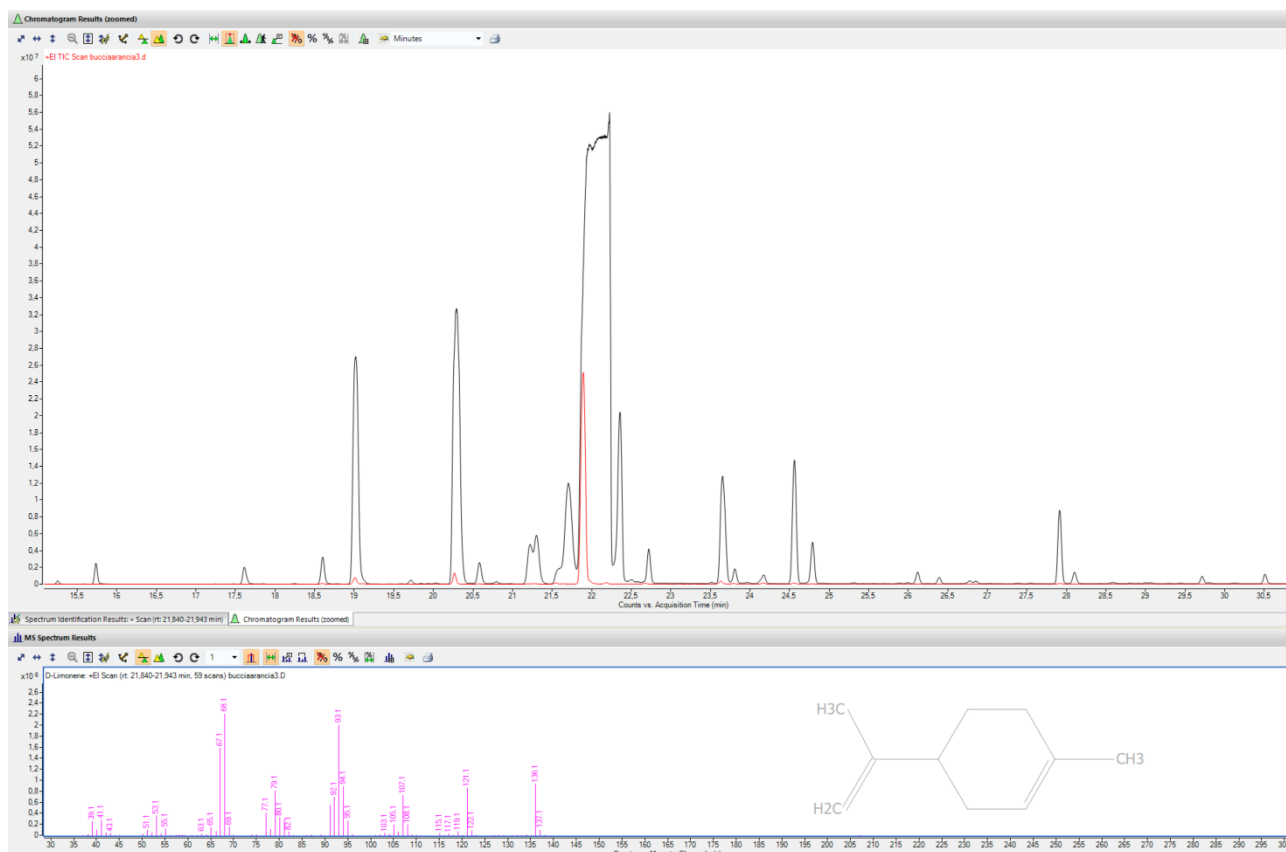


FIGURA 30 SOVRAPPONIMENTO CROMATOGRAMMA OTTENUTO CON HiSORB, 1000MG BUCCIA DI ARANCIA (NERO) E SUCCESSIVO BIANCO (ROSSO).

Come si può notare dai cromatogrammi sovrapposti il segnale del limonene nel cromatogramma nero risulta saturato e soprattutto rimane presente anche nell'analisi di bianco successiva al campione.

Montato il tool per la tecnica HS-trap, sono state eseguite delle misure su dei campioni simili a quelli dell'analisi, ovvero foglie di vite, quantitativo dimezzato rispetto a quello presente in letteratura (50mg) (Lazazzara, 2018), ma anche iniettando gradualmente fino a grandi volumi, circa 5 mL, non si riusciva ad ottenere un segnale apprezzabile.

Successivamente è stato provato il sistema HiSorb™ mantenendo invariato il quantitativo e la tipologia di campione. Le analisi preliminari svolte con questo sistema sono state eseguite con la trappola "General Purpose (Hydrophobic)" e i probe costituiti esclusivamente da PDMS.

Cambiando sistema si sono dovute fare delle prove empiriche per quanto concerne i tempi, in quanto la letteratura non presenta metodi simili se non con fibra di tipo SPME tradizionale (Šikuten, 2021), quindi, dopo aver condizionato secondo le istruzioni del produttore, si è deciso di seguire il seguente metodo per il sistema Markes

- Tempo di incubazione: 60 min.
- Temperatura trappola: 0°
- Splittaggio in fase di desorbimento del probe verso la trappola: 50:1
- Splittaggio in fase di desorbimento della trappola verso il cromatografo: 50:1

La diluizione del campione totale, quindi, risultava essere molto elevata. Ciò è stato fatto per controllare la risposta, partendo da un gradiente di concentrazione basso. Tutti gli altri parametri sono rimasti invariati dall'inizio dello sviluppo metodo (vedi tabella metodo e parametri strumentali del termodesorbitore)

Non ottenendo risultati dal punto di vista cromatografico si è deciso di escludere il primo splittaggio, criofoalizzando maggiormente, e di fatto diluendo il campione di 50 volte.

Il metodo del cromatografo e della massa in fase preliminare sono stati impostati adattando i parametri trovati in letteratura (Štambuk et al.) e sono i seguenti:

- Tempo totale corsa cromatografica: 53 min.
- Gradiente di temperatura: 5°C/min da 40°C a 260°C mantenuti per 3 min.

Tutti gli altri parametri, compresi quelli della massa, sono stati modificati nel corso delle analisi preliminari, dando priorità a quelli cromatografici fino ad ottenere il metodo di cui sono riportati i dettagli nella tabella (Metodo e parametri strumentali GC-MS). Le prime modifiche hanno portato ad un tempo totale di analisi di 126 min per ogni campione e hanno fornito i primi risultati.



FIGURA 31 CROMATOGRAMMA GLV, 43 MG FOGLIA DI VITE.

Dal cromatogramma si nota come anche con un'esigua quantità di campione, 43mg, si può comunque ottenere un segnale apprezzabile dei principali GLV.

Una volta individuati i primi analiti sono state ripetute le analisi per testare la rappresentatività dei risultati. Successivamente, al fine di aumentare il segnale, si è optato dapprima per diminuire gradualmente il rapporto di splittaggio con un rapporto minore fino a raggiungere 1:20 e solo successivamente è stato aumentato il quantitativo di foglie nelle vial, arrivando fino a 550 mg. Si è tenuta costantemente monitorata la condizione dei cromatogrammi per non andare incontro a fenomeni come cross contamination o accumulo di composti sul probe.

Una volta trovato indicativamente il pool di composti, è stata ottimizzata la corsa cromatografica ad un gradiente con hold time concentrandosi in un range di temperatura che va dai 40°C ai 190°C dove si trovano i composti di maggior interesse.

Infine, è stato definito il metodo finale, dove si tiene conto della scarsa presenza di VOC ad alte temperature, creando quindi i due gradienti presenti nella tabella sopracitata che consentono, per quanto possibile con la colonna a disposizione di raggiungere uno dei quattro obiettivi principali dell'ottimizzazione del metodo cromatografico:

- Risolvere il cromatogramma quanto più possibile
- Diminuzione del tempo d'analisi rispetto a quanto già presente in letteratura
- Massimizzazione della risposta strumentale
- Salvaguardia del sistema TD-GC-MS³

Svolgendo anche dei corsi di formazione specifici inerenti alla GC-MS sia software che hardware, con l'azienda DTOLabs di Spinea (VE), è stato possibile ottimizzare i parametri della massa sfruttando a pieno la potenza strumentale senza compromettere le parti più sensibili come sorgente, quadrupolo ed elettromoltiplicatore, ottenendo quindi un incremento di limiti di rilevabilità mai raggiunti fino a quel punto del progetto.

³ Si sarebbero potuti ottenere dei risultati lievemente migliori ad un costo proporzionalmente più alto, ma è stato posto tra gli obiettivi principali lo sviluppo di un metodo che tenga conto considerevolmente della longevità dei consumabili strumentali e le parti più sensibili dei sistemi senza rinunciare alla risposta strumentale.

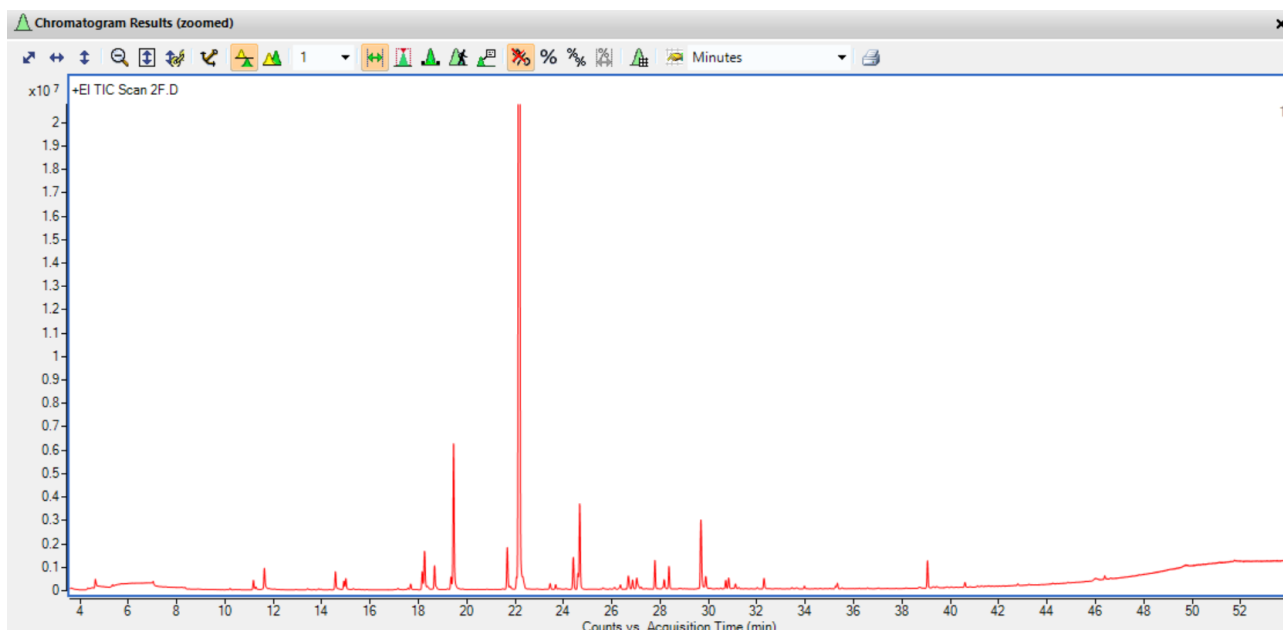


FIGURA 32 CROMATOGRAMMA FOGLIE ACQUISITO CON METODO NON OTTIMIZZATO, 0.588 MG DI FOGLIE.

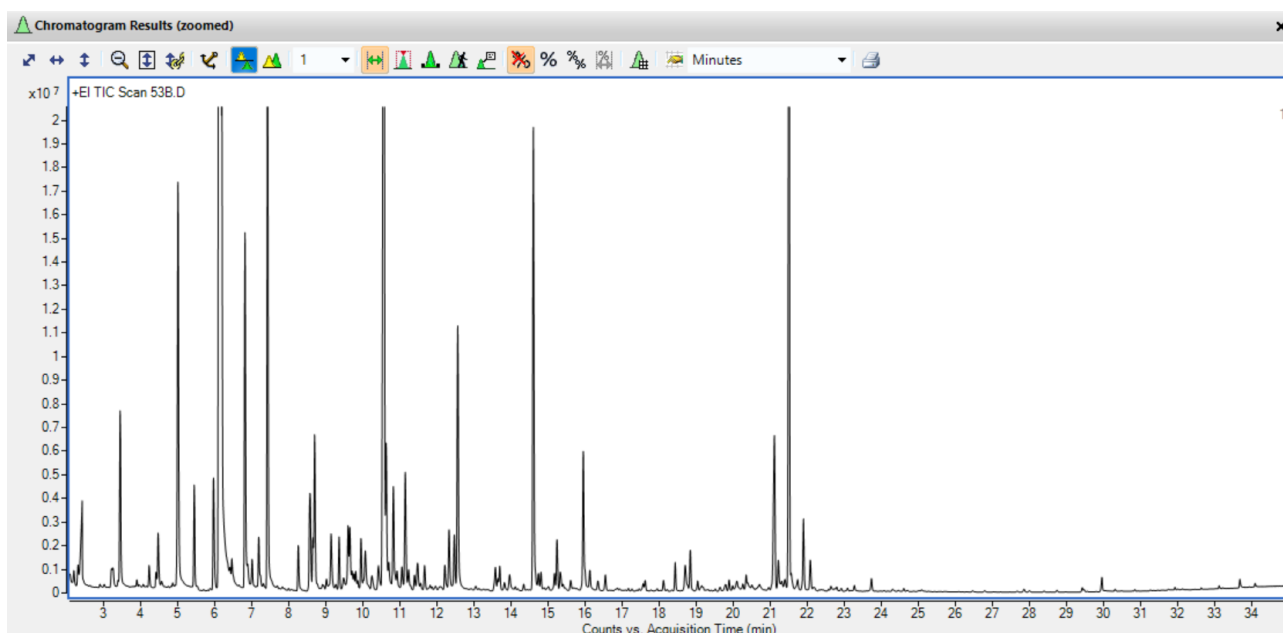


FIGURA 33 CROMATOGRAMMA FOGLIE ACQUISITO CON METODO OTTIMIZZATO, 0.331MG DI FOGLIE.

Come evidenziato dai due cromatogrammi, in rosso prima dell'ottimizzazione dei metodi, in nero con i metodi ottimizzati, il segnale raccolto è molto più intenso pur riducendo il quantitativo di campione analizzato di più 200mg e il tempo di analisi di circa 20 min, tutto ciò a costo di una più bassa risoluzione che comunque non ha inficiato la corretta identificazione dei composti.

Come già anticipato nei paragrafi precedenti una problematica molto importante di questa tipologia di tecnica è l'impossibilità di fare delle ripetute con la stessa vial; quindi, prima di passare all'analisi con i campioni raccolti dalla Fondazione Edmund Mach, è stato valutato oculatamente ogni parametro data anche l'esigua quantità di campione a disposizione⁴.

Di seguito vengono riportati i principali composti trovati all'interno delle foglie sottoposte a stress e a quelle di controllo, l'identificazione è stata eseguita tramite la consultazione della libreria NIST17.

Tempo di ritenzione (min.)	Nome	CAS	Score ⁵	Classe di appartenenza
3.44	Furan, 2-ethyl-	3208-16-0	Vero	Furani
3.88	1-Butanol, 3-methyl-	123-51-3	Vero	Alcoli alifatici
3.94	1-Butanol, 2-methyl-	137-32-6	Vero	Alcoli alifatici
4.22	2-Pental, (E)-	1576-87-0	Vero	GLV
4.43	Toluene	108-88-3	Vero	Idrocarburi ⁶
4.47	2-Penten-1-ol, (Z)-	1576-95-0	Vero	Alcoli alifatici
5.00	Hexanal	66-25-1	Vero	GLV
5.44	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	541-05-9	Vero	Silossani ⁷
5.96	Unknown 5.96	Unknown	Falso	Unknown
6.21	2-Hexenal	505-57-8	Vero	GLV
6.34	Ethylbenzene	100-41-4	Vero	Idrocarburi
6.49	1-Cycloocten-5-yne, (Z)-	66633-23-6	Vero	Idrocarburi

⁴ Di quasi ogni campione è stato conservato un backup in un ultracongelatore a -80°C in F.E.M.

⁵ Vero se ≥ 70%, Falso se non è stato trovato riscontro con la NIST17.

⁶ Usato come standard per monitorare la stabilità dello strumento

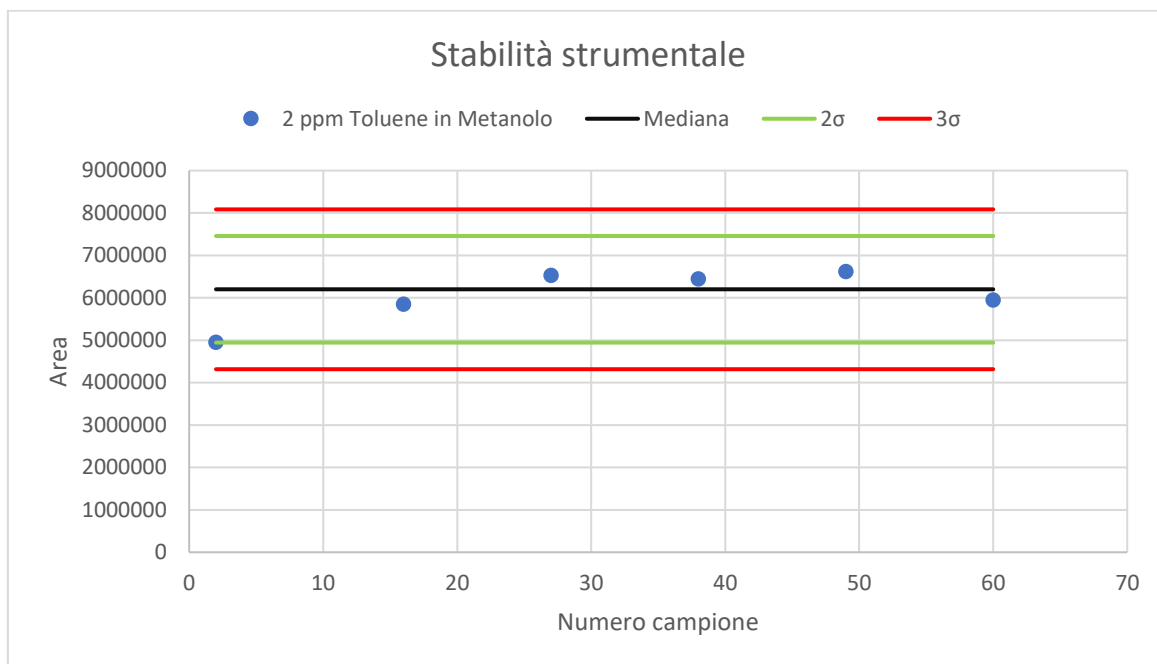
⁷ Costituenti della colonna e/o del probe e/o dei setti microcentrati.

6.82	Cyclohexanol	108-93-0	Vero	Alcoli alifatici
7.18	2-Heptanol	543-49-7	Vero	Alcoli alifatici
7.42	3,4-Heptadiene	2454-31-1	Vero	Idrocarburi
8.25	Unknown 8.25	Unknown	Falso	Unknown
8.69	Benzaldehyde	100-52-7	Vero	Aldeidi
9.35	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	110-93-0	Vero	Chetoni
9.64	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	556-67-2	Vero	Silossani ⁶
9.79	2-Propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)-	20324-32-7	Vero	Alcoli alifatici
10.05	Propane, 1,2-dimethoxy-	7778-85-0	Vero	Idrocarburi
10.54	Benzyl alcohol	100-51-6	Vero	Fenoli
11.14	Unknown 11.14	Unknown	Falso	Unknown
12.20	2-Nonanol	628-99-9	Vero	Alcoli alifatici
12.56	Phenylethyl Alcohol	60-12-8	Vero	Fenoli
14.59	Methyl salicylate	119-36-8	Vero	Esteri
15.94	Geraniol	106-24-1	Vero	Alcoli alifatici
18.33	Eugenol	97-53-0	Vero	Fenoli
18.69	Unknown 18.69	Unknown	Falso	Unknown
18.83	1,2-Oxaborole, 2,3,4-triethyl-2,5-dihydro-5,5-dimethyl-	61142-64-1	Vero	Organoborani
19.78	Caryophyllene	87-44-5	Vero	Sesquiterpeni
19.88	.alpha.-Ionone	127-41-3	Vero	Monoterpeni
20.51	Humulene	6753-98-6	Vero	Sesquiterpeni

21.10	trans-.beta.-Ionone	79-77-6	Vero	Monoterpeni
21.21	cis-.alpha.-Bergamotene	18252-46-5	Vero	Sesquiterpeni
21.49	.alpha.-Farnesene	502-61-4	Vero	Sesquiterpeni
21.89	Unknown 21.89	Unknown	Falso	Unknown
22.07	Dihydroactinidiolide	17092-92-1	Vero	Monoterpeni
22.90	Unknown 22.90	Unknown	Falso	Unknown
23.08	Unknown 23.08	Unknown	Falso	Unknown
23.15	1H-3a,7-Methanoazulene, octahydro-1,4,9,9-tetramethyl-	25491-20-7	Vero	Sesquiterpeni
23.26	Unknown 23.26	Unknown	Falso	Unknown
23.51	Tetradecanal	124-25-4	Vero	Aldeidi
23.72	Unknown 23.72	Unknown	Falso	Unknown

3.3. Controllo strumentale

Dopo lo sviluppo del metodo per l'analisi lo si è applicato a delle vial dello stesso volume di quelle utilizzate per l'analisi contenenti 1 mL di soluzione standard 2ppm di toluene in metanolo per controllare la risposta strumentale lungo il tempo



Come si evince da grafico, lo strumento ha acquisito i dati sempre all'interno del range di errore 2σ , anche la tendenza dei valori risulta accettabile.

3.4. Risultati delle analisi statistiche

Sono state formulate tre tesi, ovvero il confronto tra varie tipologie di condizioni a cui sono state sottoposte le piante:

- WW stress vs WS stress: sono state confrontate le foglie delle viti di controllo (WW) e quelle sottoposte a stress (WS). Le foglie sono state raccolte nel periodo di campionamento dopo due settimane di stress idrico.
- WW post vs WS post: sono state confrontate le foglie delle viti di controllo (WW) e quelle sottoposte a stress (WS). Le foglie sono state raccolte nel periodo di campionamento dopo due settimane di recovery, ovvero ad una normale idratazione dopo lo stress idrico.
- $\frac{WS}{WW}$ stress vs $\frac{WS}{WW}$ post : sono state dapprima eseguite le medie delle ripetute tecniche per ogni varietà e dopo aver fatto il rapporto delle condizioni a cui sono state sottoposte è stato eseguito un confronto tra i periodi di campionamento.

È stato eseguito il t-test per tutti i composti che seguiranno.

N.B. Dopo il nome del composto sono state inserite 4 tipologie di sigle che indicano la significatività statistica: “***” Estremamente significativo ($p < 0.001$), “**” Molto significativo ($p < 0.01$), “*” Significativo ($p < 0.05$), “n.s.” non significativo

Di seguito vengono riportati i boxplot delle tesi per alcuni composti:

Tetradecanal

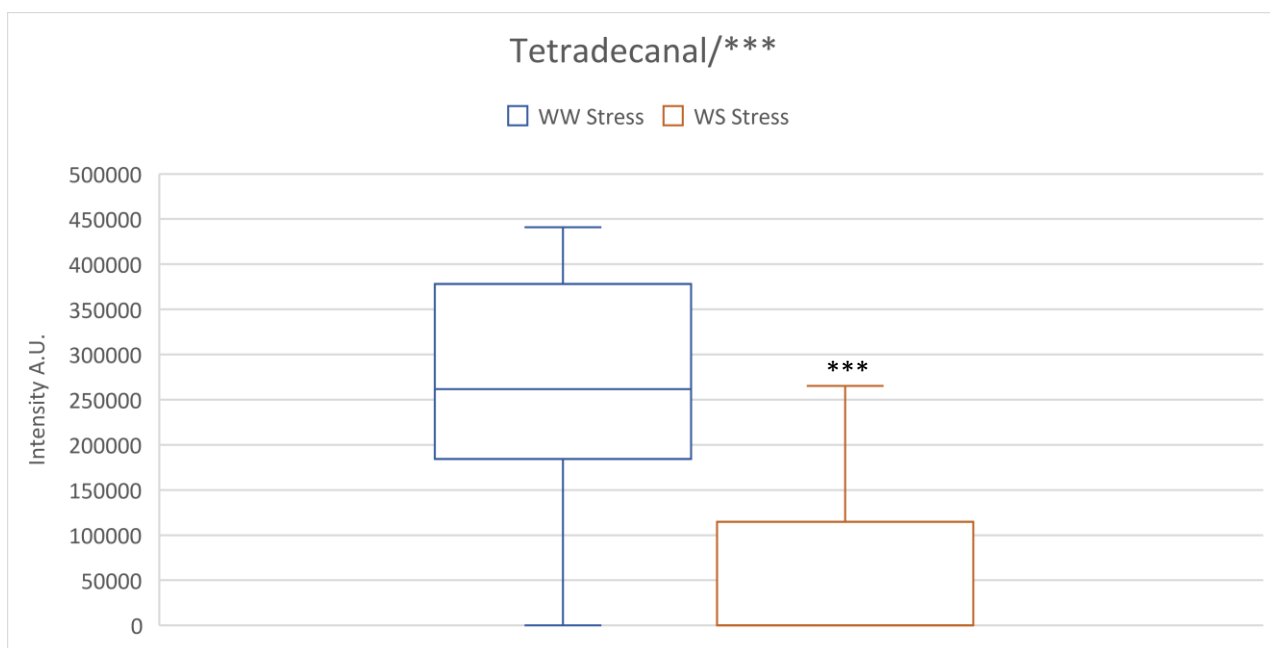


FIGURA 34 EMISSIONE TETRADECANAL IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.



FIGURA 35 EMISSIONE TETRADECANAL IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

Come si nota in Figura 34 l'emissione di Tetradecanal risulta ridotta in condizioni di stress idrico.

Come si nota dalla Figura 35 risulta assente l'emissione di Tetradecanal in fase di recovery.

α -Farnesene

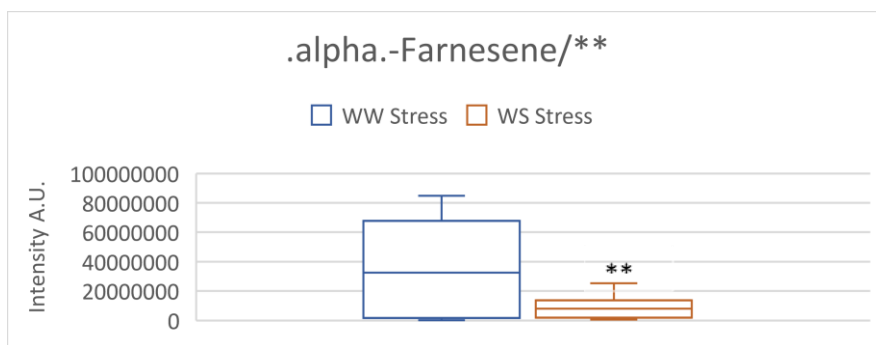


FIGURA 36 EMISSIONE ALPHA-FARNESENE IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

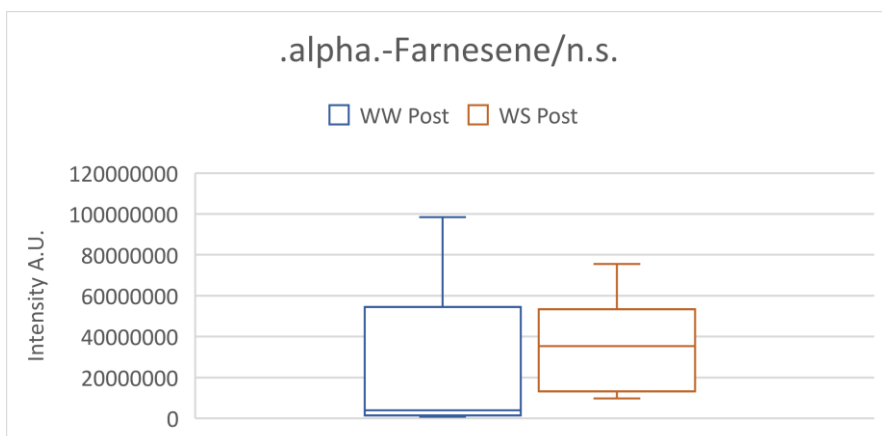


FIGURA 37 EMISSIONE ALPHA-FARNESENE IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.



FIGURA 38 EMISSIONE ALPHA-FARNESENE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS.

Come si nota in Figura 36 l'emissione di α -Farnesene risulta ridotta in condizioni di stress idrico mentre dopo il periodo di recovery l'emissione viene ristabilita.

2-Heptanol

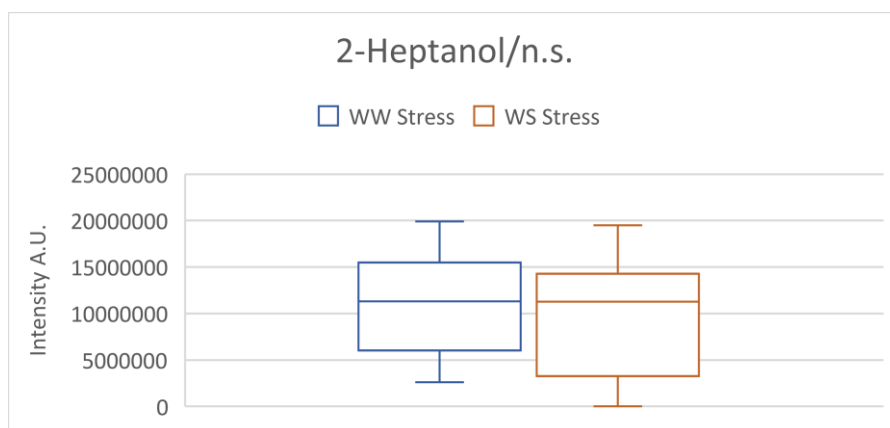


FIGURA 39 EMISSIONE 2-HEPTANOL IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

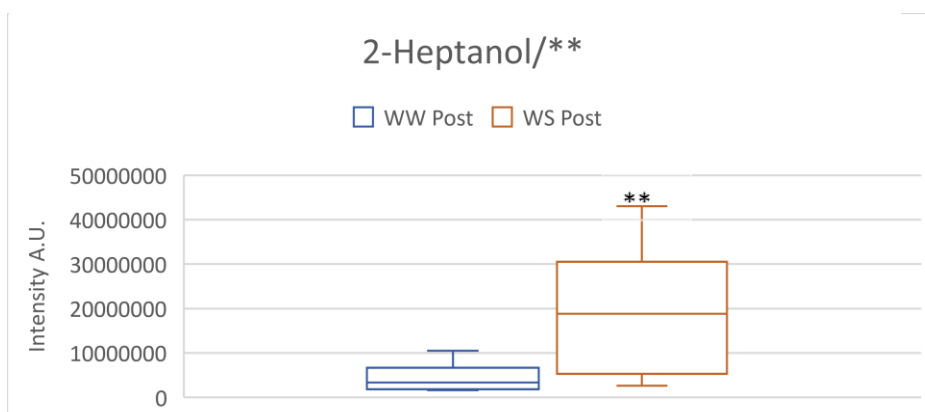


FIGURA 40 EMISSIONE 2-HEPTANOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

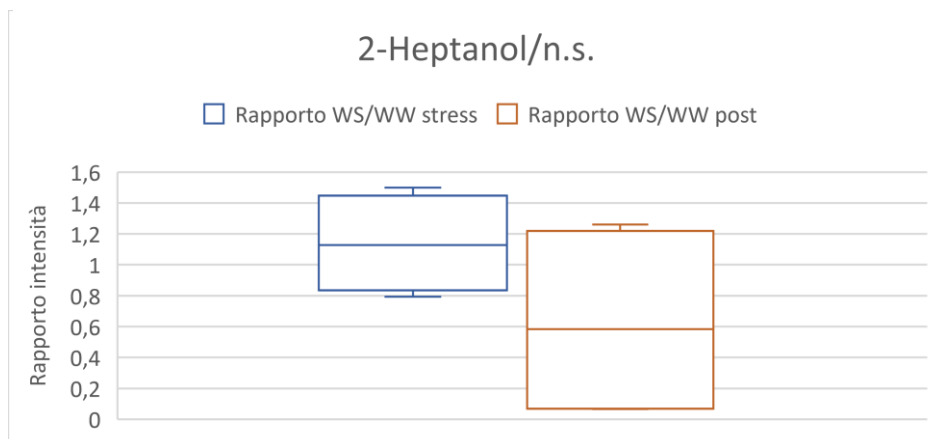


FIGURA 41 EMISSIONE 2-HEPTANOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS.

Come si nota in Figura 40 l'emissione di 2-Heptanol risulta aumentata durante la fase di recovery nelle piante precedentemente sottoposte a stress idrico.

2-Nonanol

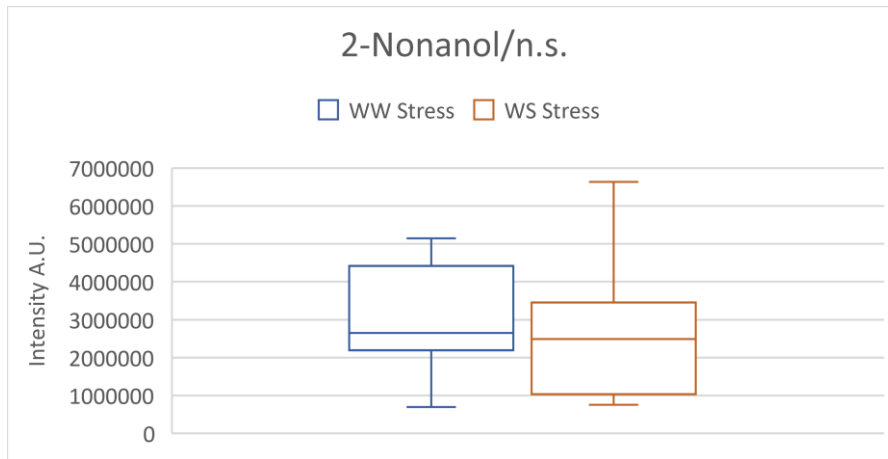


FIGURA 42 EMISSIONE 2-NONANOL IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

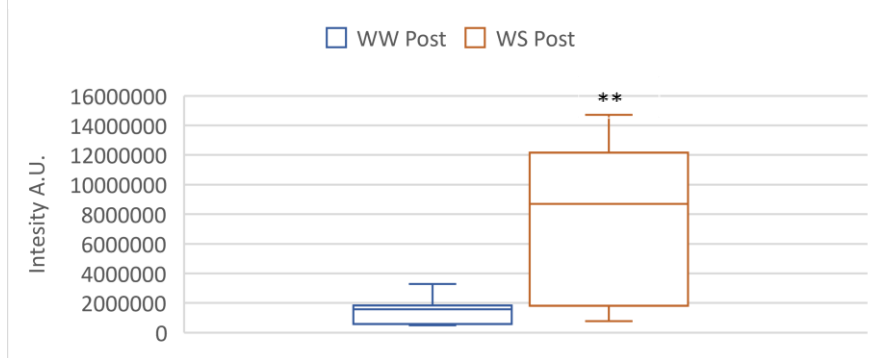


FIGURA 43 EMISSIONE 2-NONANOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

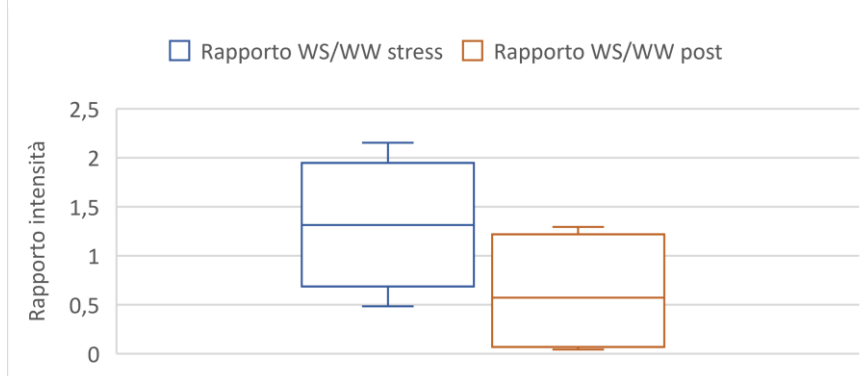


FIGURA 44 EMISSIONE 2-NONANOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS.

Come si nota in Figura 43 l'emissione di 2-Nonanol risulta aumentata durante la fase di recovery nelle piante precedentemente sottoposte a stress idrico.

Unknown 23.26

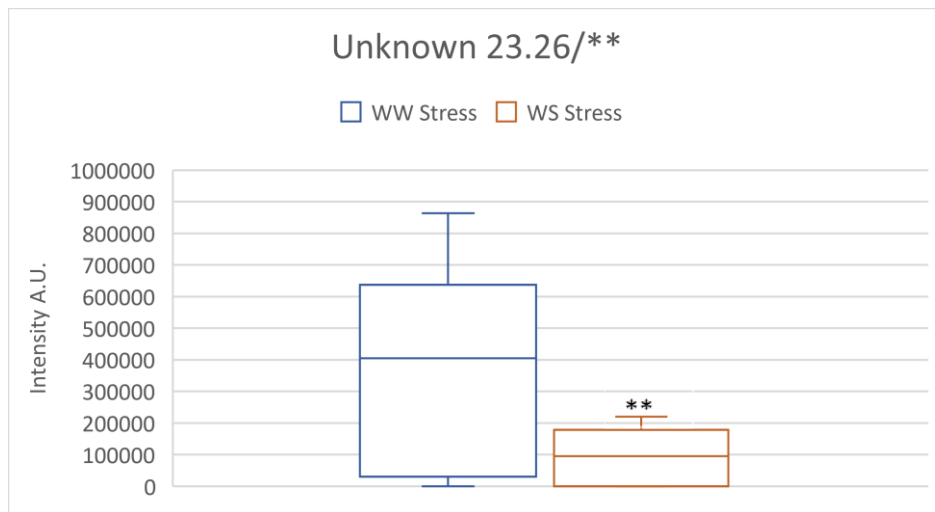


FIGURA 45 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 23.26 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

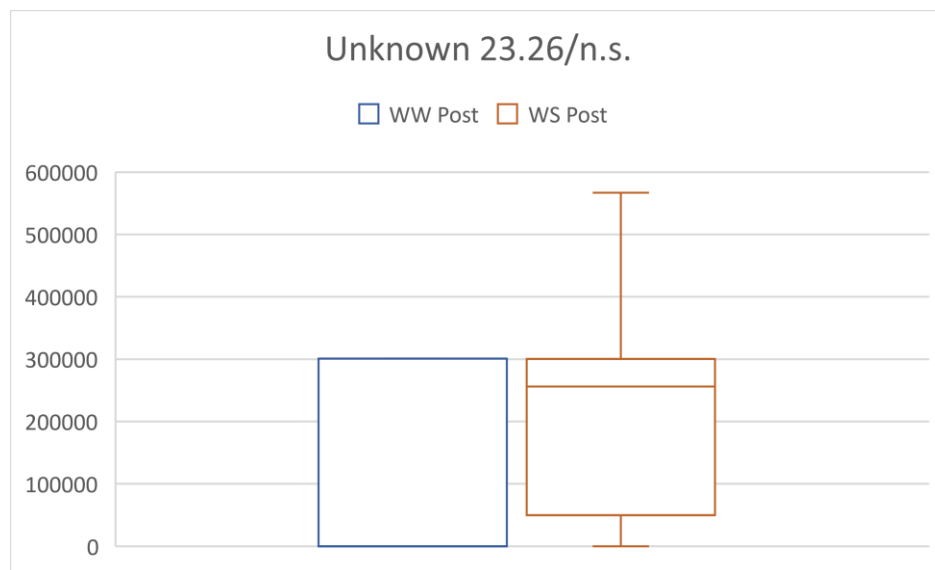


FIGURA 46 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 23.26 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

Come si nota in Figura 45 l'emissione del composto non identificato risulta ridotta in condizioni di stress idrico.

Unknown 23.72

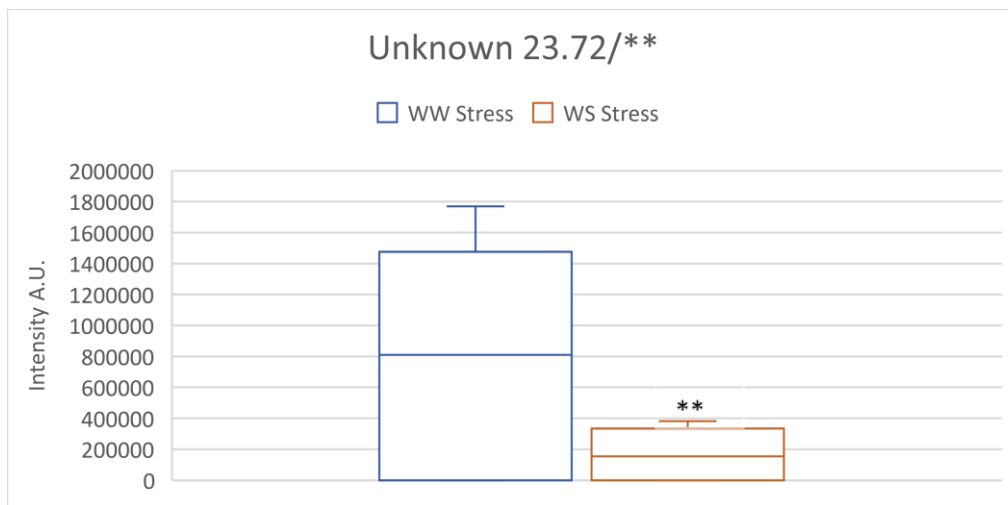


FIGURA 47 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 23.72 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO

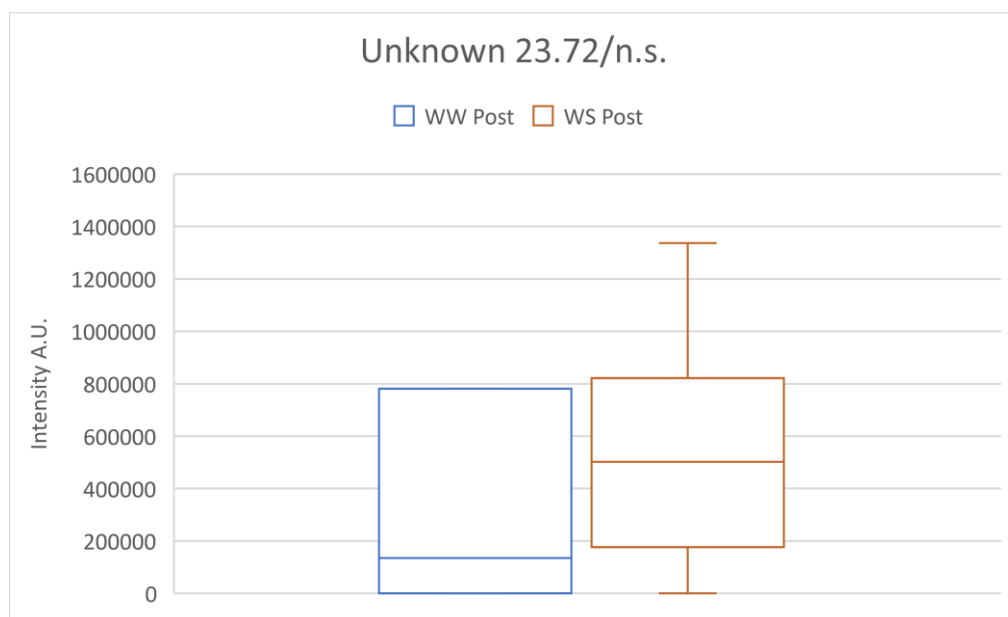


FIGURA 48 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 23.72 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

Come si nota in Figura 47 l'emissione del composto non identificato risulta ridotta in condizioni di stress idrico.

1-Butanol, 2-methyl-

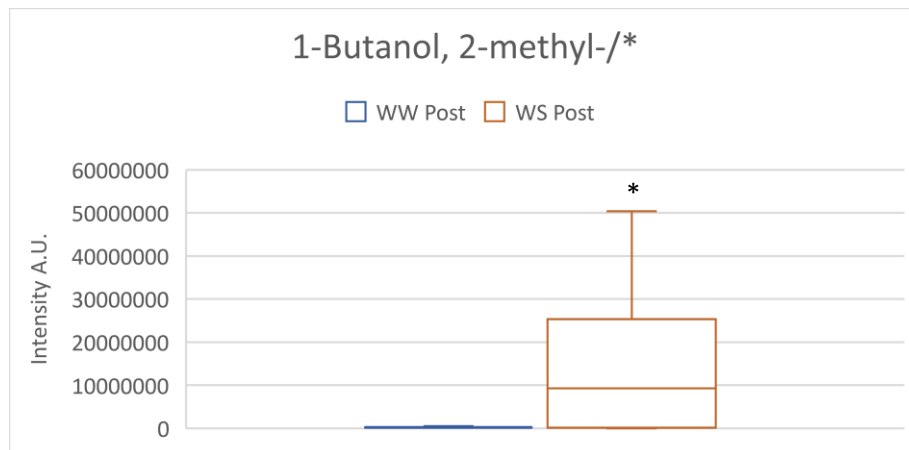


FIGURA 49 EMISSIONE 1-BUTANOL, 2-METHYL IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

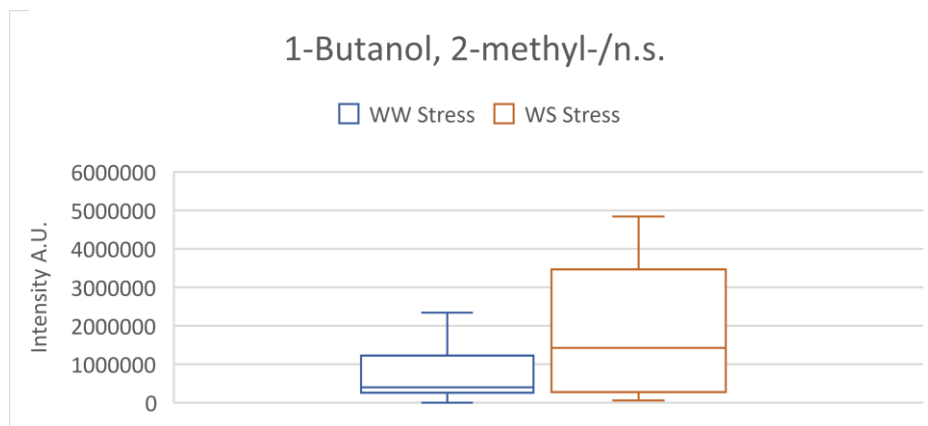


FIGURA 50 EMISSIONE 1-BUTANOL, 2-METHYL IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

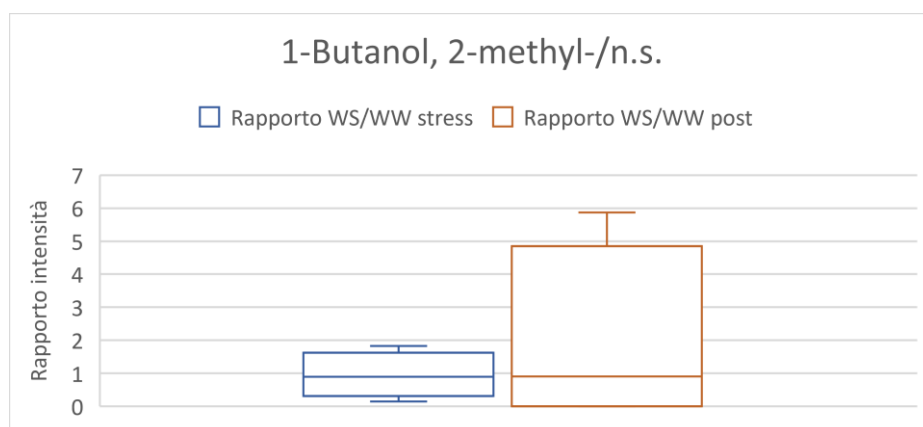


FIGURA 51 EMISSIONE 1-BUTANOL, 2-METHYL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS.

Come si nota in Figura 49 l'emissione di 1-Butanol, 2-methyl- risulta aumentata in condizioni di stress idrico.

1-Butanol, 3-methyl-

1-Butanol, 3-methyl-/n.s.

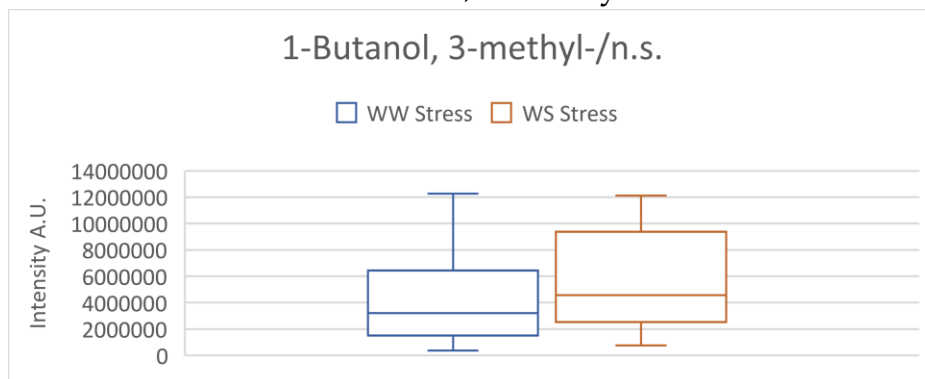


FIGURA 52 EMISSIONE 1-BUTANOL, 3-METHYL IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

1-Butanol, 3-methyl-/*

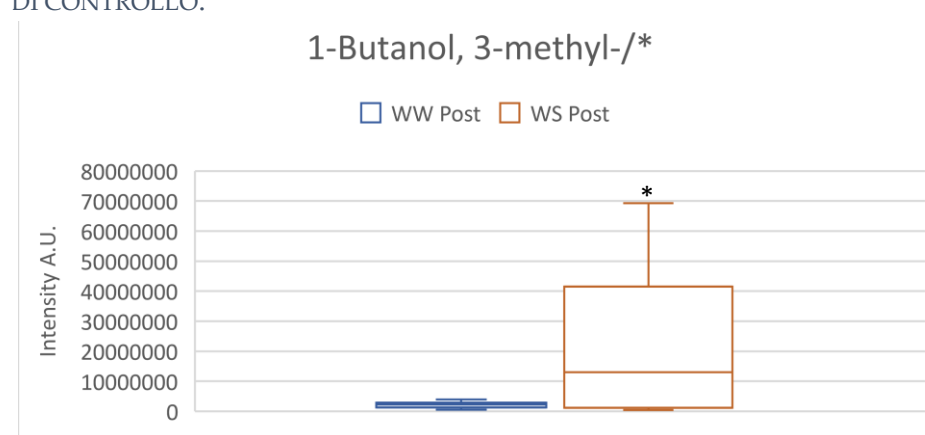


FIGURA 53 EMISSIONE 1-BUTANOL, 3-METHYL IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

1-Butanol, 3-methyl-/n.s.

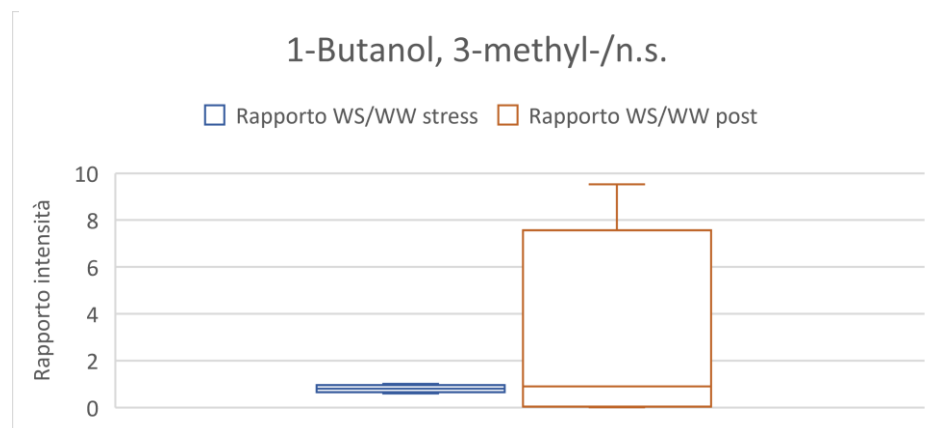


FIGURA 54 EMISSIONE 1-BUTANOL, 3-METHYL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS.

Come si nota in Figura 54 l'emissione di 1-Butanol, 3-methyl- risulta aumentata durante la fase di recovery nelle piante precedentemente sottoposte a stress idrico.

cis- α -Bergamottene

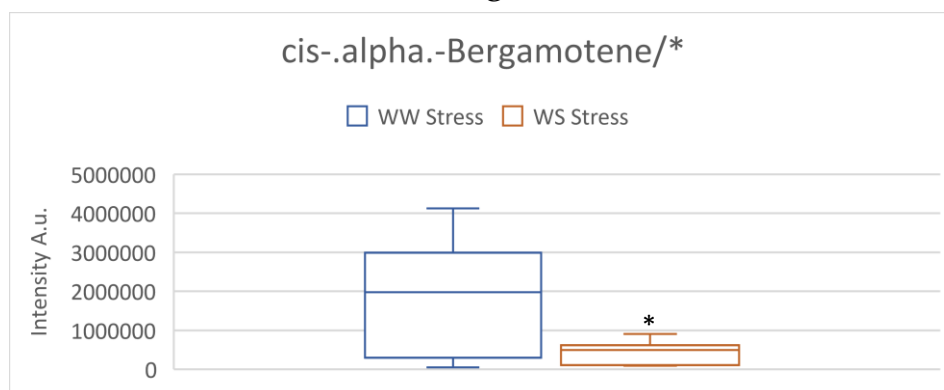


FIGURA 55 EMISSIONE CIS-ALPHA-BERGAMOTTENE IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

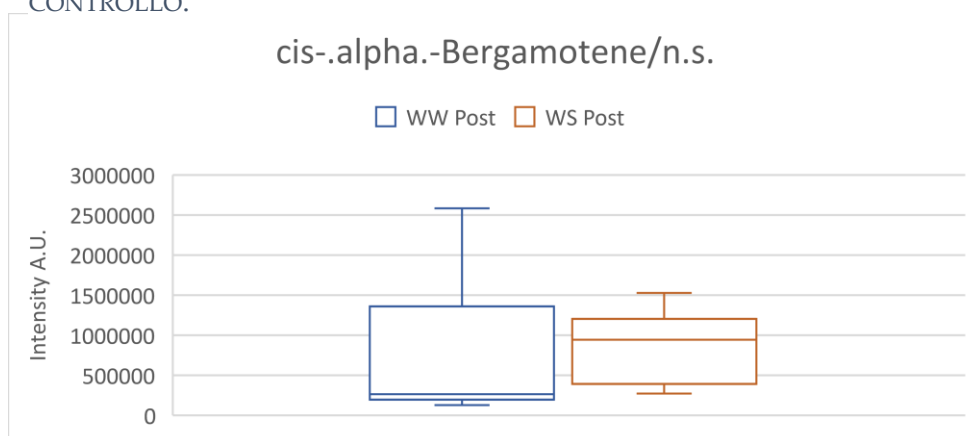


FIGURA 56 EMISSIONE CIS-ALPHA-BERGAMOTTENE IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

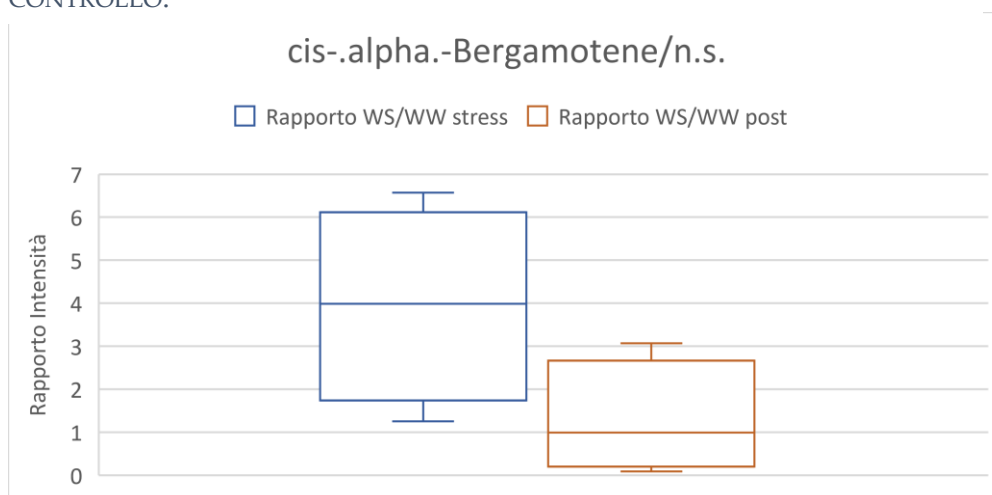


FIGURA 57 EMISSIONE CIS-ALPHA-BERGAMOTTENE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS.

Come si nota dalla Figura 55 l'emissione di *cis- α -Bergamottene* risulta ridotta in condizioni di stress idrico.

Unknown 23.08

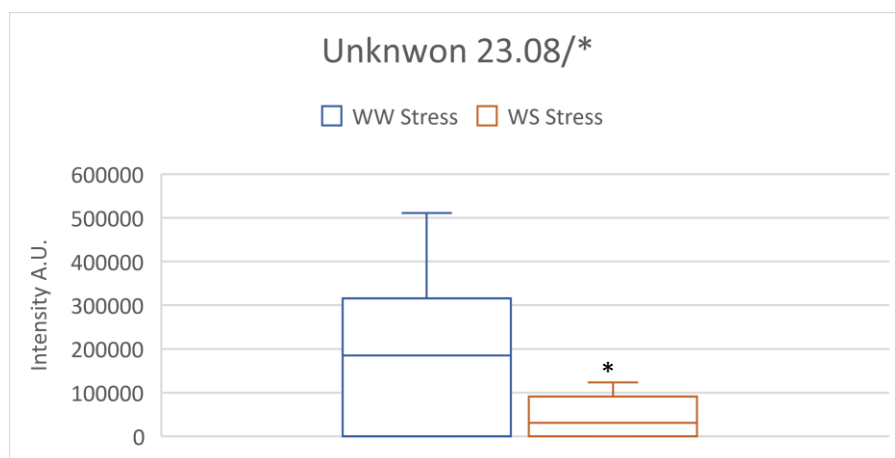


FIGURA 58 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 23.08 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE CONDIZIONE DI STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

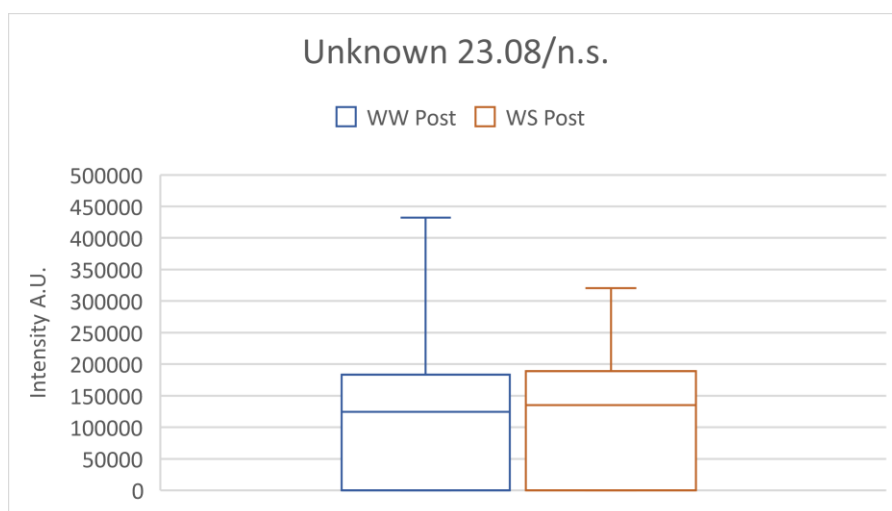


FIGURA 59 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 23.08 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE A RECOVERY DOPO STRESS IDRICO COMPARATO ALL'EMISSIONE DELLE PIANTE DI CONTROLLO.

Come si nota in Figura 59 l'emissione del composto non identificato risulta ridotta in condizioni di stress idrico.

3.5. Comparazione con la letteratura esistente

Da letteratura si evince che alcuni composti, quali: terpeni, sesquiterpeni e alcoli vengano emessi in quantità maggiore quando le piante sono sottoposte a stress idrico (Brilli, 2008). Nell'analisi svolta si osserva generalmente l'effetto contrario per i campioni sottoposti a stress, eccezion fatta per il 2-metil-1-Butanolo, il quale non risulta presente nelle foglie di controllo mentre emerge in quelle sottoposte a stress. In particolare, sesquiterpeni, quali *cis- α -bergamotene* e *α -farnesene*, e aldeidi, quali il tetradecanale, sono presenti in concentrazioni minori nelle foglie sottoposte a stress.

Si osserva d'altro canto, un aumento di alcuni dei composti sopracitati nelle piante sottoposte a stress dopo un periodo di recovery, ciò potrebbe confermare quanto emerso da un recente studio sui VOC emessi dalle piante in condizione di stress, ovvero che la produzione dei VOC possa essere alterata nel periodo successivo ad uno stress (Midzi, 2022). Infatti 2-eptanolo, 2-nonanolo, 3-metil-1-butanolo risultano essere emessi in quantità significativamente maggiori dopo la fase di recovery da parte delle piante sottoposte a stress idrico

3.6. Prospettive future

Obiettivi da raggiungere nel prosieguo dell'esperimento:

- Aumentare la risoluzione cromatografica di più del 100% rispetto all'attuale metodo
- Aumentare la risposta strumentale di più del 100% rispetto all'attuale metodo
- Aumentare la quantità di composti individuabili
- Aumentare lo score generale dei composti di più del 10% rispetto all'attuale metodo

Gli obiettivi sopraelencati non sono frutto di una futura rosea visione sperimentale, ma di un'attenta analisi e ottimizzazione dei materiali, dei metodi e della strumentazione a disposizione, sviluppata durante le analisi eseguite.

Parametri aggiornati per raggiungere i nuovi obiettivi:

Parametro/Materiali	Valore/tipologia
TD	
Tempo di incubazione	60 min.
Temperatura trappola (durante criofofocalizzazione)	-20°C
GC	
Gradiente 1	3°C/min.
Temperatura 1	180°C
Hold Time 1	2 min.
Gradiente 2	25°C/min.
Temperatura 2	280°C
Hold Time 2	1 min.
Post Run Temp.	290°C

Post Run Flow	1.2 mL/min.
Post Run Time	5 min.
Colonna	Agilent HP-5ms Ultra Inert 30m x 250µm x 0.25µm
MS	
Mass range	35-300 amu
Solvent Delay	3 min.

Costi per raggiungere i nuovi obiettivi:

- Aumento del tempo totale di analisi del 50%⁸

⁸ Risultato ottenibile integrando la modalità prep-ahead nel software del Centri dopo avere calcolato attraverso varie prove il GC cycle-time quindi mettendo in sequenza i campioni.

4. Conclusioni

Il lavoro svolto con questo progetto di tesi ha portato alla creazione e successiva ottimizzazione di nuovi metodi con un'innovativa strumentazione in grado di rilevare i VOC presenti nelle foglie di vite.

Si è partiti dalla valutazione e dalla scelta dei componenti più adatti per la tipologia di analisi come fibra e trappola dopo vari esperimenti. Si è ricorsi anche a degli espedienti per ridurre le problematiche intrinseche alla tipologia di analisi e campionamento. Inoltre, grazie ad un'ottimizzazione tramite software e della metodologia di analisi, è stato possibile sfruttare al massimo la potenza strumentale per ottenere dei risultati apprezzabili in un ridotto tempo di analisi rispetto a quanto presente in letteratura.

È stato possibile implementare queste metodologie per l'analisi dei composti dalle foglie di vite di diverse varietà in diverse condizioni, nella fattispecie sono stati analizzati e determinati i VOC di Sangiovese e Montepulciano di due cloni sottoposti a due diversi trattamenti, ottenendo dei risultati che dimostrano delle parziali differenze tra viti di controllo e sottoposte a stress idrico, anche se si è trattato solo di un'analisi preliminare rispetto al progetto complessivo, che verrà svolto nelle successive analisi

Infine, è stato possibile suggerire un ulteriore miglioramento metodologico a partire dai risultati ottenuti per le future analisi.

5. Bibliografia

- A. Rodríguez-Delet , A. Castro-Marín , L. Moretti Conti, A. Lombini, F. Chinnici A. D. Rombolà, Characterization of VOCs Emitted by Foliage of Grapevine cv. Isabella for Prospecting Innovative Cropping Systems, *Agronomy*, 12, 272, **2022**.
- A. Baiano, A. De Gianni, A. Mentana, M. Quinto D. Centonze, M. A. Del Nobile, Effects of the treatment with oak chips on color-related phenolics, volatile composition, and sensory profile of red wines: the case of Aglianico and Montepulciano, *European Food Research and Technology*, 242, 745-767, **2016**.
- ARPAT, Mediterraneo e cambiamento climatico, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana, **2021**, <https://www.arpat.toscana.it/notizie/notizie-brevi/2021/mediterraneo-e-cambiamento-climatico>
- B. Bonn, R.K Magh, J. Rombach, J. Kreuzwieser, Biogenic isoprenoid emissions under drought stress: different responses for isoprene and terpenes, *Biogeosciences*, 16, 4627-4645, **2019**
- C. van Leeuwen, A. Destrac-Irvine, M. Dubernet, E. Duchêne, M. Gowdy, E. Marguerit, P. Pieri, A. Parker, L. de Rességuier, N. Ollat, An Update on the Impact of Climate Change in Viticulture and Potential Adaptations, 9, 514, **2019**.
- C. van Leeuwen, Philippe Darriet, The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality, *Journal of Wine Economics*, 11, 150-167, **2016**.
- C. Lemaitre-Guiller, A. Chartier, C. Dufresne, A. Douillet, S. Cluzet, J. Valls, N. Aveline, X. Daire, M. Adrian, Elicitor-Induced VOC Emission by Grapevine Leaves: Characterisation in the Vineyard, *Molecules*, 27, 6028, **2022**.

- D. Tholl, W. Boland, A. Hansel, F. Loreto, U.S.R. Rose, J.P Schnitzler, Practical approaches to plant volatile analysis, *The plant journal*, 45, 540-560, **2006**.
- Decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, articolo 268, comma 11, “Norme in materia ambientale”
- E. Fries, W. Püttmann, Improvement of HS-SPME for analysis of volatile organic compounds (VOC) in water samples by simultaneous direct fiber cooling and freezing of analyte solution, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386,1497–1503, **2006**
- Fortune Business Insights, The global wine market is projected to grow from \$340.23 billion in 2021 to \$456.76 billion in 2028 at a CAGR of 4.30% in forecast period, 2021-2028, Fortune Business Insights, **2022**
<https://www.fortunebusinessinsights.com/wine-market-102836>
- G. Palai, G. Caruso, R. Gucci, Claudio D’Onofrio, Water deficit before veraison is crucial in regulating berry VOCs concentration in Sangiovese grapevines, *Plant Science*, 14, 1117572, **2023**.
- I. Šikuten, P. Štambuk, J. K. Kontic, E. Maletic, I. Tomaz, D. Preiner, Optimization of SPME-Arrow-GC/MS Method for Determination of Free and Bound Volatile Organic Compounds from Grape Skins, *Molecule*, 26,7409, **2021**
- I. Šikuten, P. Štambuk, J. K. Kontic, E. Maletic, I. Tomaz, D. Preiner, Optimization of SPME-Arrow-GC/MS Method for Determination of Free and Bound Volatile Organic Compounds from Grape Skins,26,7409, **2021**
- I. Šikuten, P. Štambuk, Ž. Andabaka, I. Tomaz, Z. Markovic, D. Stupic, E. Maletic, J. K. Kontic, D. Preiner, Grapevine as a Rich Source of Polyphenolic Compounds, *Molecules*, 25, 5604, **2020**.
- ISPRA, Bollettino siccità, Isprambiente, **2023**,
https://www.isprambiente.gov.it/pre_meteo/siccitas/index.html

- J. Midzi, D. W. Jeffery, U. Baumann, S. Rogiers, S. D. Tyerman, Vinay Pagay, Stress-Induced Volatile Emissions and Signalling in Inter-Plant Communication, *Plant*, 11, 2566, **2022**
- J.R. Mosedale, K.E. Abernethy, R.E. Smart, R.J. Wilson, I.M. Maclean, Climate change impacts and adaptive strategies: Lessons from the grapevine. *Global Changing Biology*, 22, 3814–3828, **2016**.
- Katherine K. Stenerson, Yong Chen, Tyler Young, Robert Shirey, Leonard M. Sidisky, Application of SPME Using an Overcoated PDMS–DVB Fiber to the Extraction of Pesticides From Spaghetti Sauce: Method Evaluation and Comparison to QuEChERS, *34*, 500-509, **2016**
- Kesselmeier J., Ciccioli P., Kuhun U., Stefani P., Biesenthal T., Rottenberger S., Wolf A., Vitullo M., Valentini R., Nobre A., Kabat P., Andreae M.O., Volatile organic compound emission in relation to plant carbon fixation and the terrestrial carbon budget, *Glob Biogeochem Cycle* 16(4):73-1,73-9, **2002**.
- L. Hearn, R. Cole, N. D. Spadafora, R. Szafnauer, Volatile and semi-volatile compounds in flavoured hard seltzer beverages: Comparison of high-capacity sorptive extraction (HiSorb) methods, *Advanced in Sample Preparation*, 3, 10032, **2022**.
- L.G Dias., G.H.B. Duarte, L.R.B. Mariutti, N. Bragagnolo, Aroma profile of rice varieties by a novel SPME method able to maximize 2-acetyl-1-pyrroline and minimize hexanal extraction, *123*, 550-558, **2019**
- LC GC CHROMacademy, GC-MS acquisition mode, chromacademy, **2023**, <https://www.chromacademy.com/channels/gc-ms-training-courses/technique/gc-ms-acquisition-modes/>
- M. Sharafan, M. A. Malinowska, H. Ekiert, B. Kwasniak, E. Sikora, A. Szopa, *Vitis vinifera* (Vine Grape) as a Valuable Cosmetic Raw Material, *Pharmaceutics*, 15, 1372, **2023**.

- M. Simpraga, H. Verbeeck, M. Demarcke, É. Joó, O. Pokorska, C. Amelynck, N. Schoon, J. Dewulf, H. Van Langenhove, B. Heinesch, M. Aubinet, Q. Laffineur, J.-F. Müller, K. Steppe, Clear link between drought stress, photosynthesis and biogenic volatile organic compounds in *Fagus sylvatica* L., *Atmospheric Environment*, 45, 5254-5259, **2011**
- Markes International, Centri 360, Markes , **2023**, <https://markes.com/sample-preparation-platforms/centri-360>
- McKee, T.B., N.J. Doesken, and J. Kleist, The relationship of drought frequency and duration of time scales. In *Proc. of Eighth Conference on Applied Climatology*, American Meteorological Society, January 17–23, **1993**.
- Moschetta A., Il clima che cambia, caldo e siccità: nuove sfide per la viticoltura, *Wine Meridian*, **2023**, <https://www.winemeridian.com/ambiente-e-sostenibilita/il-clima-che-cambia-caldo-e-siccita-nuove-sfide-per-la-viticultura/>
- N. Dudareva, A. Klempien, J. K. Muhlemann, I. Kaplan, *New Phytologist*, 198, 16-32, **2019**.
- OIV, Grapevine varieties' area by country, Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino, **2017**, <https://www.oiv.int/public/medias/5851/grapevine-varieties-area-by-country-2015-focus-oiv-2017.pdf>
- P. Farkas, Analisi comparativa del bilancio idrico in cloni di 'Sangiovese' e 'Montepulciano', Università ungherese di Scienze Agrarie e della Vita Istituto di Viticoltura ed Enologia di Budapest, **2023**.
- P. Štambuk, I. Šikuten , D. Preiner, E. Maletić 1,2, J. K. Kontić , I. Tomaz, Croatian Native Grapevine Varieties' VOCs Responses upon Plasmopara viticola Inoculation, *Plants*, , 12, 404, **2023**.
- Quattroclici Marcello Leder, Sangiovese, Quattroclici, **2019**, <https://www.quattroclici.it/vitigni/sangiovese/>

- R. N. Bosman, J. G. Lashbrooke, Grapevine mono- and sesquiterpenes: Genetics, metabolism, and ecophysiology, *Plant Science*, 14, 1111392, **2023**.
- R. Buono, G. Vallariello, Introduzione e diffusione della vite (*Vitis Vinifera* L.) in Italia, *Delpinoa*, n.s.44,39-51, **2002**.
- Report Linker, Global Wine Industry, Report Linker, **2023**
https://www.reportlinker.com/p05010580/Global-Wine-Industry.html?utm_source=PRN
- V. Lazazzara, C. Bueschl, A. Parich, I. Pertot, R. Schuhmacher, M. Perazzolli, Downy mildew symptoms on grapevines can be reduced by volatile organic compounds of resistant genotypes, *Scientific Report*, 8, 1618, **2018**.
- V. Lazazzara, S. Avesani, P. Robatscher, M. Oberhuber, I. Pertot, R. Schuhmacher, M. Perazzolli, Biogenic volatile organic compounds in the grapevine response to pathogens, beneficial microorganisms, resistance inducers, and abiotic factors, *73*,529–554,**2022**.
- Z. Cheng, D. T. Mannion, M. G. O'Sullivan, S. Miao, J. P. Kerry, K. N. Kilcawley, Comparison of Automated Extraction Techniques for Volatile Analysis of Whole Milk Powder, *Foods*, 10, 2061, **2021**.
- F. Brili, L'impatto dello stress idrico e delle alte temperature sull'emissione di isoprene, sulla fotosintesi e respirazione, Università degli studi della Tuscia, DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELL'AMBIENTE FORESTALE E DELLE SUE RISORSE, **2008**.
- Midzi, J.; Jeffery, D.W.; Baumann, U.; Rogiers, S.; Tyerman, S.D.; Pagay, V. Stress-Induced Volatile Emissions and Signalling in Inter-Plant Communication. *Plants*, 11, 2566, **2022**.

6. Appendice

5-Hepten-2-one, 6-methyl-

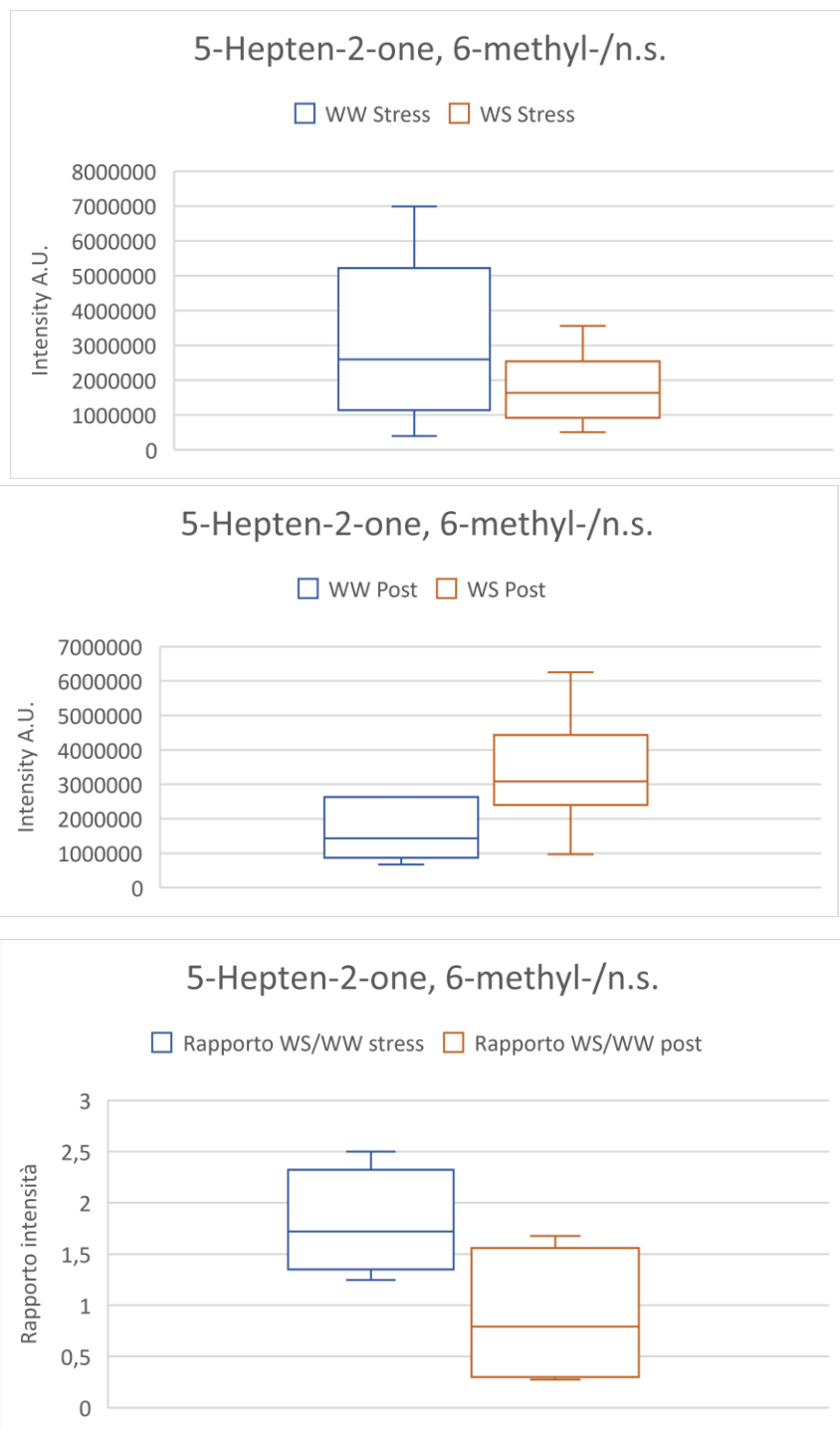


FIGURA 60 EMISSIONE DI 5-HEPTEN-2-ONE, 6-METHYL- IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

1H-3a,7-Methanoazulene, octahydro-1,4,9,9-tetramethyl-

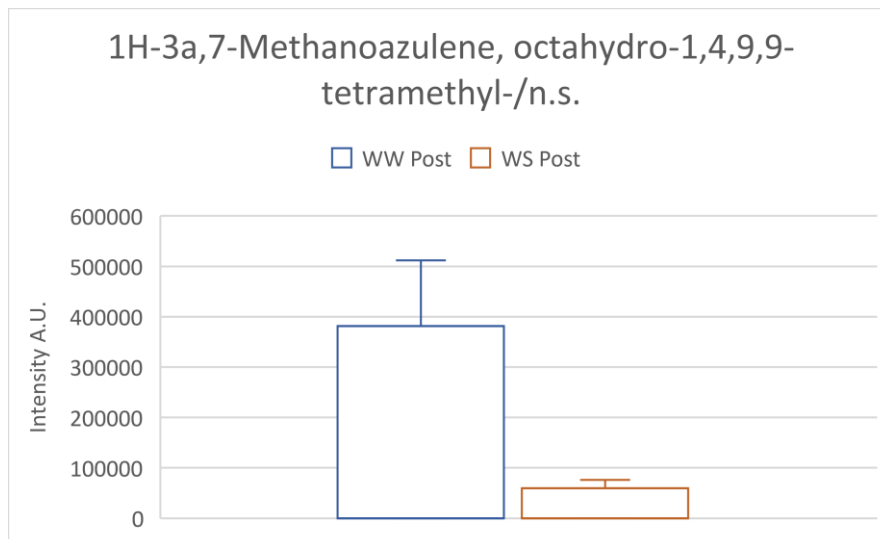
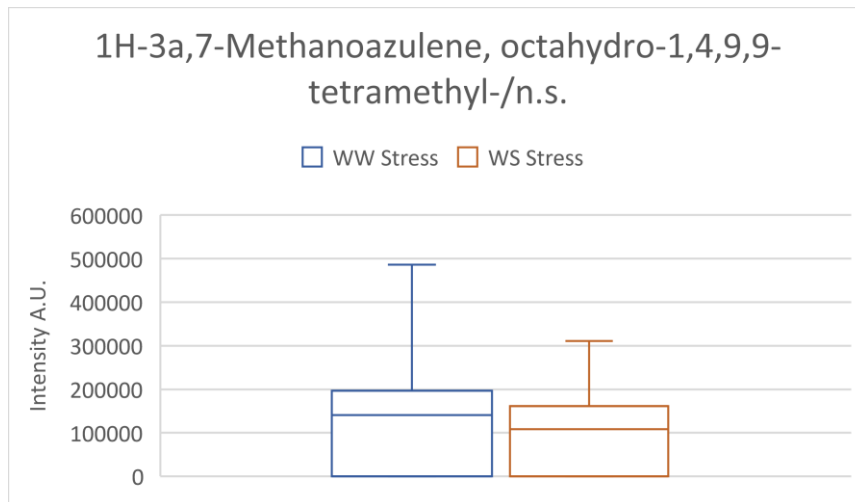


FIGURA 61 EMISSIONE DI 1H-3°,7-METHANOAZULENE, OCTAHYDRO-1,4,9,9-TETRAMETHYL- IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

2-Pentenal, (E)-

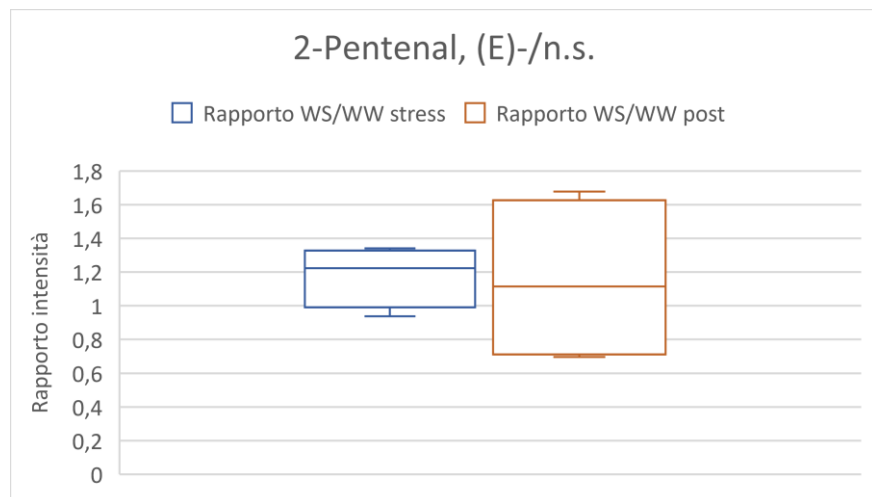
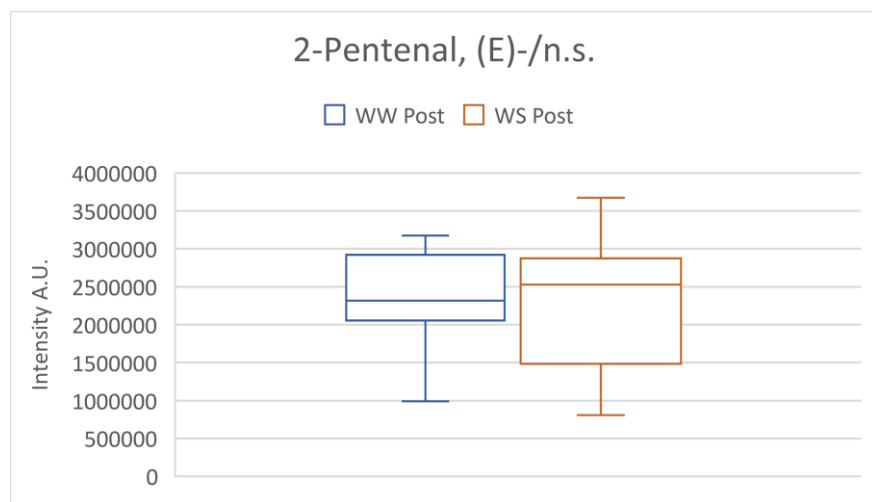
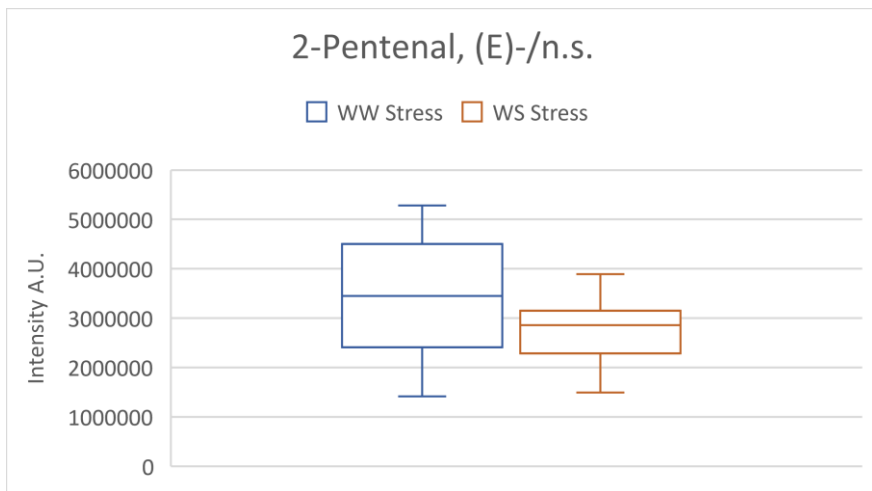


FIGURA 62 EMISSIONE DI 2-PENTENAL, (E)-IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Unknown 11.14

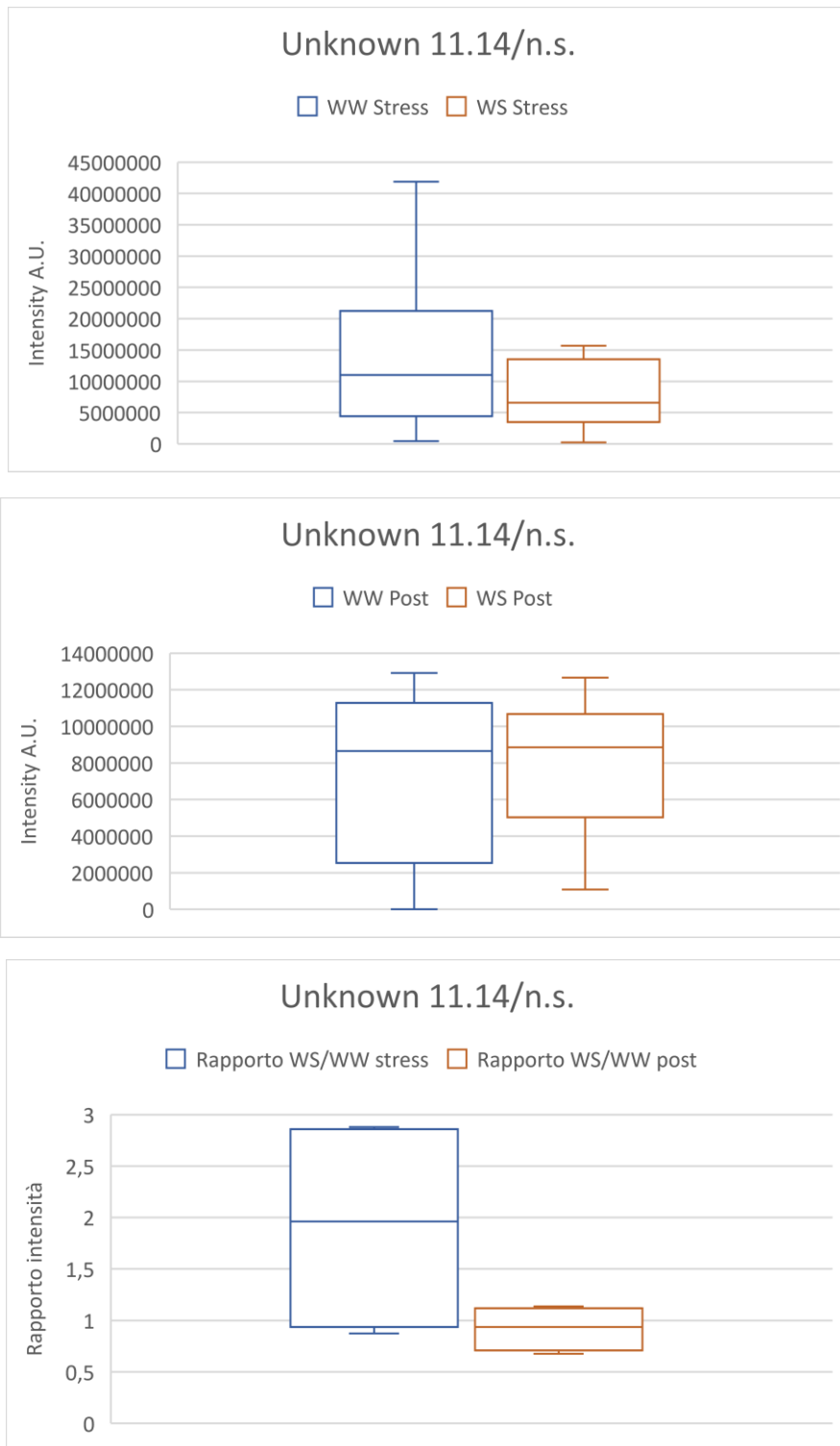


FIGURA 63 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 11.14 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Geraniol

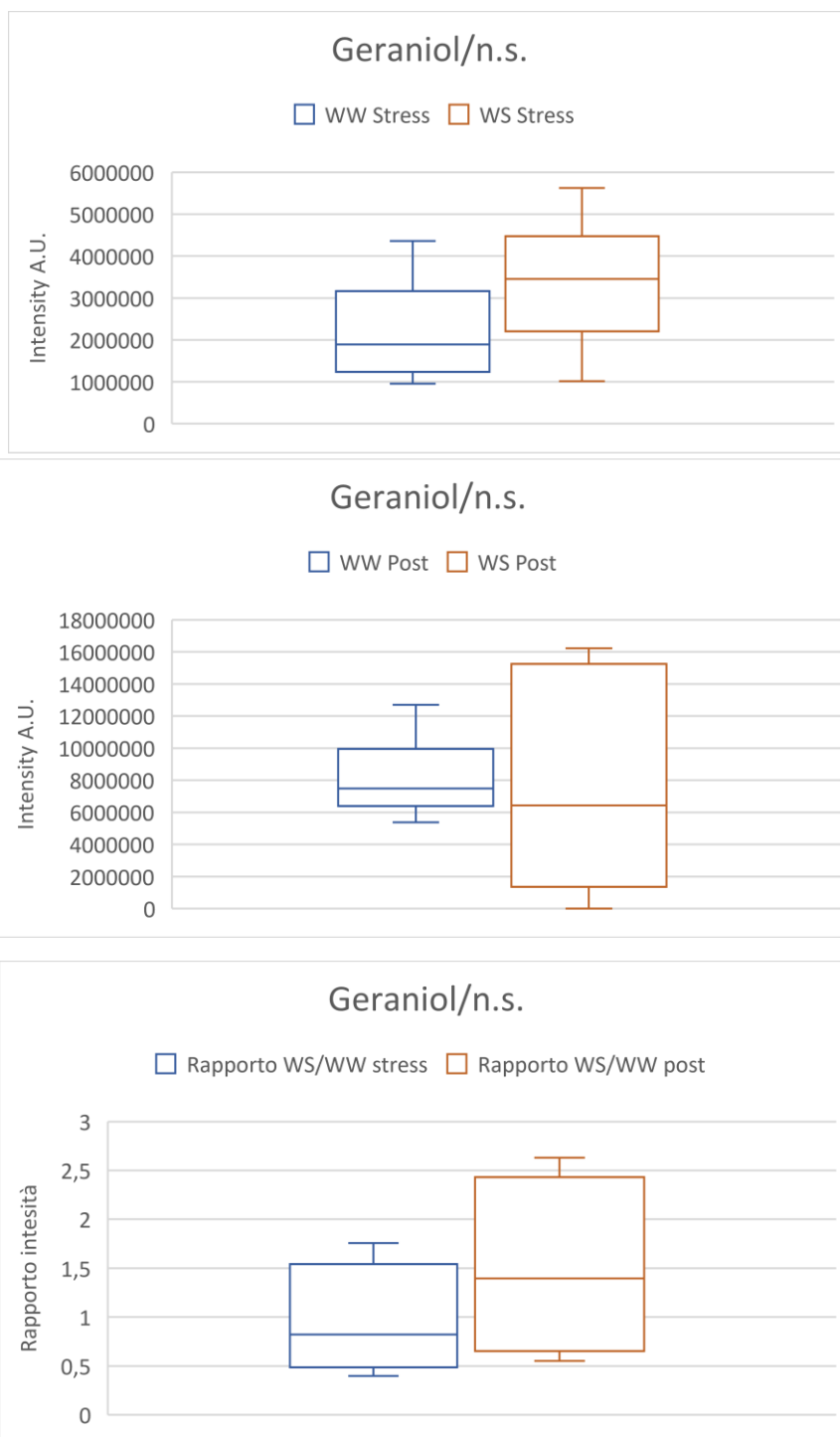


FIGURA 64 EMISSIONE DI GERANIOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Eugenol

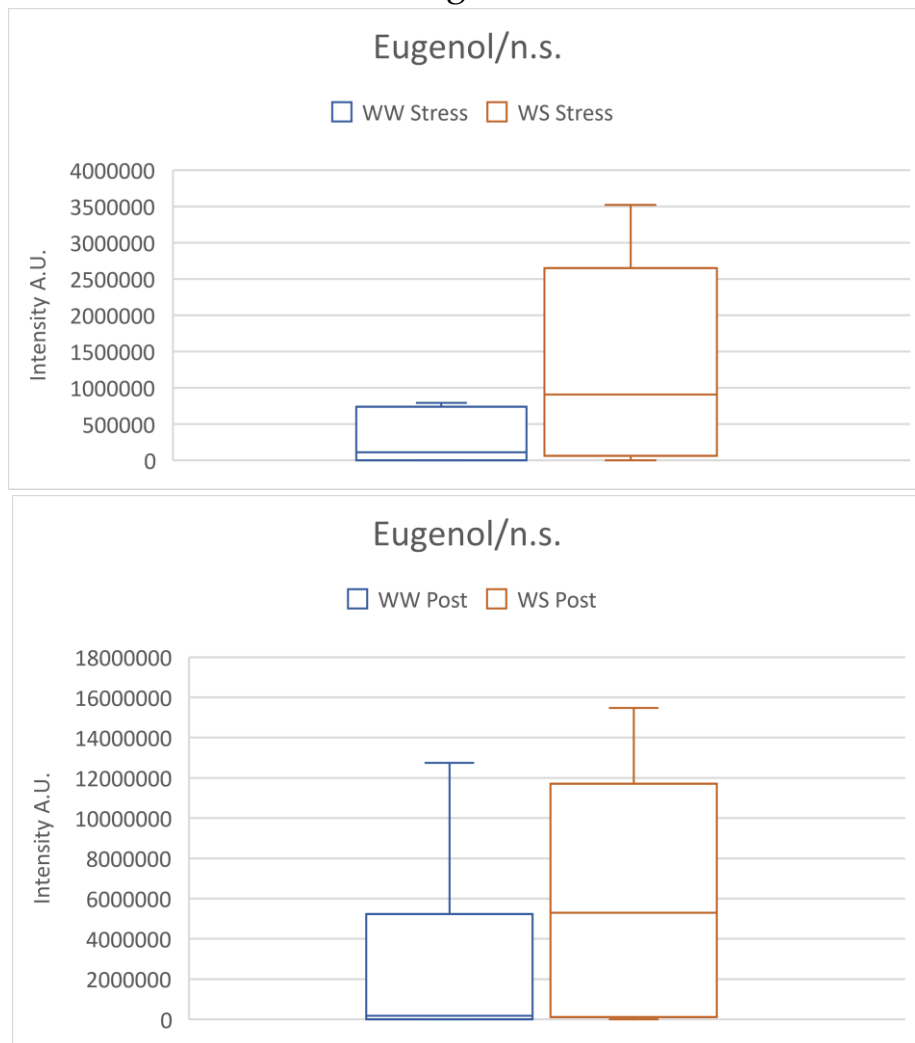


FIGURA 65 EMISSIONE DI EUGENOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Humulene

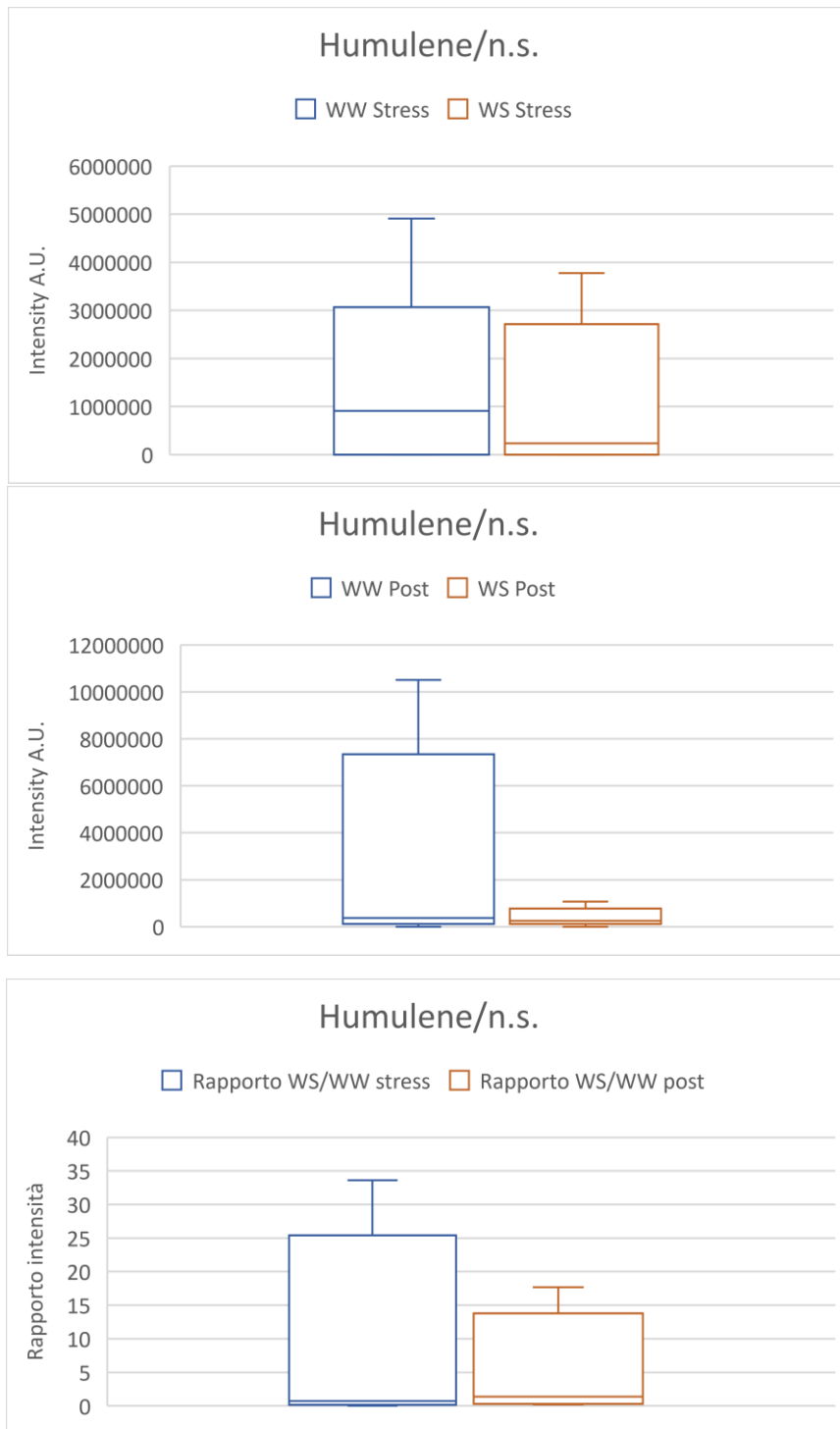


FIGURA 66 EMISSIONE DI HUMULENE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Phenylethyl Alcohol

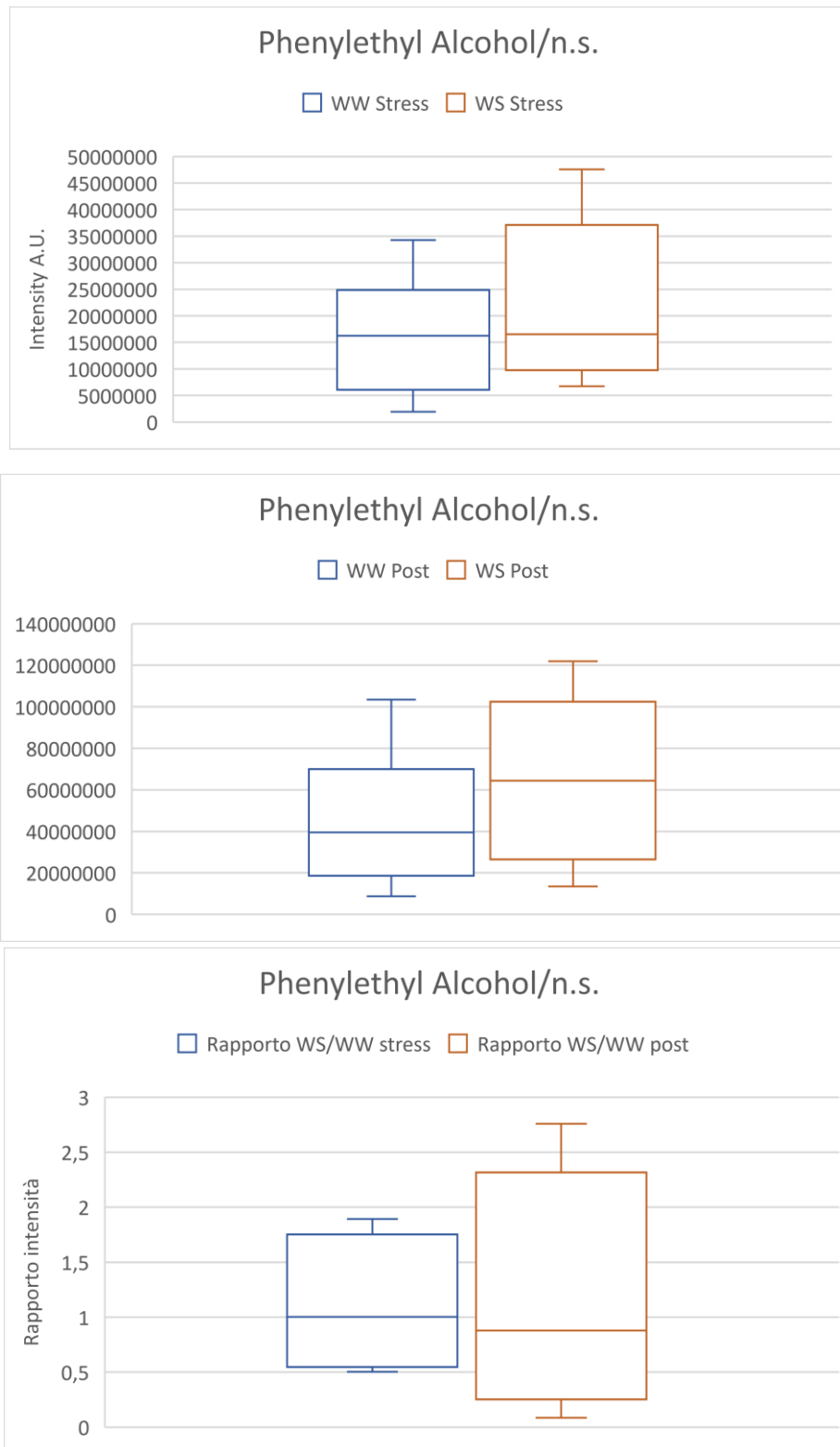


FIGURA 67 EMISSIONE DI PHENYLETHYL ALCOHOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Methyl salicylate

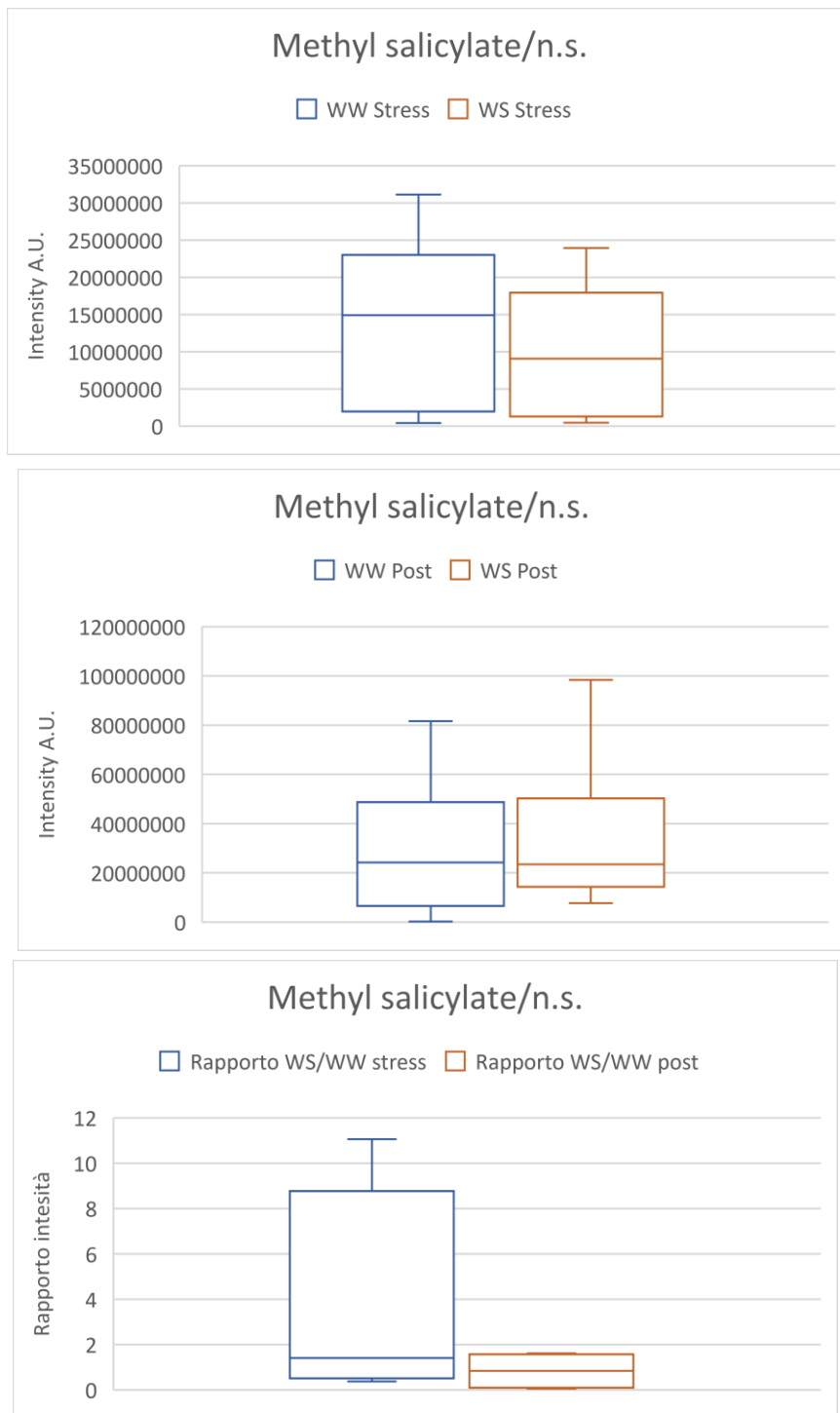


FIGURA 68 EMISSIONE DI METHYL SALICYLATE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Caryophyllene

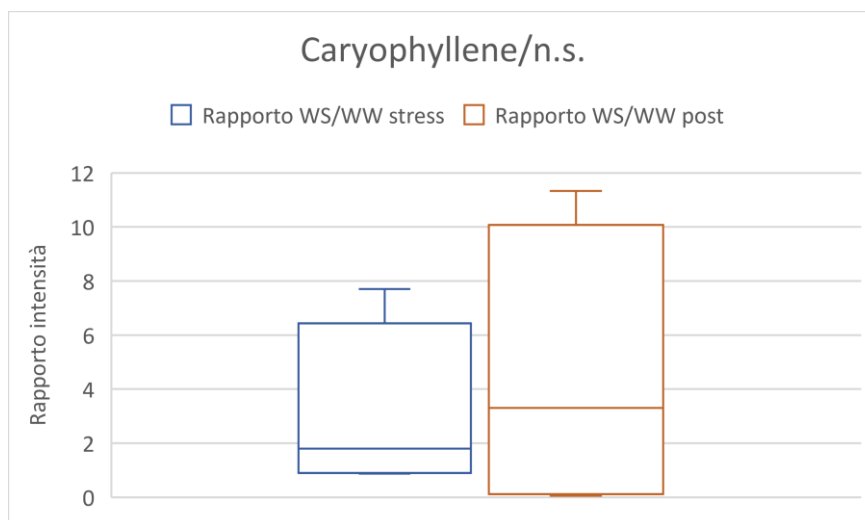
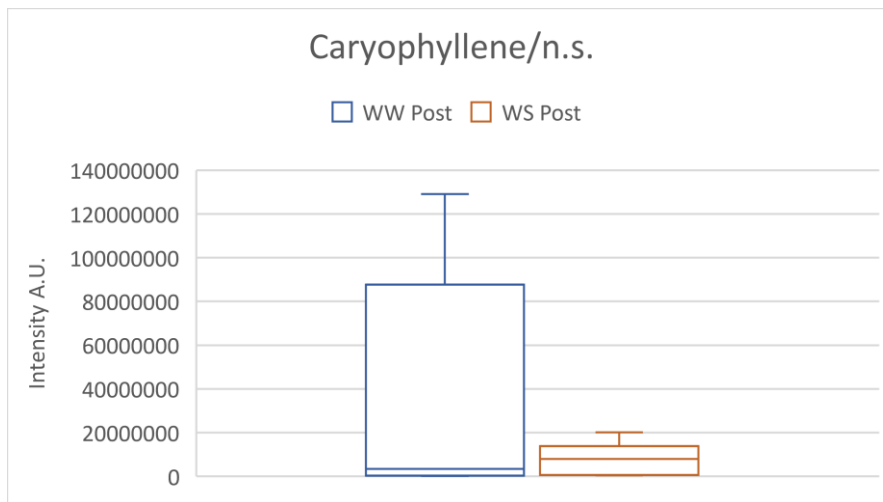
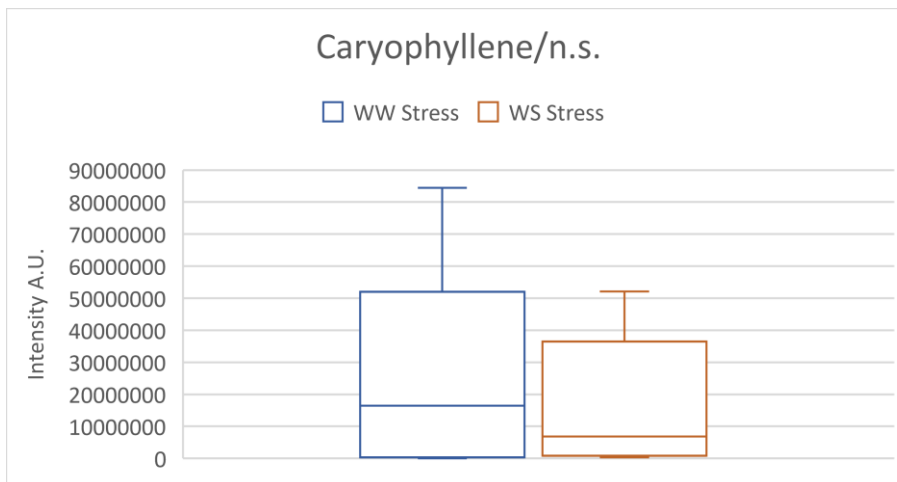


FIGURA 69 EMISSIONE DI CARYOPHYLLENE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Unknown 21.89

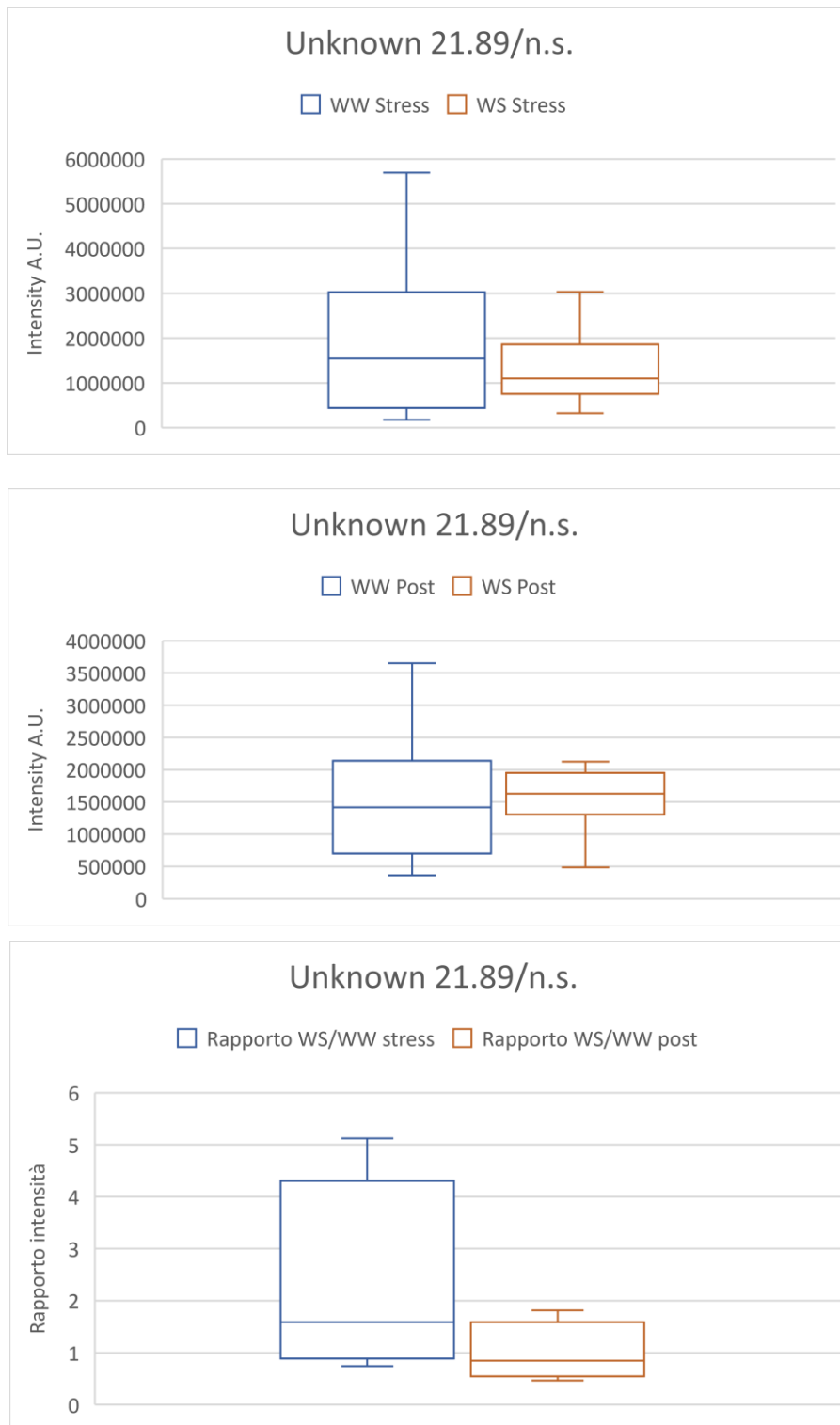


FIGURA 70 EMISSIONE DI COMPOSTO NON IDENTIFICATO CON TEMPO DI RITENZIONE 21.89 MIN IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Hexanal

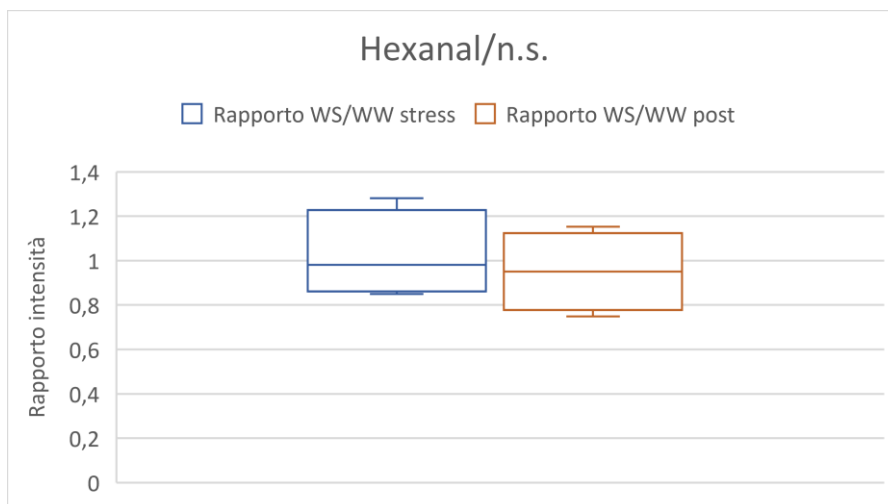
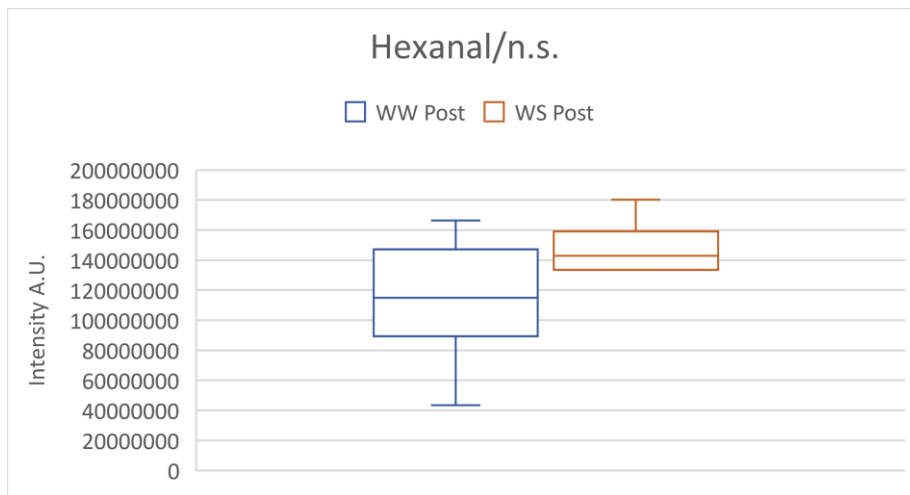
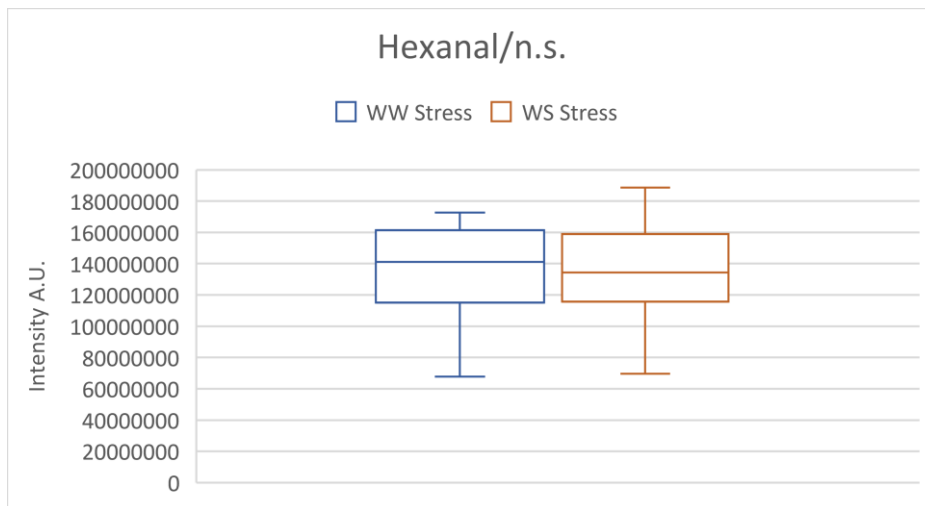


FIGURA 71 EMISSIONE DI HEXANAL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

3,4-Heptadiene

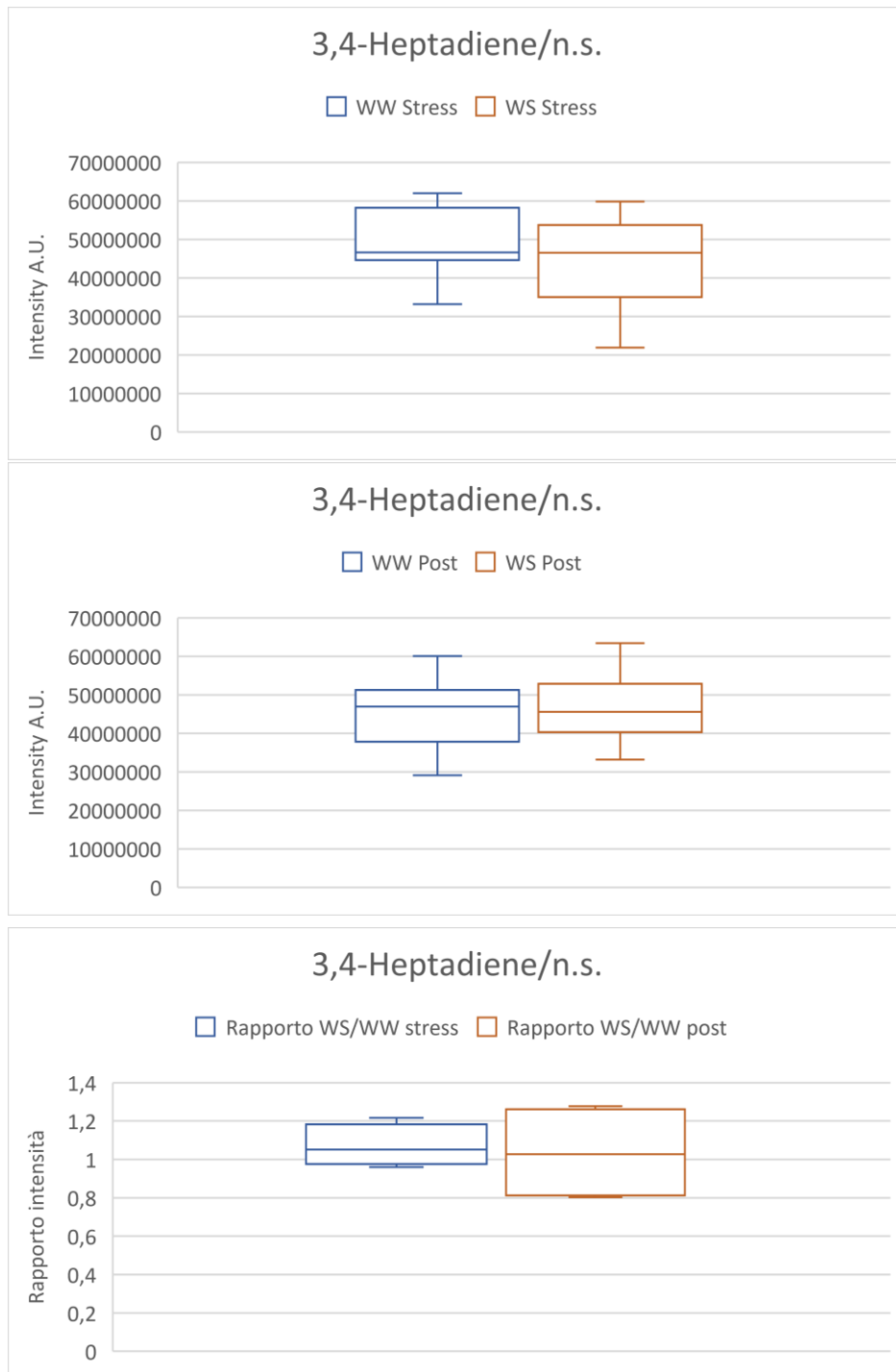


FIGURA 72 EMISSIONE DI 3,4-HEPTADIENE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Benzaldehyde

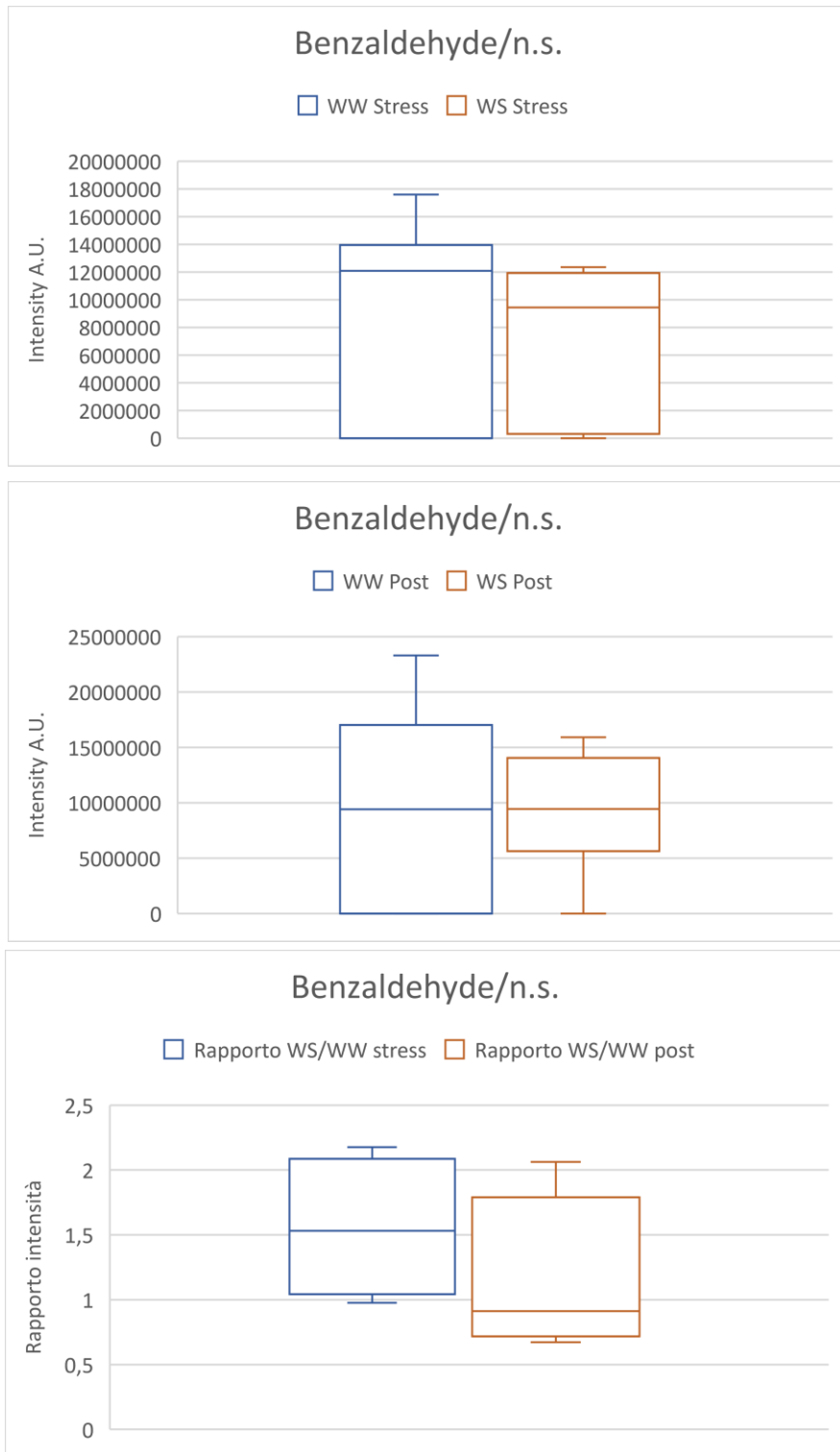


FIGURA 73 EMISSIONE DI BENZALDEHYDE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Benzyl Alcohol

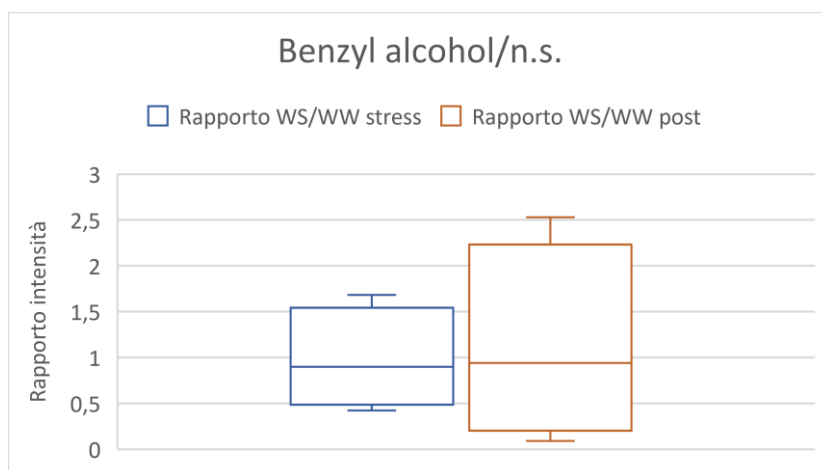
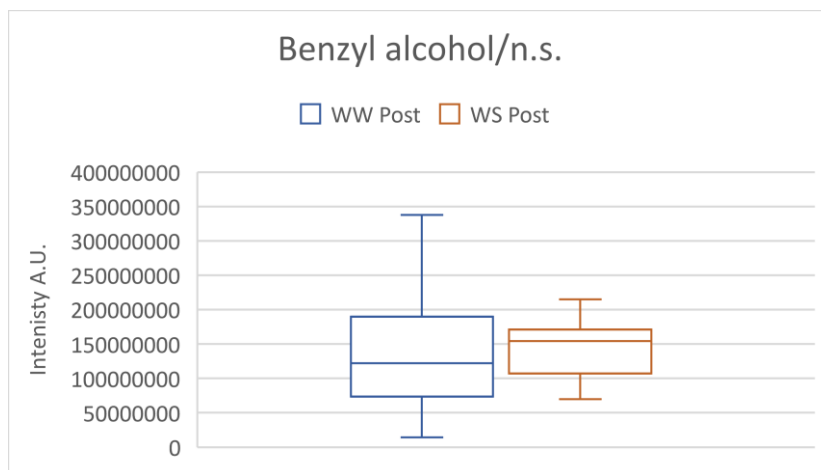
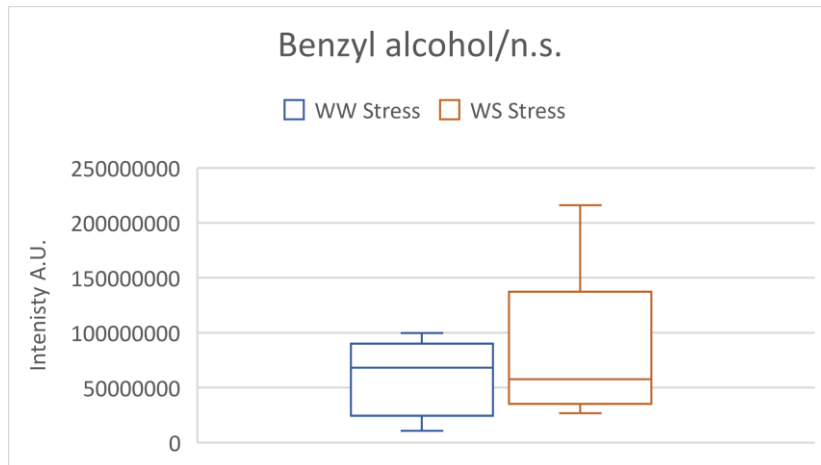


FIGURA 74 EMISSIONE DI BENZYL ALCOHOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

α -Ionone

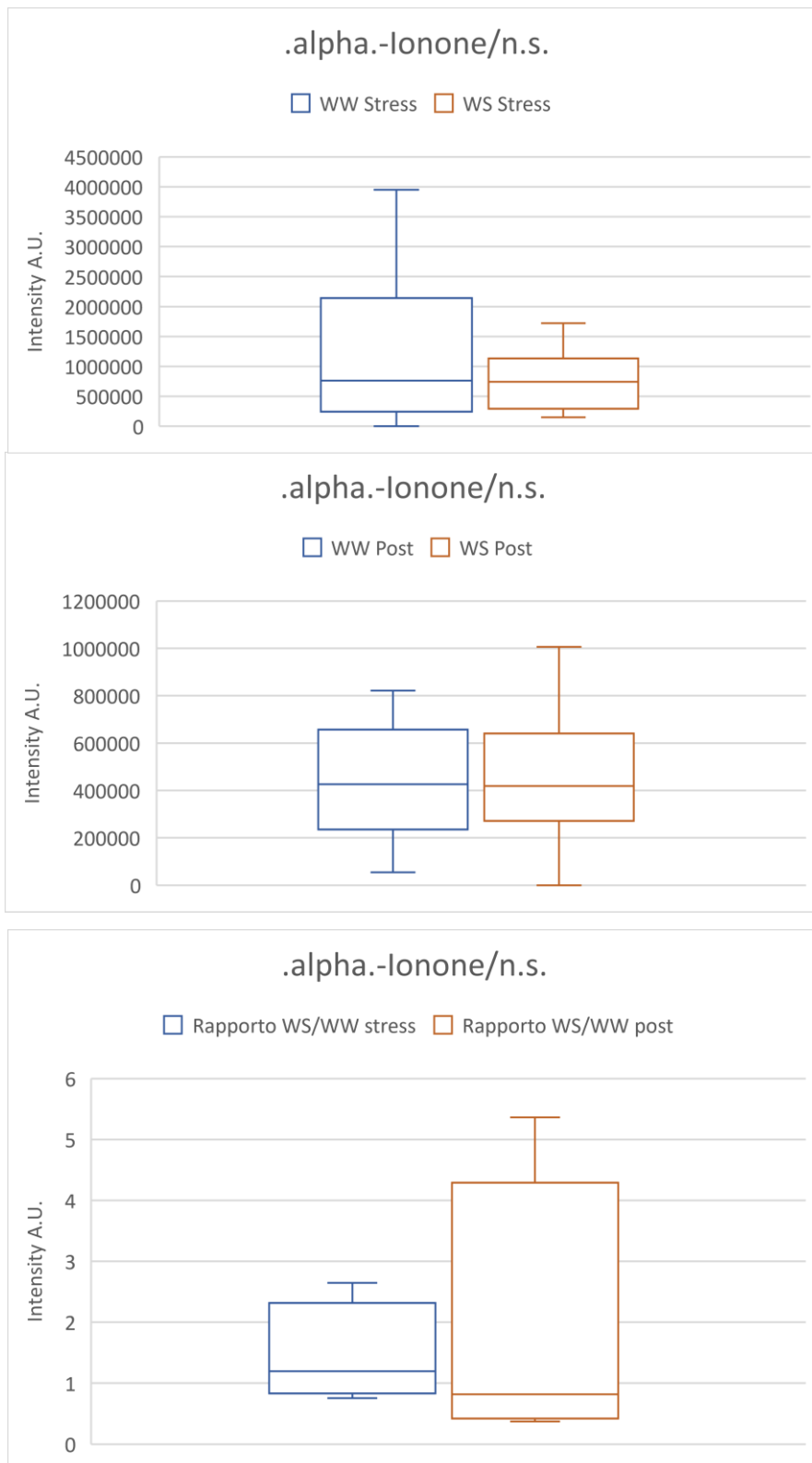


FIGURA 75 EMISSIONE DI ALPHA-IONONE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

trans-β-Ionone

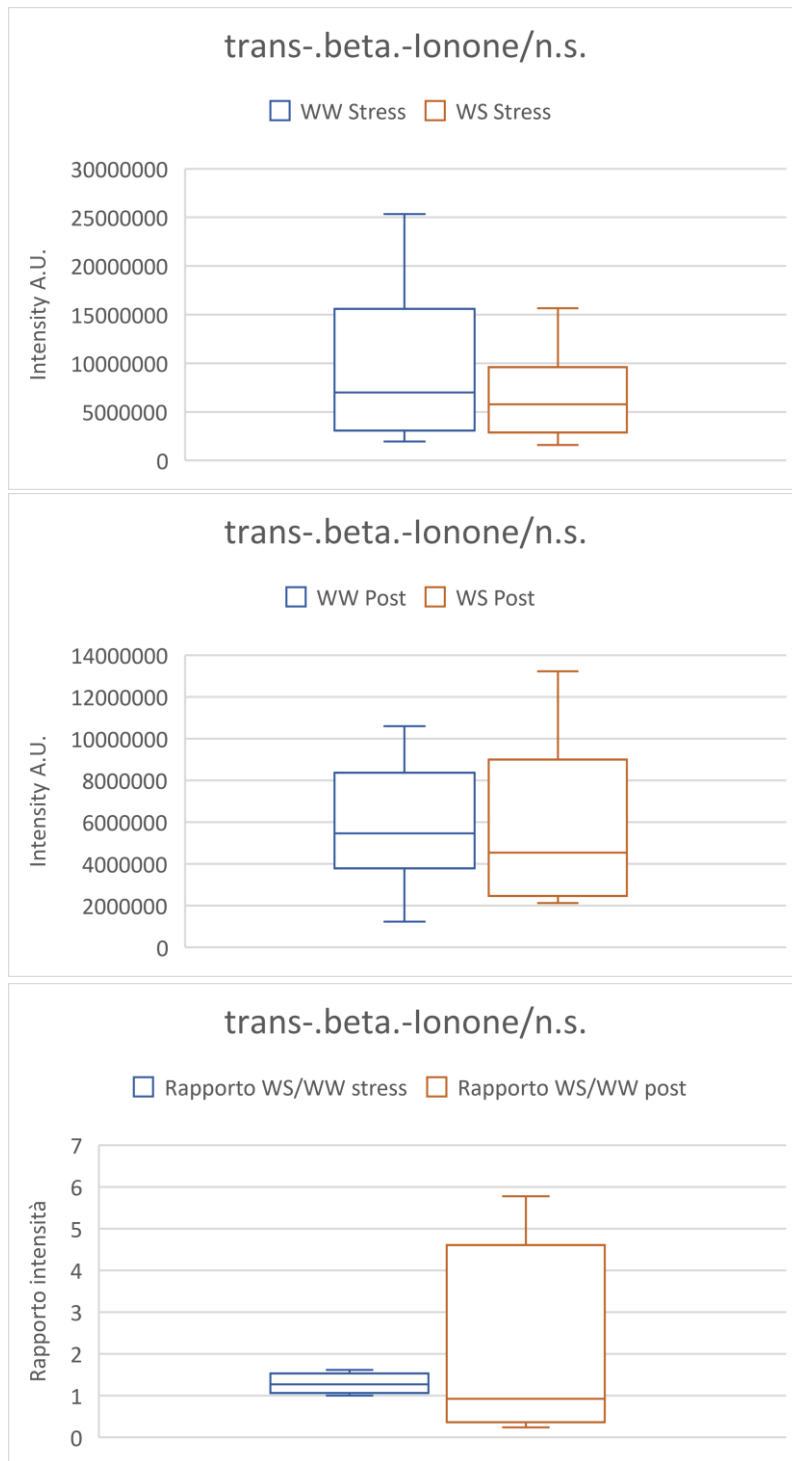


FIGURA 76 EMISSIONE DI TRANS-BETA-IONONE IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

2-Penten-1-ol, (Z)-

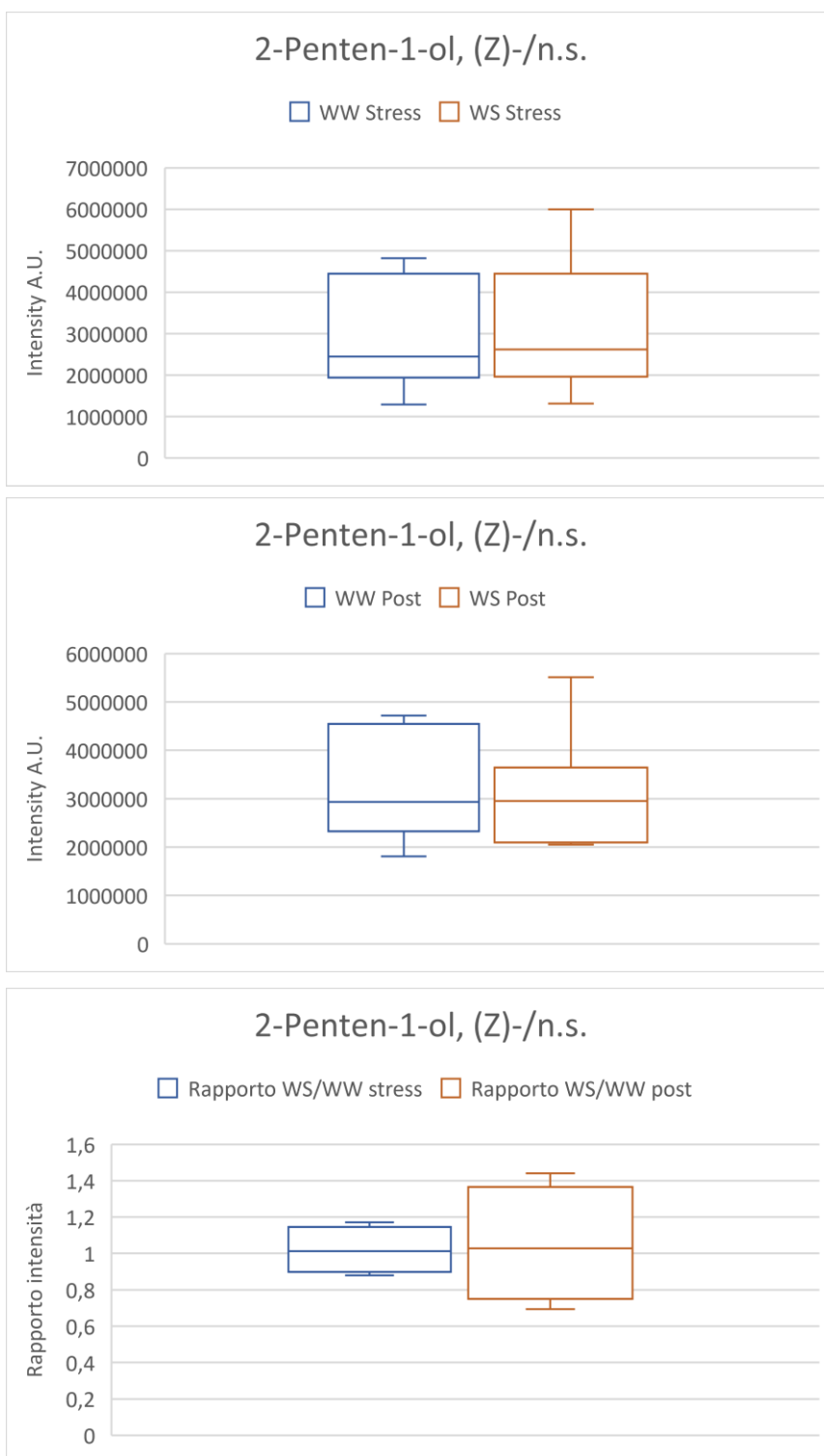


FIGURA 77 EMISSIONE DI 2-PENTEN-1-OL, (Z)- IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

2-Hexenal

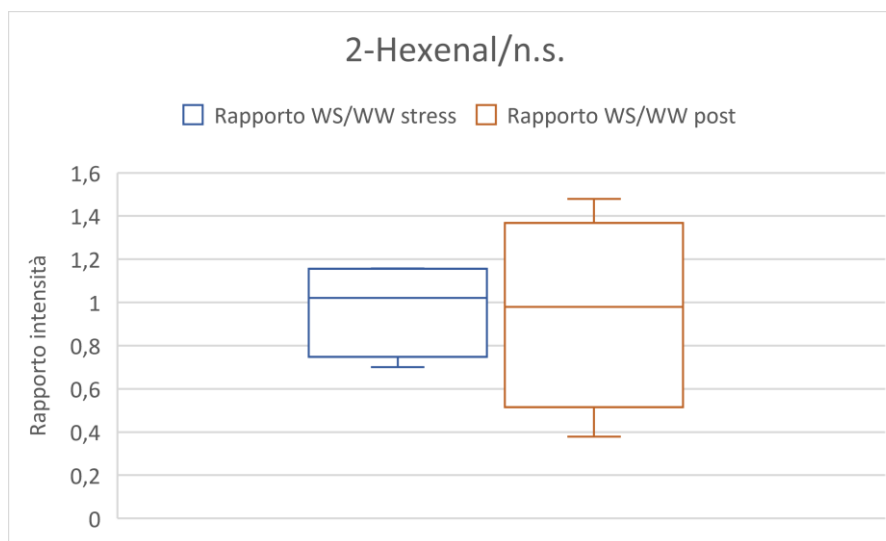
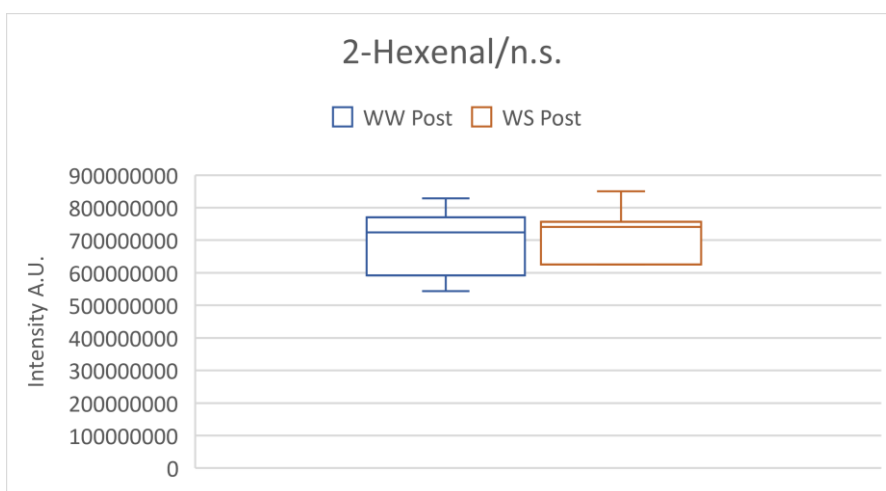
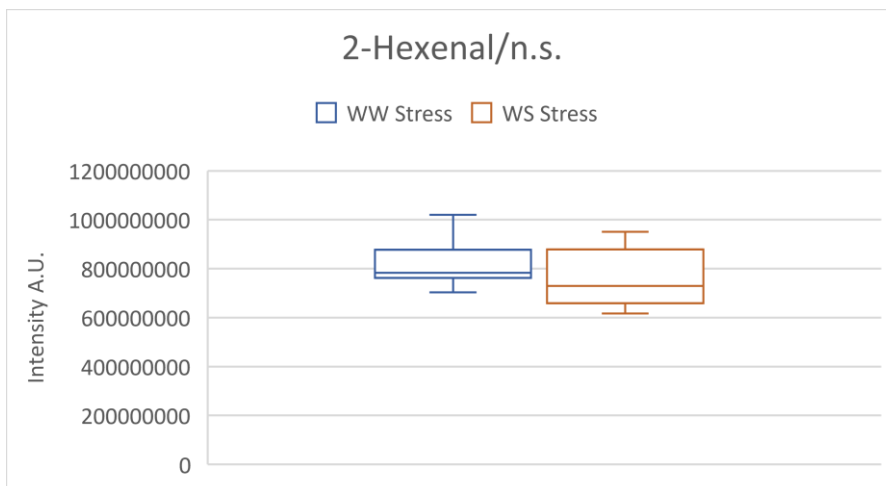


FIGURA 78 EMISSIONE DI 2-HEXENAL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Cyclohexanol

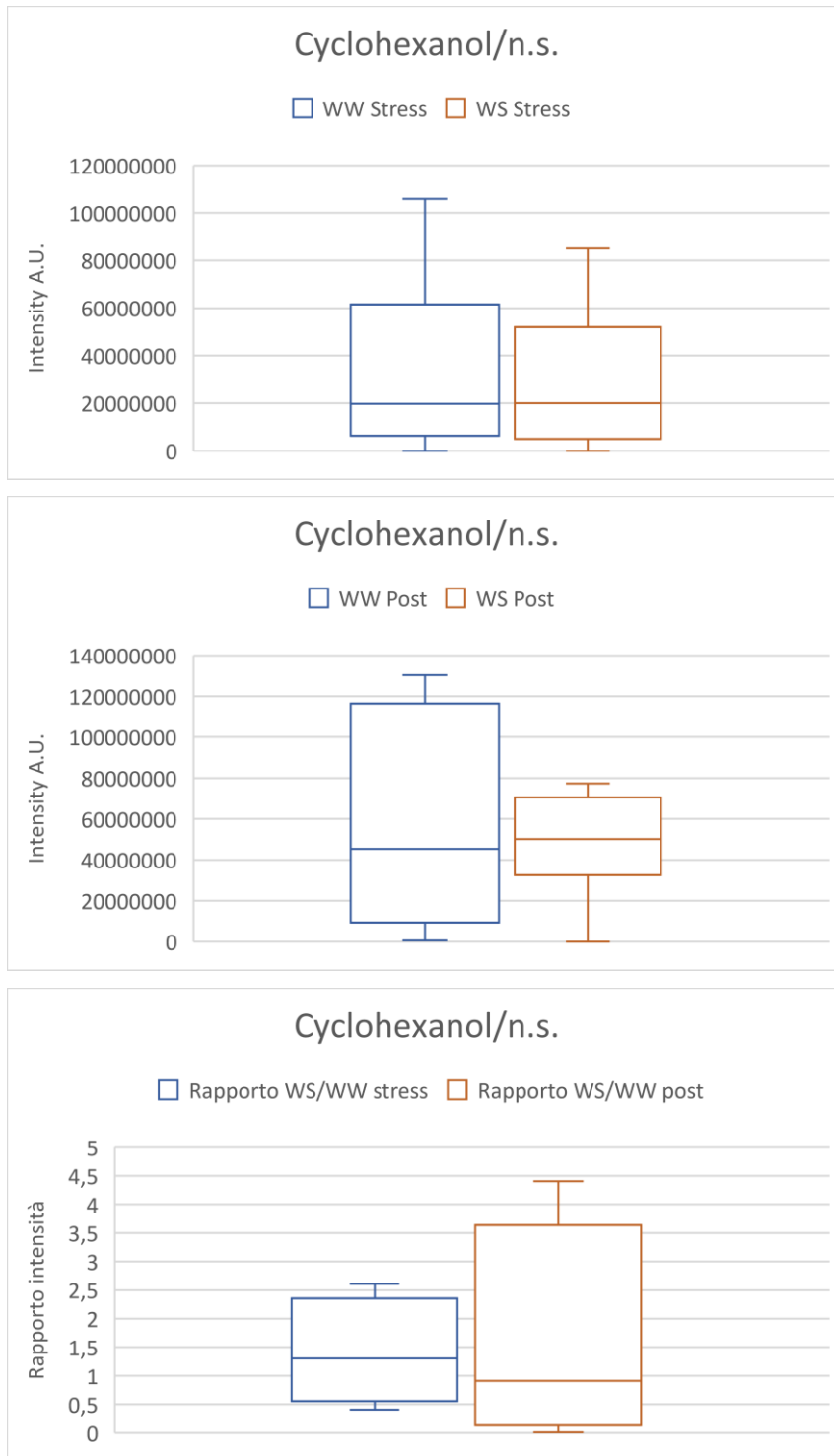


FIGURA 79 EMISSIONE DI CYCLOHEXANOL IN PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS IDRICO, RECOVERY E CONFRONTO TRA I DUE.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Luca Cappellin, per avermi guidato nella fase più importante del mio percorso accademico.

Un sentito grazie anche alla Fondazione Edmund Mach, al Dott. Michele Faralli, al Dott. Pierluigi Bianchedi e la Dott. Sa Silvia Pettenuzzo per il supporto e l'opportunità concessa.

Un grazie speciale all'azienda DTOLabs e tutti i colleghi per avermi dato la possibilità di mettermi in gioco e sviluppare un know-how non indifferente, in particolar modo al Cav. Pierantonio Del Turco e Michele Pozzebon, i quali mi hanno accolto in azienda facendomi sentire parte di una squadra eccezionale. Infine, ma non per importanza un Grazie a Carlo Vinante, grande membro del team, collega, ma soprattutto amico che mi ha trasmesso moltissimo, non solo a livello lavorativo.

Grazie ai miei amici i quali hanno condiviso con me immense gioie e mi sono stati vicini nei momenti più difficili, che nessuno meglio di loro poteva capire, li ringrazio per aver affrontato questo nostro percorso, insieme, spalla a spalla.

A mamma e papà al loro costante sostegno e ai loro insegnamenti, senza i quali oggi non sarei la persona che sono. Senza di voi tutto questo non sarebbe stato possibile, grazie.

Ai miei zii, che in questi anni passati insieme mi hanno fatto crescere, supportandomi, sopportandomi e facendomi vedere il mondo da una prospettiva diversa, grazie.

A mio fratello, al quale dedico questa tesi.

Consegnandogli la formula "chimica" per il raggiungimento di quasi tutti gli obiettivi:

1% "Ossido" di Talento

1% “Permanganato” di Fortuna

98% “Tartrato” di Perseveranza.

Si dice che “chi ben comincia è a metà dell’opera”, non condivido molto, quindi, concludo con una frase di Leonardo da Vinci in risposta a questo aforisma; frase che campeggia incisa, come motto, sul ponte della nave scuola Amerigo Vespucci della Marina Militare Italiana.

Non chi comincia, ma quel che persevera

Emanuele