



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea in Chimica e Tecnologie
Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Caratterizzazione metabolomica di organismi vegetali naturali e geneticamente modificati

Relatore

Prof. Gabriele Capodaglio

Correlatore

Dott.ssa Elisa Scalabrin

Laureando

Alice Forlin

Matricola 826723

Anno Accademico

2013 / 2014

Indice

	<i>Pag.</i>
<i>1. Scopo della tesi</i>	1
<i>2. Introduzione</i>	3
2.1 Le piante	4
2.2 La cellula vegetale: componenti e struttura	6
2.3 Metabolismo e metabolomica	16
2.3.1 L'energia	18
2.3.1.1 La fotosintesi	19
2.3.1.2 Il ciclo di Calvin	21
2.3.1.3 La respirazione cellulare: la glicolisi, il ciclo dell'acido citrico e la catena di trasporto degli elettroni	23
2.3.1.4 La fotorespirazione	27
2.3.2 Gli enzimi	27
2.3.3 Metaboliti primari	28
2.3.3.1 Amminoacidi e proteine	28
2.3.3.2 I carboidrati	34
2.3.3.3 I lipidi	37
2.3.3.4 Gli acidi nucleici	39
2.3.3.4.1 Acidi nucleici e codice genetico	40
2.3.3.4.2 Modificazioni del DNA: le mutazioni genetiche	41
2.3.4 Metaboliti secondari	43
2.3.4.1 I composti fenolici	43
2.3.4.2 I terpenoidi	46
2.3.4.3 Gli alcaloidi	48
2.3.4.4 I glucosinolati	51
2.3.5 Metabolomica	52
<i>3. Materiali e metodi</i>	55
3.1 I campioni: piante di <i>Nicotiana Langsdorffii</i>	56
3.2 Metodologie analitiche	59
3.2.1 Materiali, solventi e strumenti utilizzati	59
3.2.1.1 Attrezzature e materiali	59
3.2.1.2 Solventi	59
3.2.1.3 Standard di riferimento	59
3.2.1.4 Colonna cromatografica	59
3.2.2 Procedura di trattamento del campione	60
3.2.3 Controllo qualità	61
3.2.4 Procedura analitica	62
3.2.4.1 Cromatografia	62

3.2.4.2 Spettrometria di massa	65
a) Sorgente di ionizzazione	65
b) Analizzatore di massa	68
c) Rivelatore di massa	74
3.2.4.3 Spettro di massa e frammentazione	75
3.3 Elaborazione dati	78
3.3.1 Xcalibur	78
3.3.2 MetAlign	79
3.3.3 MSClust	82
3.3.4 Excel	83
3.3.5 Identificazione dei metaboliti	84
3.4 Analisi statistica	86
3.4.1 Cluster analysis	87
3.4.2 Analisi delle componenti principali	90
4. Risultati e discussioni	95
4.1 Verifica intensità di segnale standard interno	96
4.2 Considerazioni generali	98
4.3 Analisi statistica	99
4.4 Identificazione dei metaboliti	105
4.4.1 Acil saccarosio	116
4.4.2 Acidi grassi e derivati	120
4.4.3 Le poliammine	124
4.4.4 Solanidine	126
4.4.5 Composti diterpenici	128
4.4.6 Composti vari	130
4.5 Identificazione mirata di metaboliti	131
5. Conclusioni	138
Appendice I	141
Appendice II	168
Appendice III	171
6. Bibliografia	172
Ringraziamenti	177

1. Scopo della tesi

In questo lavoro di tesi sono state analizzate piante di *Nicotiana Langsdorffii* del genotipo wild e geneticamente modificate, stressate e non; questa è una delle circa 60 specie conosciute di *Nicotiana*, di cui fa parte la specie *Nicotiana Tabacum*, da cui si ricavano le foglie di tabacco. Le piante sono state prodotte in vitro come cloni e cresciute in condizioni controllate nei laboratori del Dipartimento di Biologia di Firenze.

Questo tipo di pianta è considerata una pianta modello, utilizzata storicamente per studi genetici e metabolici. Questo tipo di studi prendono generalmente in considerazione solo pochi composti, ritenuti significativi per monitorare l'effetto delle modificazioni applicate alle piante, come fitormoni e molecole segnale.

In questo lavoro di tesi invece, sfruttando le enormi potenzialità di uno spettrometro di massa come l'orbitrap, in grado di effettuare misure ad elevata risoluzione, sono stati identificati un numero particolarmente elevato di metaboliti presenti negli organismi in esame, effettuando un'analisi untargeted a largo spettro.

Lo studio dei composti chimici associati ai processi cellulari che avvengono in un sistema è detto metabolomica: attraverso tale metodologia è possibile individuare l'impronta digitale unica derivante da tali processi e caratterizzare il pattern metabolico della pianta. Dalla composizione chimica del campione è possibile trarre informazioni relative ai meccanismi di difesa e di risposta delle piante sottoposte a stress ambientali o a modificazioni genetiche, con l'obiettivo di apportare un contributo significativo e innovativo per la risoluzione degli attuali problemi ambientali.

A tal fine, ogni fase di questo lavoro mira ad ampliare il range di molecole identificabili, dalla preparazione del campione (macinazione, estrazione e filtrazione), all'analisi strumentale e analisi dati.

L'approccio della metabolomica è per sua natura interdisciplinare e si pone come punto d'unione tra la chimica analitica, la biologia e la bioinformatica. Essenziale infatti nello sviluppo di una metodologia di analisi metabolomica è il supporto delle più avanzate tecnologie della spettrometria di massa e della cromatografia, che permettono di effettuare misure ad alta risoluzione, elevata sensibilità e riproducibilità. Fondamentale è inoltre l'utilizzo di supporti informatici adeguati, in particolare di software dedicati che permettano il processamento degli spettri di massa in modo tale da estrarne l'informazione più significativa. L'elaborazione dei dati metabolomici include la rimozione del rumore di fondo, l'allineamento degli spettri, l'identificazione degli ioni m/z correlati, riconducibili ad un unico metabolita (cluster), e infine l'identificazione delle molecole, sulla base di database e della letteratura (1).

L'identificazione chimica si basa soprattutto sul tipo di ionizzazione a cui una molecola può essere soggetta, agli ioni che si generano dalla frammentazione e dalla polarità degli stessi, che eluiscono a tempi diversi in una colonna cromatografica a fasi inverse.

Una volta identificata, con un certo grado di confidenza, la molecola, o la formula bruta dell'analita selezionato, sulla base del rapporto massa/carica nello spettro di massa, si procede con la ricerca del ruolo biologico che essa ricopre all'interno del sistema metabolico della pianta: si verifica così la possibilità che una molecola possa realmente far parte del pattern metabolico del sistema biologico esaminato.

Per completezza, si è inoltre verificata la presenza e l'abbondanza relativa di particolari molecole d'interesse, già riconosciute come indicatrici di particolari situazioni di stress o il cui accumulo nelle piante è stato correlato agli stress abiotici e biotici, per meglio interpretare i dati ottenuti e cercando di approfondire il loro ruolo biologico.

Tra i composti considerati sono stati monitorati gli acidi idrossicinnamici, l'acido ferulico e quello salicilico, il saccarosio e la prolina. Ognuno di essi svolge un ruolo definito all'interno del metabolismo della pianta e perciò, a seguito di eventi quali modificazioni genetiche o stress ambientale, il loro contenuto è soggetto a variazioni significative dovute alla necessità di adattarsi al cambiamento e sopravvivere anche in condizioni sfavorevoli.

2. Introduzione

2.1 Le piante

In biologia, un organismo vivente, così come è stato definito dal biologo, genetista e storico della scienza tedesco Ernst Mayr, è un'entità soggetta alle leggi del mondo fisico, che si distingue dalle entità inanimate poiché "vengono controllati anche da una seconda fonte di causalità: i programmi genetici".

L'informazione, contenuta nel genoma, viene espressa, tradotta ed ereditata da organismi antenati.

I meccanismi di duplicazione del materiale genetico garantiscono inoltre la notevole varietà e diversità della vita nel nostro universo.

L'uomo, per sua natura, cercò subito di razionalizzare tale varietà: con Linneo, nel 1700, si arrivò a definire la Sistematica o Tassonomia, ovvero la classificazione scientifica delle specie.

La principale suddivisione delle specie viventi è la seguente:

- *Dominio*
- *Regno*
- *Phylum* (Tipo utilizzato in zoologia per gli animali e *Divisione* in botanica per le piante)
- *Classe*
- *Ordine*
- *Famiglia*
- *Genere*
- *Specie* (2).

Il codice internazionale della nomenclatura botanica, applicato con il nome Codice di Vienna nel 1905 e continuamente sottoposto a modifiche e miglioramenti, stabilisce le leggi, esposte in articoli, per una corretta ed esatta classificazione tassonomica delle specie esistenti, sulla base di molte caratteristiche specifiche della pianta.

La forma, il colore, la via riproduttiva e l'adattamento sono parametri fondamentali per tale scopo: ogni parte della pianta deve essere valutata, dalle radici alle foglie, dal tipo di impollinazione al luogo di provenienza ecc.

Il codice attuale è il Codice di Melbourne, in vigore dal 2011 (3).

Il *Dominio* rappresenta la più grande suddivisione delle specie esistenti. I *Dominii* della vita sono due, procarioti ed eucarioti, i primi sono organismi unicellulari di cui fanno parte due regni, *Bacteria* e *Archea*. I regni per gli eucarioti sono invece *Animalia*, *Plantae* e *Fungi*.

Il regno delle piante è costituito da circa 350000 specie di organismi differenti identificati con i nomi di alberi, arbusti, cespugli, rampicanti, succulente, erbe, felci, muschi e molti altri.

Tra le divisioni del regno delle piante vi sono, principalmente, le *Angiospermae*, *Bryophyta*, *Chlorophyta*, *Gymnospermae*, *Pteridophyta* e *Rhodophyta*.

Gran parte delle specie esistenti, circa 250000, appartiene alla divisione delle *Angiospermae* detta anche *Magnoliophyta*. Esse si distinguono dalle altre divisioni poiché, a seguito dell'impollinazione, producono i fiori dai quali derivano i frutti contenenti il seme della stessa.

Le piante della divisione *Bryophyta* sono i muschi, piante che vivono in zone povere di luce e molto umide; quelle *Chlorophyta* sono alghe, soprattutto verdi, da cui si pensa abbiano avuto origine le piante superiori vista la presenza di clorofilla, amido e altri componenti cellulari; le *Gymnospermae* producono semi protetti da specifiche strutture, come le pigne. Le piante appartenenti alle *Pteridophyta* (felci) sono caratterizzate da una riproduzione attraverso spore e non semi come le piante superiori (*Angiospermae* e

Gymnospermae). Infine le *Rhodophyte* sono alghe rosse che vivono in mari caldi, costruendo delle vere e proprie scogliere calcaree.

Le *Angiospermae* si possono distinguere in due classi: monocotiledoni e dicotiledoni (due cotiledoni, foglie con nervatura che costituiscono il sistema circolatorio della pianta).

Esse sono costituite da un apparato radicale, fusto e foglie che costituiscono il germoglio. Lo xilema e floema sono i tessuti vascolari che attraversano il corpo della pianta.

Nelle foglie ha luogo la reazione fondamentale per la vita della pianta ossia la fotosintesi clorofilliana.

In esse, soprattutto nella parte inferiore, sono presenti gli stomi, accessi regolati per il passaggio di anidride carbonica, acqua e ossigeno dall'esterno all'interno della foglia e viceversa.

Nelle piante monocotiledoni, a differenza delle dicotiledoni, essi si dispongono linearmente in modo regolare lungo l'asse circolatorio principale (4).

I processi che permettono la risalita dell'acqua dalle radici fino alle foglie, nonostante l'altezza e la forza di gravità avversa, sono tre: osmosi, capillarità e pressione negativa.

La prima dipende dalla differenza di concentrazione di ioni in acqua tra le cellule della pianta e il suolo che li cede, la capillarità è dovuta a piccolissimi canali xilemici che promuovono la risalita dell'acqua e della linfa ed infine la pressione negativa ossia la depressione che si crea per evaporazione e che permette la risalita dell'acqua anche fino a 100 metri (5).

2.2 La cellula vegetale: componenti e struttura

La cellula è la base della vita: tutti gli organismi, uomo, animali o piante, sono costituiti di cellule, l'unità più piccola che li compone.

Al microscopio ottico è possibile osservare organismi con dimensioni fino a 100 μm : da atomi fino alle singole cellule animali e vegetali.

La cellula è viva: compie tutte le attività necessarie per la sua vita, crescita, riproduzione e morte in modo autonomo, in un vero e proprio ciclo vitale in cui la formazione di una cellula deriva da una cellula genitore.

La cellula può dirsi costituita da 3 blocchi fondamentali: il nucleo, le membrane e il citoplasma. A seconda del tipo di cellula (vegetale o animale) e delle funzioni che svolge, si possono distinguere cellule differenti.

Tra le principali funzioni delle cellule vi è la funzione di protezione o rivestimento, ottenuta con la presenza di addensamenti di cellule; cellule elastiche si occupano della contrazione (cellule muscolari), mentre le cellule nervose si occupano della coordinazione e della comunicazione con le altre cellule (cellule allungate e ramificate).

Le cellule possono essere suddivise in due grandi categorie: eucariote o procariote.

I batteri sono costituiti da cellule procariotiche: cellule molto semplici, più piccole di quelle eucariotiche, in cui non esiste un vero e proprio nucleo ma un ammasso di DNA detto nucleotide. La restante parte della cellula è costituita dal citoplasma, contenente principalmente il citosol, un mezzo semifluido nel quale sono praticamente assenti organelli.

I batteri utilizzano i numerosi filamenti presenti sulla parete cellulare esterna per muoversi e la loro riproduzione avviene per scissione binaria (2).

Per scissione binaria s'intende il processo di duplicazione del DNA presente nel procariota (spesso una singola molecola, legata alle proteine) seguito dalla netta separazione del materiale genico e dalla rottura della cellula genitore in due figlie, avvicinando sempre più i lembi della membrana plasmatica.

Un mondo vasto si apre con gli eucarioti: animali, funghi, vegetali ed esseri umani sono costituiti da cellule eucariotiche.

Innanzitutto si possono distinguere cellule animali e cellule vegetali, tra le quali le maggiori differenze sono: la presenza, nelle piante, di un grosso vacuolo centrale per l'accumulo delle sostanze chimiche, di plastidi come i cloroplasti dove avviene la fotosintesi e una spessa parete cellulare che avvolge la membrana plasmatica che è invece presente anche nelle cellule animali; nella cellula animale rispetto a quella vegetale, è presente un flagello, che permette il movimento della cellula, spostando il fluido circostante.

In figura 1, si riporta una sezione della cellula vegetale.

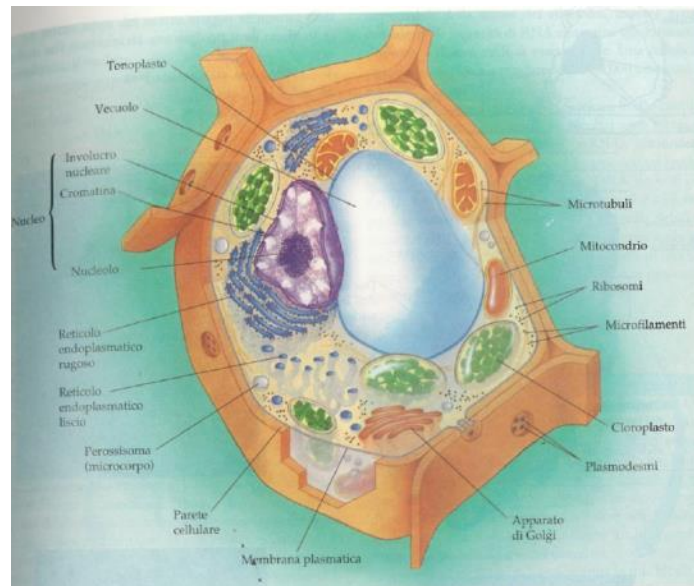


Figura 1 Sezione di una cellula vegetale (2).

- IL NUCLEO E LA DUPLICAZIONE DEL MATERIALE GENETICO

La parte centrale che costituisce la cellula è il nucleo: in esso sono contenute la gran parte delle informazioni genetiche (DNA) necessarie per il controllo e lo sviluppo della cellula.

Il nucleo è separato dal citoplasma della cellula da una doppia membrana fosfolipoproteica, ciascuna di circa 8 nm. La parte proteica, detta lamina nucleare, posta nella parte interna del nucleo, garantisce la stabilità nella forma e nell'ordine del materiale genetico (2).

La doppia membrana presenta però delle discontinuità: vi sono infatti dei pori nucleari, ai bordi dei quali le due membrane sono fuse, che garantiscono l'entrata e l'uscita di alcune molecole, sulla base delle loro dimensioni. Molecole di dimensioni elevate, essenziali per le funzioni della cellula, come proteine o ribosomi, riescono comunque ad utilizzare questo canale poiché la cellula, con particolari recettori, è in grado di ordinarne l'allargamento fin tanto che il passaggio è avvenuto.

Nel nucleo il materiale genetico, associato a proteine, forma i cromosomi, ammassati confusamente nella cosiddetta cromatina. I cromosomi sono l'unità strutturale in cui il DNA si organizza nelle cellule, il cui numero varia da specie a specie.

La cromatina si presenta come un groviglio colorato di cromosomi che, finché la cellula non è pronta per la divisione, non sono distinguibili.

Una struttura è invece ben delineata nel nucleo, nonostante sia priva di una membrana che la separi dal nucleoplasma: il nucleolo. Questo organello è altamente specializzato nella sintesi dei ribosomi e contiene circa 100 proteine differenti e acidi nucleici. Ha una forma sferica irregolare e si occupa della trascrizione del DNA ribosomiale, della lettura e traduzione del rRNA e dell'assemblaggio delle ribonucleoproteine (6).

Ognuna di queste attività avviene in sottostrutture differenti, ognuna contenente i geni necessari per la specifica funzione (2).

Affinché il materiale genetico venga trasmesso alle cellule figlie, le cellule hanno predisposto due sistemi differenti di riproduzione: le cellule eucariotiche si riproducono per meiosi, con la formazione di gameti, o per mitosi, creando cellule identiche.

Nella mitosi, durante la fase di preparazione alla divisione, la cellula copia interamente ogni suo cromosoma, così da formare dei cromatidi fratelli, legati tra loro nel centromero.

Durante la profase, nel citoplasma si forma un fuso mitotico, fascio di microtuboli che si allunga via via distanziando i cromosomi appena formati alla due estremità della cellula. Nella fase di citocinesi, i microtuboli allungano la cellula tanto da creare un solco di scissione nella membrana plasmatica.

Successivamente, il solco diventa così grande da creare una vera strozzatura che dà vita a due nuove cellule perfettamente uguali alla cellula di partenza.

Questo tipo di riproduzione, asessuata, prende forma da un unico genitore, che trasmette tutti i suoi geni alla discendenza: difficilmente, se non a seguito di una mutazione genetica, si hanno variazioni nei caratteri fenotipici della specie analizzata.

Al contrario, la riproduzione sessuata permette una maggiore variabilità: il patrimonio genetico è unico per ciascun individuo, pur presentando delle somiglianze con quelle dei due organismi genitori. La forma di riproduzione è detta meiosi ed avviene in modo differente in base all'organismo in cui si svolge.

In ogni caso, vi è un'alternanza tra una fase aploide e una diploide: aploide è una cellula con una sola serie di cromosomi (23 per l'uomo) e diploide quella derivata dalla fecondazione ossia l'unione dei gameti (cellula riproduttiva) (2).

Il ciclo vitale delle piante e di alcune alghe è chiamato alternanza di generazioni poiché prevede l'alternanza tra uno stadio pluricellulare diploide e uno aploide, che si ripetono in successione.

La generazione diploide è detta sporofito e nelle piante superiori (felci, *gimnosperme* e *angiosperme*) costituisce la pianta vera e propria. Attraverso il processo di meiosi si ha la produzione delle spore. La spora, a differenza dei gameti, non si fonde con un'altra cellula, ma si divide per mitosi per generare la fase aploide, detta gametofito, il quale produrrà i gameti per mitosi, dando di nuovo avvio al ciclo vitale. Infatti, i gameti durante la fecondazione daranno vita allo zigote diploide, che dà vita ad un nuovo sporofito e così via.

Negli organismi vegetali, i gameti maschili sono detti microspore e quelli femminili megaspore che, come suggerisce il nome, hanno dimensioni maggiori.

La fecondazione è detta impollinazione e avviene per trasporto delle microspore nella megaspore, via aria o via acqua (7).

Il ciclo vitale delle *angiosperme*, o piante con seme coperto dal fiore, è rappresentato in figura 2.

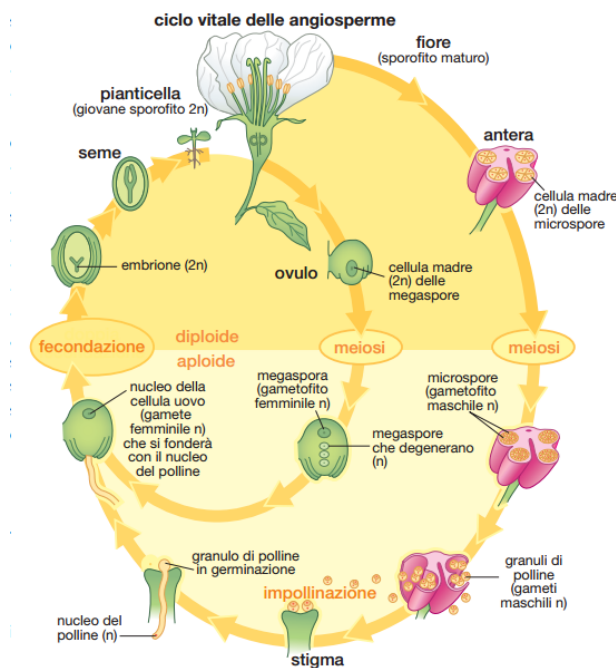


Figura 2 Meiosi nelle angiosperme (7).

Prima che la meiosi avvenga, come per la mitosi, nelle *angiosperme*, è necessario che avvenga la replicazione dei cromosomi, a cui fanno seguito due fasi di divisione cellulare, dette meiosi I e II.

Durante la profase della meiosi, perciò, i cromosomi duplicati omologhi (costituiti ciascuno da due cromatidi legati al centromero) si avvicinano e si appaiano in un processo detto sinapsi: i quattro cromatidi associati, al microscopio appaiono come una tetrade a forma di X detta chiasma.

Poiché i cromatidi si attorcigliano tra di loro, talvolta, tra i due cromosomi omologhi, si può avere il crossing-over, cioè uno scambio tra due cromatidi di tratti equivalenti di cromosoma.

In tal caso si parla di ricombinazione genica: attraverso lo scambio di una sequenza di DNA del cromosoma si determina nella cellula figlia una variazione del codice genetico rispetto a quello della cellula madre, uno dei meccanismi più importanti nell'evoluzione delle specie, funzionale all'adattamento ambientale.

Nella metafase le tetradi si allineano e migrano verso i due poli opposti della cellula. Nella meiosi I i due cromosomi di una tetrade si separano formando due cellule figlie, dalle quali se ne formano quattro: i cromatidi fratelli vengono separati nella meiosi II.

Il numero delle combinazioni possibili di cromosomi nelle cellule figlie dipende dal numero di cromosomi posseduti da un organismo e in ogni caso è un numero elevatissimo.

Le differenze a livello cromosomico appena descritte tra meiosi e mitosi sono ricapitolate in figura 3.

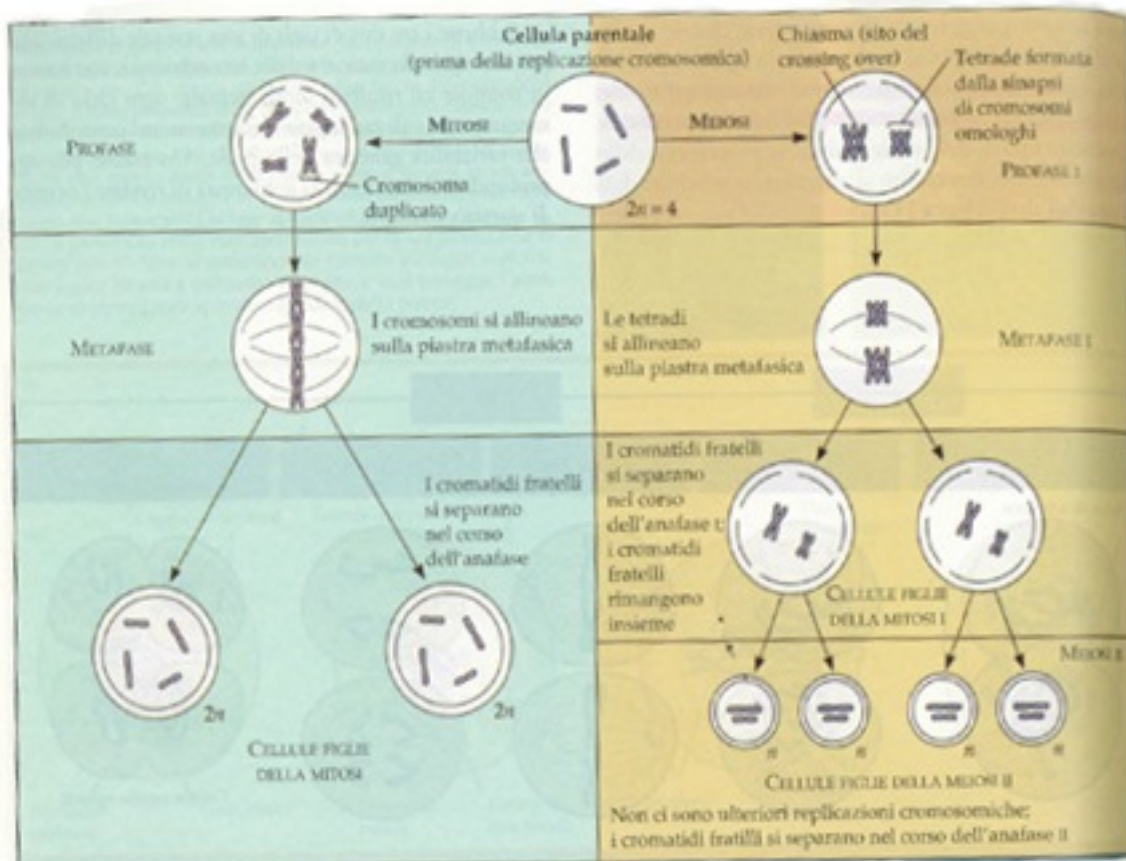


Figura 3 Mitosi e meiosi a confronto (2).

L'alterazione nel numero o nel tipo di cromosomi presenti nel patrimonio genetico può provocare diverse e gravi malattie nel mondo animale. Nelle piante, invece, una o più alterazioni cromosomiche, talvolta non comportano malformazioni o l'arresto del ciclo vitale: nella gran parte dei casi avviano la riproduzione per via vegetativa (mitosi).

- IL CITOPLASMA

Il citoplasma è quella porzione di cellula contenuta all'interno della parete cellulare, costituita da una matrice fluida detta citosol e da una serie di organelli. La posizione degli organelli e la struttura della cellula sono ben definiti: nel citoplasma vi è infatti un reticolo di filamenti proteici che attraversano il citosol e creano un supporto per tutte le altre componenti cellulari (citoscheletro).

La cellula contiene milioni di proteine impiegate in svariate attività: dal metabolismo al trasporto, queste necessitano di spostarsi nella cellula o di essere ancorate ad essa. Il citoscheletro è costituito da filamenti fibrosi interconnessi, che permettono la mobilità interna ed esterna.

È costituito da tre tipi di proteine: famiglia dei filamenti intermedi, dell'actina e della tubulina (6).

I filamenti intermedi, di cui fanno parte le lamine, le cheratine, le vimentine e i filamenti neuronali, hanno diametro di dimensioni di 10-15 nm e sono formati da numerose catene monomeriche aggrovigliate a formare un filamento. Ogni monomero ha un corpo centrale fisso a bastoncino e alle estremità dei domini globulari diversificati.

I filamenti intermedi sono responsabili della resistenza ed elasticità della cellula. Nelle cellule vegetali, però, questo compito è svolto soprattutto dalla parete cellulare, mentre ai filamenti non resta che l'ancoraggio interno dei vari compartimenti tra cui il nucleo (6).

I filamenti actinici, invece, sono quelli con dimensioni inferiori (6-7 nm). L'actina è una proteina globulare che presenta polarità opposte alle estremità: l'allungamento di catena avviene all'estremità con segno negativo. La differenza di polarità facilita il processo di polimerizzazione, in cui la fase di iniziazione avviene a partire da tre molecole di actina. L'attacco di diverse proteine sulle molecole di actina di partenza portano alle diverse funzioni di questi filamenti: arresto, copertura, contrattilità o cambiamento della forma.

Infine vi sono i microtubuli, strutture proteiche cilindriche cave dal diametro esterno di 25 nm, costituite da strutture dimeriche. Ogni dimero è formato da una molecola di tubulina α e una β . A partire da un piccolo anello costituito da entrambe le forme di tubulina, prende avvio la rapida propagazione del polimero, presente sotto forma di microtubuli.

Per quanto riguarda le loro funzioni, i microtubuli formano un'impalcatura interna per i flagelli e le ciglia e garantiscono il trasporto di alcuni organuli e vescicole verso l'interno della cellula (6).

Il citosol, dove si trovano il citoscheletro e gli organuli, è un colloide costituito per il 70% da acqua ad un pH vicino a 7. In esso sono contenuti ioni, sostanze nutritive, ma anche prodotti di scarto delle reazioni che avvengono al suo interno. La presenza di proteine al suo interno ne determina la consistenza gelatinosa.

In esso avvengono molte delle fasi metaboliche cellulari tra cui la degradazione di molecole organiche (glicolisi, vedi paragrafo 2.3.1.3) e la sintesi di molte macromolecole.

- IL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Il reticolo endoplasmatico è un insieme di membrane avvolte su se stesse in modo irregolare in tubuli o sacche appiattite (cisterne); esso è legato al nucleo come prolungamento dei pori dell'involucro nucleare (2).

Il reticolo è costituito per il 30-50% da fosfolipidi e per la restante parte da enzimi, catalizzatori di specifiche reazioni chimiche.

Si distinguono il reticolo endoplasmatico liscio (REL) e quello rugoso (RER), che differiscono per struttura e forma.

Il REL, il cui nome deriva proprio dalla superficie liscia che lo caratterizza, è sede di vari processi metabolici quali la sintesi dei lipidi, degli ormoni steroidei, del metabolismo del glicogeno e della detossificazione di sostanze altrimenti dannose per l'organismo. Un'altra funzione è la gestione dell'entrata e della fuoriuscita di ioni calcio dal citoplasma all'interno delle cisterne e viceversa. Il reticolo rugoso invece è così chiamato

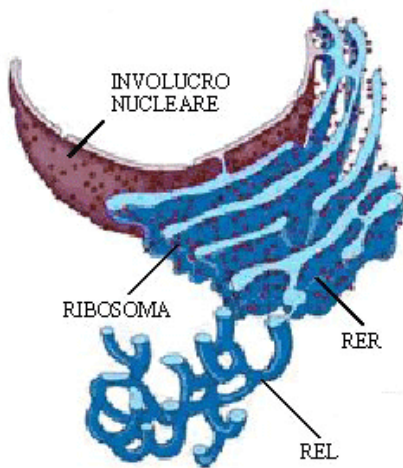


Figura 4 Sezione dei reticoli endoplasmatici (2).

per la presenza dei ribosomi, particelle sferiche di diametro 30 nm, organizzate in catene spiraliformi di 8-12 unità: queste strutture sono dette polisomi (8).

Nel RER, grazie alla presenza dei ribosomi, avviene la sintesi proteica mediante la formazione del complesso ribosoma-mRNA (traduzione). Le proteine sintetizzate vengono immediatamente allontanate dal tessuto rugoso verso la parte interna delle sacche (lume) attraverso un poro della membrana (8): sono soprattutto glicoproteine, dove il legame tra oligosaccaridi e proteine si forma in una reazione enzimatica catalizzata.

Le proteine vengono inglobate in una parte di reticolo rugoso che si stacca sotto forma di una vescicola di trasporto, che tiene separate tali proteine da quelle prodotte dai ribosomi liberi: il distacco avviene mediante un meccanismo di endo ed esocitosi.

I fosfolipidi e le proteine prodotte servono inoltre a sintetizzare il reticolo stesso in quanto si aggiunge membrana al reticolo o ad altre cellule (2).

Un efficiente sistema di trasporto permette lo spostamento delle membrane neosintetizzate, delle proteine e anche di lipidi e ormoni prodotti, ad altre cellule.

- I RIBOSOMI

I ribosomi sono organelli citoplasmatici, cellule compatte costituite da ribonucleoproteine (rRNA e proteine), responsabili della sintesi proteica nella cellula.

Essi vengono prodotti nel nucleo, assemblati da RNA, prodotto sia nel nucleolo che in altre regioni del nucleo, e proteine sintetizzate nel citoplasma: essi diventano attivi solo dopo la loro espulsione dal citoplasma. Nel citoplasma si presentano in forma libera o adesi al reticolo endoplasmatico mediante legami peptidici. I ribosomi perciò hanno un ruolo fondamentale nel trasferimento del codice genetico.

- L'APPARATO DI GOLGI

L'apparato di Golgi è un vero e proprio porto per la cellula: è un centro di produzione, immagazzinamento, ricezione e spedizione dei prodotti provenienti dal reticolo endoplasmatico e trasportati mediante le vescicole di trasporto. L'apparato di Golgi è costituito da una serie di sacche schiacciate, impilate l'una sull'altra, tutte collegate tra loro.

Ai poli della pila si possono distinguere una faccia cis di formazione e quella trans, di maturazione.

I ruoli sono numerosi: assemblaggio dei polisaccaridi della parete cellulare, sintesi delle catene laterali di oligosaccaridi legati alle glicoproteine di membrana e produzione dei glicolipidi della membrana plasmatica e del tonoplasto. Una volta ri-assemblato, il materiale proveniente dal RE viene trasportato all'esterno con un processo di esocitosi verso la superficie cellulare o i vacuoli (2).

- I VACUOLI

I vacuoli nelle cellule vegetali occupano circa il 30-80% del volume totale della cellula e si trovano circa nella sua parte centrale. I vacuoli sono siti di accumulo di varie sostanze nutritive: in essi si trovano ioni inorganici (potassio e cloruro), composti organici come le proteine, prodotti di riserva, enzimi preposti, all'occorrenza, alla degradazione di tali composti e intermedi di reazione, dannosi se accumulati nel citoplasma.

La membrana che separa il vacuolo della cellula vegetale dal citoplasma, che si ritrova schiacciato verso la membrana plasmatica, si dice tonoplasto che, come tutte le membrane, permette il passaggio selettivo di

alcuni soluti. Avendo gli enzimi necessari, il vacuolo agisce attivamente nel riciclo delle componenti cellulari. L'assorbimento di acqua per osmosi permette alla pianta di aumentare le dimensioni della parete cellulare e aumentarne la rigidità con un basso dispendio energetico poiché si sfrutta la pressione stessa dell'acqua (2).

Il vacuolo è in grado di immagazzinare sostanze tossiche come alcaloidi, composti fenolici o glucosidi cianogenici, ma anche pigmenti come le antocianine, responsabili della colorazione di petali e frutti (6).

- I PEROSSISOMI

I perossisomi, o microcorpi, sono piccoli organelli (diametro minore di 1 μm) compartimentati, delimitati da un'unica membrana, in grado di trasferire l'idrogeno all'ossigeno per produrre acqua ossigenata (H_2O_2) come sottoprodotto di reazioni metaboliche e viceversa convertirla in acqua, vista la sua tossicità, in reazioni catalizzate dagli enzimi presenti nell'organello. L'acqua ossigenata può essere usata per la rottura degli acidi grassi in molecole più piccole o per la detossificazione dell'alcol.

Gli acidi grassi sono abbondantemente presenti nei semi delle piante, ricchi di oli che vengono convertiti in zuccheri liberando energia.

- I MITOCONDRI

L'energia, sotto forma di ATP, viene prodotta durante il processo catalitico della respirazione cellulare: essa avviene nei mitocondri.

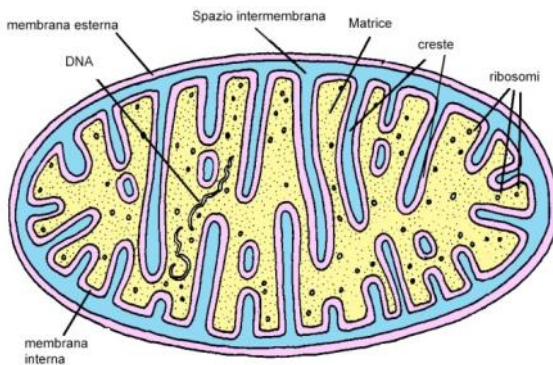


Figura 5 Il mitocondrio (8).

I mitocondri sono degli organi dotati di due membrane, le cui proteine sono prodotte dai ribosomi liberi.

Sono lunghi da 1 a 10 μm e sono capaci di muoversi, cambiare forma e soprattutto di dividersi poiché, insieme al nucleo e ai cloroplasti, sono gli unici a possedere il DNA.

Ciascuna membrana è costituita da un doppio strato fosfolipidico: la membrana esterna, liscia e distesa, separa il citosol mitocondriale dall'esterno, una seconda membrana, interna, con numerosi avvolgimenti (creste), racchiude la matrice mitocondriale, sito in cui avvengono

gran parte delle reazioni chimiche.

La membrana è costituita da porine, proteine in grado di formare pori (strutture tubolari costituite da polimeri di porina disposti a filamento) e permettere la permeazione di molecole aventi un determinato range di peso molecolare (8).

La membrana interna, invece, permette il passaggio solo a piccole molecole o ioni, come protoni, e, a causa della sua forma, possiede un'elevata superficie utile per incrementare la produttività della respirazione cellulare (2).

- I PLASTIDI

I plastidi sono gli organelli più grandi che si trovano nella cellula delle piante e delle alghe: essi si occupano della fotosintesi, della riserva di molti prodotti e della sintesi di alcune molecole, visto che, come i mitocondri, sono semiautonomi e possiedono parte del patrimonio genetico dell'organismo (6).

Sono responsabili della biosintesi delle clorofille, di alcuni carotenoidi, purine, pirimidine e di acidi grassi, che hanno luogo unicamente nello stroma dei plastidi.

Anche i plastidi possiedono due membrane, entrambe ben distese, tra le quali si trova lo spazio intermembrana. Come dice il nome, i plastidi possono variare la propria forma, dimensione e funzione; ne

esistono diversi tipi, ma in generale sono costituiti da tilacoidi (sistema di membrane appiattite) impilati uno sull'altro a formare un grano (una pila di tilacoidi), uniti tra loro da una membrana ramificata detta stroma. Il mezzo in cui i grani sono immersi è lo stroma, un fluido denso e granulare.

I plastidi possono essere suddivisi in cloroplasti, amiloplasti e cromoplasti: tutti derivano da cellule preesistenti dette proplastidi, presenti nelle parti giovani della pianta.

Hanno un diametro compreso tra 0.2 e 1 μm con forma sferica o ovale. In alcune regioni degli stessi si possono individuare piccole porzioni di DNA in fibrille.

Gli amiloplastidi sono organi di riserva di amido e sono privi di stroma tra i granuli di amido. Sono incolori e la loro sintesi avviene nelle radici dei tuberi.

I cromoplasti sono gialli, arancioni o rossi a causa dei diversi rapporti di carotene e xantofille presenti. Tali sostanze determinano la colorazione dei fiori, frutti e radici.

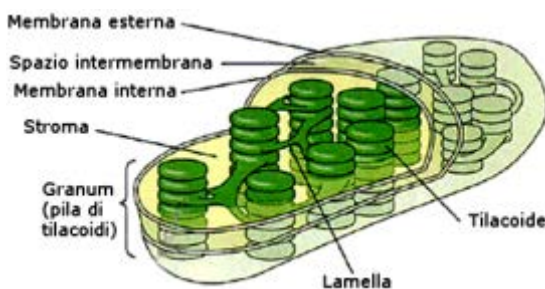


Figura 6 Cloroplasto (9).

I cloroplasti invece contengono il pigmento verde clorofilla e tutti gli enzimi essenziali per la fotosintesi.

Sono emisferici o a forma di lente, misurano 5-8 μm di lunghezza e 3-4 μm di larghezza. I cloroplasti contengono cromosomi sferici a doppio filamento, necessari per la sintesi delle proteine, e l'energia necessaria per convertire la CO_2 in zucchero (6).

La membrana tilacoidale (interna), come per i mitocondri, è impermeabile a molte molecole e ioni; quella esterna ne

permette il passaggio attraverso i pori. Nella membrana interna avvengono tutte le reazioni di questo organello, principalmente reazioni di ossido-riduzione (9).

Tali membrane sono ricche di galattolipidi e non fosfolipidi come le altre membrane.

I cloroplasti possono generarsi da soli a partire da un altro cloroplasto; gli altri organelli invece, oltre alla derivazione dai proplastidi, possono essere prodotti attraverso vie di interconversione da un tipo di organello all'altro.

- LE MEMBRANE PLASMATICHE

Come si è già evidenziato, le membrane sono essenziali per la vita di una cellula e di conseguenza per l'organismo. La membrana principale è quella plasmatica, che separa l'ambiente esterno dall'interno della cellula. Tale membrana, a differenza di quelle di cui si è già parlato, è assolutamente impermeabile a qualsiasi molecola. Si tratta di una vera e propria barriera, ma lavorando sulle proprietà delle proteine che la costituiscono, è possibile renderla permeabile selettivamente ai soli elementi essenziali alla cellula per lo svolgimento delle sue funzioni vitali (9). Tutte le membrane cellulari sono costituite da un doppio strato lipidico associato a proteine. Oltre che da barriera, le membrane cellulari fungono anche da impalcatura per tutte le strutture presenti nella cellula.

Le cellule vegetali, oltre alla membrana plasmatica, sono rivestite dalla parete cellulare, che ne determina la forma e impedisce l'eccessivo assorbimento di acqua (2).

La parete cellulare è più spessa della membrana plasmatica ed è costituita da una parete primaria, formata alla nascita della cellula, e da una seconda parete ottenuta dall'aggiunta di altra cellulosa durante la crescita della cellula o che la cellula secerne verso la membrana plasmatica. Tra una cellula e l'altra vi è uno strato detto lamella mediana costituito da pectina, un polisaccaride viscoso che le tiene unite e determina la porosità di alcune pareti cellulari (2).

Le membrane plasmatiche sono principalmente costituite da lipidi e proteine, ai quali spesso sono associati anche dei carboidrati. I lipidi di membrana (fosfo- o glicolipidi) sono molecole relativamente piccole che, spontaneamente si dispongono a foglietti lineari per formare un doppio strato lipidico: la coda idrofobica di un lipide interagisce con la coda di un secondo lipide, escludendo l'accesso di acqua. Le teste, invece, interagiscono con il mezzo acquoso che le circonda, andando a definire il doppio strato lipidico in cui le code fungono da barriera alla permeabilità di ioni e molecole polari (9).

I lipidi presenti nelle membrane sono diversi da pianta a pianta, ma anche da tessuto a tessuto. Questa variabilità ha suggerito che la composizione della membrana, in termini di lipidi, non ha molto peso sulle funzioni che essa svolge: essenziale per le piante è il mantenimento della fluidità delle membrane all'interno di un intervallo adeguato alla pressione osmotica e allo svolgimento delle funzioni, indipendentemente dalle basi che la formano (6).

Le proteine che si legano ai lipidi, invece, forniscono la cellula di canali, pompe, recettori ed enzimi: esse si dispongono in modo tale da creare dei varchi per alcune molecole e per fungere da sito attivo per alcuni substrati. Per esempio, ioni come Na^+ o K^+ , dopo essersi liberati delle molecole di acqua di solvatazione, entrano, anche se con difficoltà, nella parte idrofobica della membrana, diffondono in essa fino a uscire e ripristinare le interazioni precedenti.

Ciò che determina il passaggio attraverso una membrana è l'esistenza di un gradiente di concentrazione tra l'esterno e l'interno della cellula e la solubilità della molecola all'interno dell'ambiente idrofobico. In alcuni casi il gradiente di concentrazione sfavorisce l'entrata della molecola nella cellula: in questo caso esistono specifici canali, come il canale Na^+-K^+ , che per trasporto passivo, fanno entrare le molecole nonostante le difficoltà termodinamiche (9).

Vi sono inoltre delle proteine di trasporto che permettono a ioni e molecole polari di entrare nella cellula senza andare a contatto con il mezzo idrofobico: il processo che ne deriva è detto diffusione facilitata.

Per le sostanze cariche, in particolare per i protoni, esiste la pompa protonica, in grado di facilitare il passaggio di ioni sfruttando la differenza di potenziale di membrana, negativo all'interno dell'ambiente cellulare e positivo all'esterno.

Tale meccanismo permette di immagazzinare l'energia necessaria alla cellula per diversi lavori cellulari.

I meccanismi di trasporto descritti non sono sufficienti per il movimento, attraverso la membrana, di molecole di grandi dimensioni come proteine o polisaccaridi: il doppio strato fosfolipidico crea delle sacche che racchiudono le molecole da trasportare, si richiudono su se stesse fino a staccarsi dalla membrana d'origine, dando vita a delle vescicole. Durante i processi di endo- ed esocitosi le sostanze necessarie alla cellula vengono incorporate e poi rilasciate agli organi in grado di utilizzarle.

- LA PARETE CELLULARE

Per quanto riguarda la presenza di acqua nelle piante, l'equilibrio idrico è gestito dalla parete cellulare che riveste le cellule. La parete però interviene solo nel caso in cui la cellula si trovi in un ambiente iposmotico (concentrazione più bassa): la cellula si gonfia via via che l'acqua penetra per osmosi. La parete elastica si dilata fin tanto che la forza esercitata dalla parete uguaglia quella dell'acqua per entrare. In tali condizioni iso-osmotiche, il movimento netto dell'acqua è pari a zero e la cellula diventa molle (2).

Per osmosi si intende il processo di passaggio di acqua attraverso una membrana, da una soluzione diluita ad una con concentrazione maggiore di soluto.

La parete cellulare, prodotta dai protoplasti, è una struttura molto organizzata, composta da vari polisaccaridi, proteine e sostanze aromatiche. I polisaccaridi conferiscono alla parete la sua stabilità strutturale e sono costituiti da più monomeri a sei atomi di carbonio e uno a cinque (glucosio, mannosio, galattosio, acido galatturonico, acido glucuronico, acido mannuronico, apiosio, ramnosio, fucosio, xilosio e arabinosio).

Una percentuale del 5-10% della parete è inoltre costituita da polipeptidi.

La cellulosa è il polisaccaride vegetale più diffuso, presente sotto forma di microfibrille. Il legame tra i nuclei di glucosio è 1,4'. Il callosio invece presenta legami 1,3' glucosidici che permettono la formazione di strutture ad elica, evidenziate in cellule vegetali in via di sviluppo o in risposta a ferite o attacchi da parte di funghi (6).

Attorno alle microfibrille, mediante legami idrogeno, si avvolgono degli altri polisaccaridi che saldano e rinforzano la struttura: tra questi vi sono le emicellulose, gli xiloglucani e i glucuronoarabinoxilani, diffusi sia nelle piante mono- che dicotiledoni.

La parete cellulare primaria è costituita da due o tre reticoli indipendenti: nell'intelaiatura di polisaccaridi e glicani è immersa una seconda struttura (la matrice pectinica). Vi è poi un terzo reticolo indipendente formato da proteine strutturali o da una rete di fenilpropanoidi.

Tra le sostanze aromatiche presenti nella parete cellulare vi sono soprattutto acidi idrossicinnamici come il ferulico o il p-cumarico (6).

2.3 Metabolismo e metabolomica

Per metabolismo (dal greco cambiamento) s'intende quella fitta ed elaborata "mappa stradale" dove idealmente si possono inserire tutte le reazioni chimiche che si verificano all'interno della cellula e in cui sono coinvolti intermedi e prodotti chimici detti metaboliti. Lungo le vie metaboliche, altamente ramificate ed altrettanto organizzate e ordinate, le molecole subiscono modificazioni chimiche, in reazioni catalizzate da enzimi, che portano alla formazione di elementi fondamentali per lo sviluppo, crescita e riproduzione del sistema considerato (2). Gli enzimi inoltre hanno la capacità di gestire l'avvio o l'interruzione di uno o più processi, sulla base della richiesta di un prodotto o di energia dal sistema, di rispondere in modo diverso a fenomeni inattesi come modificazioni, stress o presenza di agenti contrastanti.

In gioco non vi è solo materia, che via via si trasforma durante il processo, ma anche energia: la rottura di molecole complesse in molecole semplici, facilmente assimilabili, comporta la formazione di energia, utilizzabile dalla cellula, in un processo denominato via catabolica. Un esempio è la respirazione cellulare, in cui il glucosio e altri materiali organici vengono degradati ad acqua, CO₂ ed energia utilizzabile per compiere lavoro a livello cellulare.

Nel metabolismo di un organismo, vi sono però anche vie anaboliche ossia percorsi chimici in cui è necessario immettere energia affinché la reazione avvenga o arrivi a compimento. Un esempio sono i processi inversi alla degradazione di molecole complesse, cioè la loro sintesi a partire da piccole unità di base.

Un sistema biologico è altamente organizzato: vie cataboliche e anaboliche si intrecciano in modo tale che l'energia liberata dai primi processi, possa essere disponibile e utilizzabile dalle reazioni chimiche dei processi anabolici (2). Una rappresentazione delle vie metaboliche per la produzione dei metaboliti primari e secondari è illustrata in figura 7.

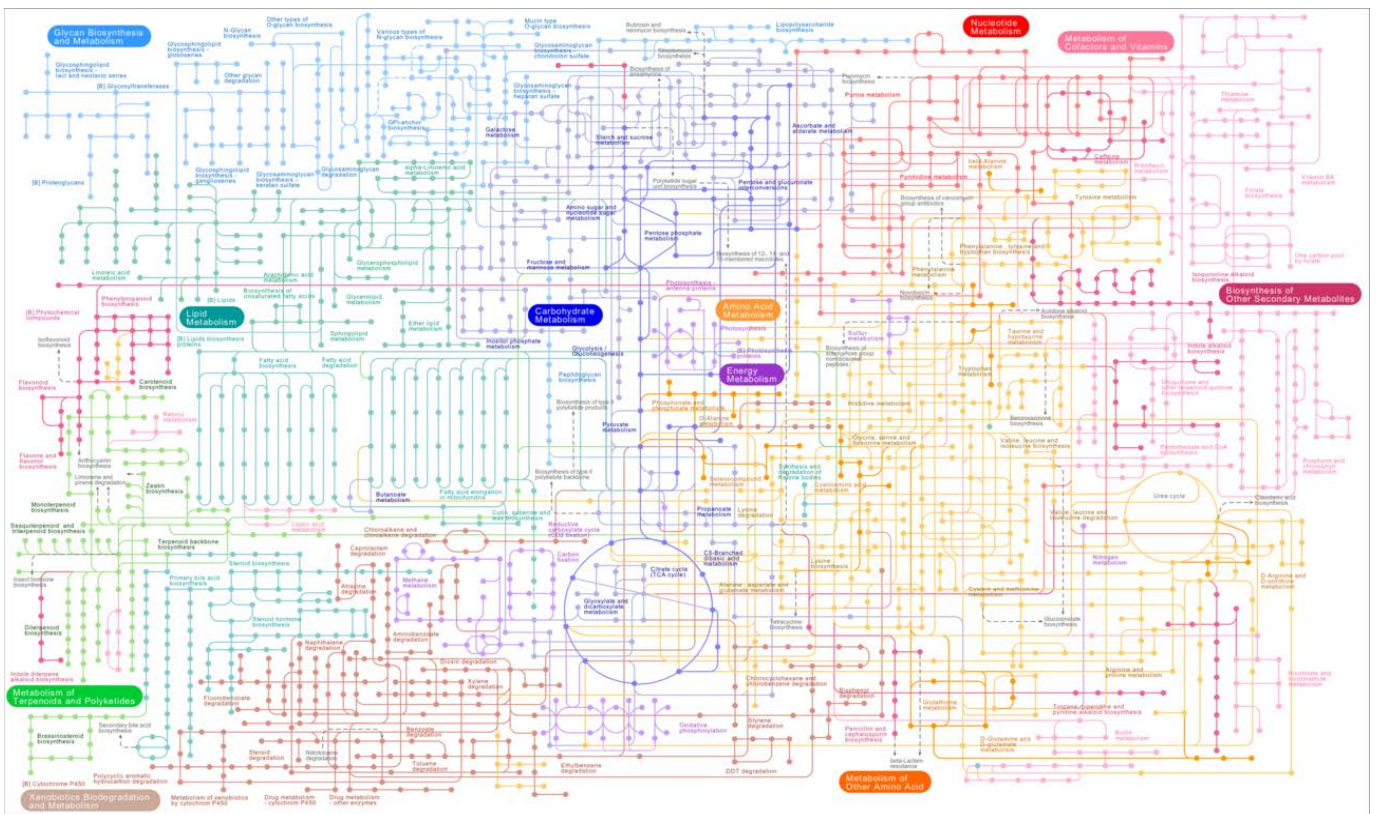


Figura 7 Complessità del metabolismo (10).

I metaboliti sono tutte quelle molecole, solitamente piccole, che costituiscono i blocchi fondamentali per la vita di un organismo. Le piante sono in grado di sintetizzare un numero elevatissimo di composti chimici essenziali per la propria crescita e sviluppo. Vi sono però dei metaboliti che non fanno parte della struttura molecolare di base delle cellule della pianta e che non sono direttamente coinvolti nei meccanismi fondamentali per la vita di un organismo, ma che possono essere prodotti nei suoi tessuti o organi in particolari fasi del proprio accrescimento (8). Questi composti, che hanno un ruolo essenziale in relazione con l'ambiente esterno, sono detti metaboliti secondari. Tra i metaboliti secondari più comuni si ricorda la clorofilla, molecola fondamentale per la vita della pianta, visto il ruolo attivo nella fotosintesi clorofilliana, che non è presente nel pattern naturale della pianta ma deve essere prodotta dal sistema.

I metaboliti secondari vengono sintetizzati da organi differenti, determinando una notevole differenziazione tra le piante. Molte specie posseggono uno specifico pattern di metaboliti secondari, specie che non verrebbero distinte mediante lo studio dei metaboliti primari, poiché prodotti dalla stessa via biochimica anche in specie differenti (11).

Le famiglie maggiormente caratterizzate mediante l'analisi dello specifico pattern metabolico della pianta sono le *Solanaceae*, *Papaveraceae* e le *Apiaceae* (8).

Carboidrati, amminoacidi, acidi nucleici, acidi grassi e acidi organici sono metaboliti primari, coinvolti nella crescita, sviluppo, respirazione, fotosintesi e nella sintesi di ormoni e proteine delle piante (11).

Le piante, inoltre, come gli animali, sono in grado di produrre ben oltre 100.000 metaboliti secondari. La struttura di quasi la metà dei metaboliti prodotti non è stata ancora definita, vista la notevole varietà e complessità chimica (12).

Tra i metaboliti secondari vi sono molecole come flavonoidi, carotenoidi, steroli, acidi fenolici, alcaloidi e glucosinolati (composti glucosidici contenenti zolfo).

Questi assumono importanza nell'espressione del colore della vegetazione e dei fiori, proteggono la pianta da attacchi di erbivori e microorganismi, attraggono gli impollinatori (11).

I metaboliti secondari sono inoltre molto utilizzati in campo industriale per la produzione di profumi, aromi, coloranti, pesticidi e prodotti farmaceutici (12).

I metaboliti secondari vengono spesso prodotti in risposta a fattori ambientali come luce, variazioni di temperatura, stress idrico, chimico, ossidativo, osmotico (8): spesso la risposta ai cambiamenti delle condizioni ambientali è diversa e specifica per le diverse tipologie di piante, determinando variazioni metaboliche caratteristiche per ciascuna specie. Tuttavia alcuni meccanismi di risposta che coinvolgono la produzione di metaboliti si riscontrano in molte piante ed è quindi sempre possibile identificare processi comuni.

Il metabolismo può essere profondamente danneggiato da cambiamenti ambientali, stress abiotici o biotici che richiedono un aggiustamento "molecolare" coinvolgendo in particolare il meccanismo biosintetico di carboidrati, amminoacidi e ammine, i meccanismi di segnalazione e regolazione fisiologica della pianta (13). La pianta reagisce con la produzione di particolari composti chimici per porre rimedio al danno subito o poter sopravvivere, attraverso la variazione della concentrazione di molecole con particolari ruoli fisiologici, trasportandole o accumulandole in compartimenti specifici.

Gli stress che maggiormente creano uno sbilanciamento dell'equilibrio chimico e fisiologico di un sistema vegetale sono la scarsità di acqua, le temperature estreme (caldo e freddo), la radiazione di fotoni, la contaminazione da batteri o virus, le elevate concentrazioni di sali e metalli pesanti (13).

La principale reazione ad una condizione di stress nella pianta è la sintesi e l'accumulo di "soluti compatibili" ossia piccole molecole organiche in grado di garantire la sopravvivenza, mantenere l'equilibrio osmotico della pianta nonostante ad esempio l'alta salinità o la carenza di acqua. Tra queste molecole si trovano amminoacidi (asparagina, prolina e serina), ammine (poliammine e glicina betaina), GABA (acido γ -

ammino-N-butirrico), carboidrati (fruttosio, saccarosio, trealosio, inositolo) e antiossidanti come il glutatione e l'ascorbato (13).

L'acido abscisico prodotto in condizioni di scarsità di acqua svolge un ruolo centrale nei meccanismi di difesa in quanto con il suo accumulo si avvia il processo di chiusura degli stomi per ridurre la traspirazione.

2.3.1 L'ENERGIA

L'energia è definita come la capacità di un sistema di compiere lavoro, cioè cambiare il modo in cui sono disposte una serie di entità materiali (2), proprietà che può essere scambiata tra sistemi diversi attraverso il lavoro stesso.

Vi sono numerosi tipi di energia: quella cinetica, posseduta da qualsiasi sistema in movimento; quella potenziale, che dipende dalla configurazione o disposizione di un oggetto rispetto ad un secondo oggetto con cui interagisce; termica, posseduta da un qualsiasi corpo con temperatura superiore allo zero assoluto; luminosa, nucleare, chimica, elettrica ecc.

La Termodinamica è lo studio delle trasformazioni dell'energia da una forma all'altra, che si verificano su un campione di materia o sistema (2).

La prima legge della termodinamica o di conservazione dell'energia stabilisce che l'energia può essere trasferita, trasformata ma non distrutta né creata: il metabolismo di una cellula è un esempio di perfetto e funzionante scambio di energia all'interno del sistema.

Lo scambio o il trasferimento dell'energia però comporta un aumento del disordine del sistema e perciò l'aumento dell'entropia, come definito dalla seconda legge della termodinamica. Quasi tutta l'energia, nelle sue diverse forme, viene convertita in calore, la forma di energia più degradata, liberato nell'ambiente esterno.

Un processo che non richiede energia dall'esterno per avvenire si dice processo spontaneo, mentre sarà non spontaneo un processo che richiede energia come quelli presenti nelle vie anaboliche del metabolismo. In qualsiasi processo spontaneo, l'energia libera di Gibbs del sistema tende a diminuire: l'energia libera di Gibbs è l'energia del sistema utilizzabile per compiere lavoro quando la temperatura del sistema è costante in ogni sua parte (2). Essa è descritta dall'equazione [1].

$$G = H - TS$$

Equazione 1 Espressione dell'energia libera di Gibbs (2).

con H l'energia totale del sistema e S l'entropia.

Ciò sta a indicare proprio come non tutta l'energia H del sistema possa essere utilizzata per compiere lavoro: vi è infatti un termine sottrattivo in cui la temperatura (in gradi Kelvin) e l'entropia misurano la tendenza del sistema ad allontanarsi dall'ordine e quindi disperdere energia "utile" in calore.

Perché G diminuisca (in una trasformazione) o meglio la variazione di energia libera ΔG , il sistema deve cedere energia, facendo diminuire l'energia totale, oppure deve trasformare energia in calore, cioè aumentando l'entropia del sistema.

Dal punto di vista strettamente chimico, il termine spontaneo si riferisce a un processo esoergonico (accompagnato dalla liberazione di energia) e perciò legato ad un $\Delta G < 0$: la respirazione cellulare per esempio ha $\Delta G = -686$ kcal/mol (2).

La fotosintesi che avviene nelle foglie delle piante, reazione inversa alla respirazione cellulare, è invece una reazione endoergonica, con valore di ΔG uguale in modulo, ma con segno opposto.

Qualunque sia il lavoro compiuto dalla cellula, meccanico, di trasporto o chimico, la molecola fonte di energia per compierlo è l'adenosintrifosfato, ATP.

L'ATP è un nucleotide costituito da una base azotata, l'adenina, uno zucchero, il ribosio e tre gruppi fosfato: la perdita di un gruppo fosfato per idrolisi forma l'ADP e libera energia, prodotti più stabili dell'ATP.

In presenza di specifici enzimi, l'energia prodotta non viene "persa" in calore ma utilizzata per fosforilare una molecola accettore, ora più reattiva, in grado di compiere lavoro cellulare (2).

Successivamente, l'ADP può aggiungere il gruppo fosfato, consumando energia da meccanismi catabolici, per ripristinare una molecola di ATP e proseguire nel ciclo.

Nei mitocondri delle cellule eucariotiche avviene il più importante tra i processi catabolici, la respirazione cellulare, vista la disponibilità di tutto il materiale necessario per le reazioni chimiche coinvolte.

Alla base di questo processo vi è una reazione di ossido-riduzione: il materiale organico si ossida a CO₂ e l'ossigeno è ridotto ad acqua. Gli elettroni trasferiti dalla componente organica all'ossigeno perdono così energia potenziale, trasformata però in energia chimica utilizzabile per compiere del lavoro.

Il risultato, sottraendo l'energia via via utilizzata, è la formazione di 36 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio degradato.

Il materiale organico di partenza per la produzione di energia, oltre agli zuccheri e carboidrati, è costituito da proteine (polimeri di amminoacidi) e grassi (glicerolo e acidi grassi) (2).

La reazione inversa è la fotosintesi clorofilliana: le piante riescono a trasformare in energia biologicamente utilizzabile molto meno dell'1% dell'energia irradiata dal sole (8).

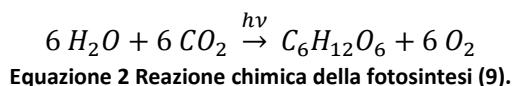
Questo processo è un esempio di via anabolica, mediante la quale si trasformano composti inorganici in composti organici primari.

Il metabolismo è un elegante meccanismo sincronizzato: per sopravvivere ogni parte della cellula ha bisogno delle altre perché come senza ATP non vengono prodotte le proteine dai singoli amminoacidi, così senza la degradazione delle proteine non si produce ATP (14).

2.3.1.1 LA FOTOSINTESI

La fotosintesi clorofilliana è quel processo chimico che permette di trasformare in molecole organiche, sfruttando l'energia luminosa proveniente dal sole, l'anidride carbonica presente nell'atmosfera.

In linea generale la reazione chimica che avviene durante la fotosintesi è la seguente:



Come evidenziato nell'equazione [2], materiale inorganico come anidride carbonica viene trasformato in materiale organico come il glucosio. Il prodotto di scarto di questa reazione è ossigeno molecolare, liberato nell'atmosfera attraverso gli stomi.

Questo processo avviene unicamente nei vegetali poiché nelle cellule delle loro foglie sono presenti i cloroplasti, sito di reazione della fotosintesi.

I cloroplasti sono in grado di catturare l'energia luminosa e convertire la corrispondente radiazione elettromagnetica in energia chimica.

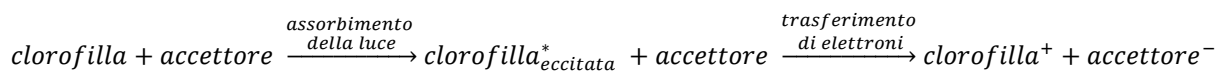
Il primo evento nella fotosintesi è l'assorbimento della luce da parte di una molecola fotorecettore: una molecola in grado di assorbire la luce è detta pigmento.

Il fotorecettore più comune presente nei cloroplasti delle piante verdi è la clorofilla, costituita da quattro anelli pirrolici (porfirina) sostituiti, legati a uno ione magnesio centrale. Per entrambe le varietà di clorofilla presenti negli eucarioti (a e b) il gruppo caratteristico è il fitolo, un alcol a 20 atomi di carbonio estremamente idrofobico, legato a uno dei quattro pirroli. Le due clorofille si distinguono per un

sostituente aldeidico o metilico su un altro pirrolo e ciò ne determina la differente banda di assorbimento della luce nella regione della luce visibile (9).

Un secondo gruppo di pigmenti è quello dei carotenoidi, pigmenti fotosintetici comprendenti i caroteni e le xantofille, composti alla cui base vi sono dei terpeni, unità di isoprene unite tra loro, in grado di assorbire la radiazione solare in una regione compresa tra i 400 e 500 nm, che determina le colorazioni giallo- arancio e rosso dell'autunno (6).

L'energia luminosa assorbita determina il passaggio di un elettrone della molecola del fotorecettore dal suo livello fondamentale al primo livello energetico eccitato. Nei fotorecettori l'energia d'eccitazione, liberata dall'elettrone quando ritorna nello stato fondamentale, non viene dispersa sotto forma di calore (come accade per la maggior parte delle molecole che assorbono luce) ma può essere catturata da elettroni vicini che compiranno un salto energetico verso uno stato a energia maggiore (trasferimento di energia per risonanza) oppure l'elettrone eccitato verrà trasferito direttamente ad una molecola accettore, in uno stato di eccitazione a energia inferiore (trasferimento di elettroni). Il risultato è una netta separazione di carica fotoindotta: carica positiva nel donatore e negativa nell'accettore, come mostrato nell'equazione [3].



Equazione 3 Trasferimento elettroni mediante il fotorecettore clorofilla e una molecola accettore (9).

L'accettore ora ha quindi un elettrone ad elevato potenziale di trasferimento: gli elettroni sono utilizzati per generare potere riducente e ATP, utilizzati in un secondo momento per ridurre l'anidride carbonica a glucosio. Per fare ciò, è necessaria la presenza di due fotosistemi PS I e PS II: il primo fotosistema fornisce al NADP⁺ (nicotinammide adenin di nucleotide fosfato) degli elettroni ad alta energia per ridurlo a NADPH, una fonte di energia utile nei processi biosintetici che richiedono potere riducente; il fotosistema II, attraverso una pompa protonica (citocromo bf) nei tilacoidi, invia gli elettroni al fotosistema I, necessari per la reazione appena citata. Gli elettroni vengono ricavati dall'ossidazione dell'acqua a ossigeno molecolare.

A differenza dell'ATP, trasportatore attivato di gruppi fosforici, la coppia redox NAD⁺/NADH costituisce un sistema per il trasporto di elettroni in reazioni di ossidazione di sostanze organiche in sistemi aerobici, in quanto l'accettore ultimo è l'ossigeno molecolare.

Vi sono inoltre altri trasportatori attivati di elettroni, che verranno utilizzati in step successivi: il FAD per esempio, con le forma ridotta FADH₂, coenzima flavina adenina dinucleotide, partecipa ancora una volta al trasporto di elettroni in reazioni di ossidazione. In altre reazioni troviamo il NADPH, utilizzato nelle reazioni di sintesi di biomolecole oppure il coenzima A, detto anche trasportatore di gruppi acilici, che trasporta unità bicarboniose (9).

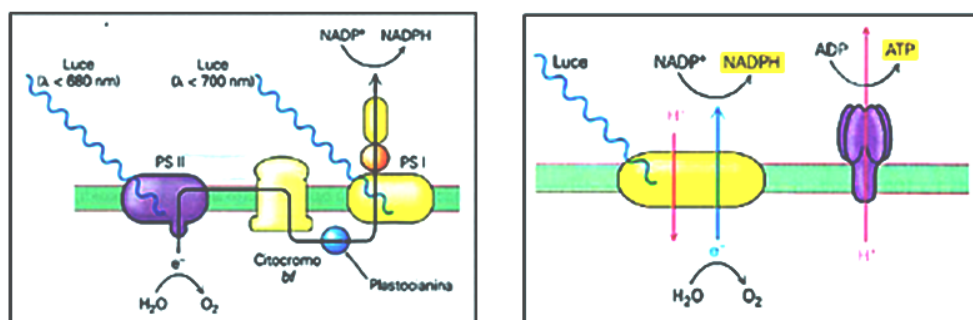


Figura 8 Trasporto elettronico e protonico attraverso la membrana del tilacoide durante la fotosintesi (9).

In figura 8, a sinistra, con la freccia nera si evidenzia il percorso effettuato dagli elettroni attraverso la membrana del tilacoide. La plastocianina è una proteina di piccole dimensioni contenente Cu^{II} che promuove il passaggio di elettroni.

I fotoni di luce assorbita hanno diversa lunghezza d'onda: il fotosistema I risponde a valori inferiori a 700 nm, mentre il fotosistema II a lunghezze d'onda inferiori a 680 nm (9).

L'energia dovuta al gradiente protonico (rappresentato da frecce viola nell'immagine a destra di figura 8) generato dal flusso di elettroni, detta forza motrice protonica, viene convertita in ATP dall'ADP mediante l'enzima ATP sintasi, anch'esso localizzato nella membrana dei tilacoidi. L'ATP e il NADPH vengono immessi nello stroma, dove avvengono le fasi successive della fotosintesi, dette reazioni al buio o ciclo di Calvin. In esso, gli atomi di carbonio completamente ossidati dell'anidride carbonica vengono ridotti; gli zuccheri prodotti fungono da componenti base delle biomolecole e da combustibile per tutti i processi anabolici.

2.3.1.2 IL CICLO DI CALVIN

Il ciclo di Calvin è costituito da tre fasi:

- Fissazione della CO_2 nel ribuloso 1,5-bisfosfato formando due molecole di 3-fosfoglicerato
- Riduzione del 3-fosfoglicerato formando esosi
- Ripristino del ribuloso 1,5-bisfosfato (9).

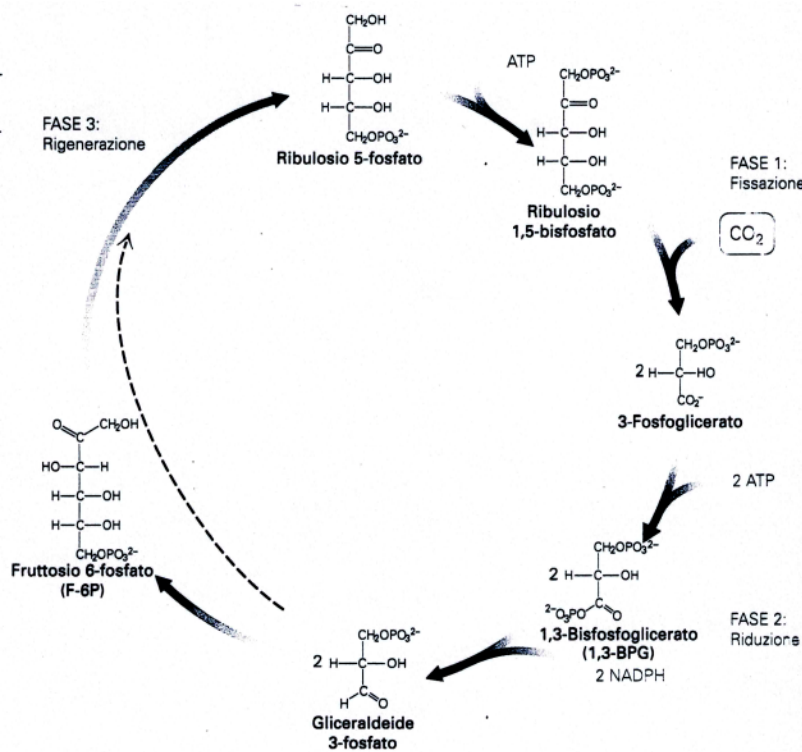


Figura 9 Ciclo di Calvin: i prodotti e intermedi principali (9).

Come rappresentato in figura 9, la prima fase del ciclo, detta anche fissazione, prevede la reazione di carbossilazione del ribuloso 1,5-bisfosfato per dare un intermedio instabile a sei atomi di carbonio che per condensazione porta alla formazione di 2 molecole di 3-fosfoglicerato. Il processo è catalizzato dall'enzima ribuloso bisfosfato carbossilasi/ossigenasi, conosciuto come RuBisCO, formato da otto grandi subunità proteiche (L) e otto piccole (S) (6).

Nella fase di riduzione, il 3-fosfoglicerato, utilizzando ATP, viene fosforilato a 1,3-bisfosfoglicerato. Quest'ultimo viene ridotto con il NADPH prodotto nella fase luminosa della fotosintesi a gliceraldeide 3-

fosfato (GAP). Nella terza fase una molecola di GAP non viene utilizzata: essa esce dal ciclo ed è coinvolta in numerosi processi chimici per la biosintesi di polisaccaridi (saccarosio, amido ecc.), amminoacidi e quindi proteine e acidi grassi (8).

A questo punto, 2 molecole di gliceraldeide 3-fosfato condensano per dare dapprima il fruttosio 1,6-bisfosfato e poi un gruppo di tre isomeri esosi monofosfati, facilmente interconvertibili: fruttosio 6-fosfato (il più abbondante), glucosio 6-fosfato e glucosio 1-fosfato (9).

Nella terza fase del ciclo, per ripristinare il ribuloso 1,5-bisfosfato utilizzato all'inizio dello stesso, si procede con una serie di reazioni chimiche catalizzate enzimaticamente descritte in figura 10.

Gli intermedi di reazione sono il ribosio 5-fosfato e xilulosio 5-fosfato, zuccheri aldoesosi (si rimanda la spiegazione di questo tipo di classificazione al paragrafo 2.3.3.2).

Il diidrossiacetone fosfato, utilizzato nella seconda reazione della fase A, è un isomero della gliceraldeide 3-fosfato.

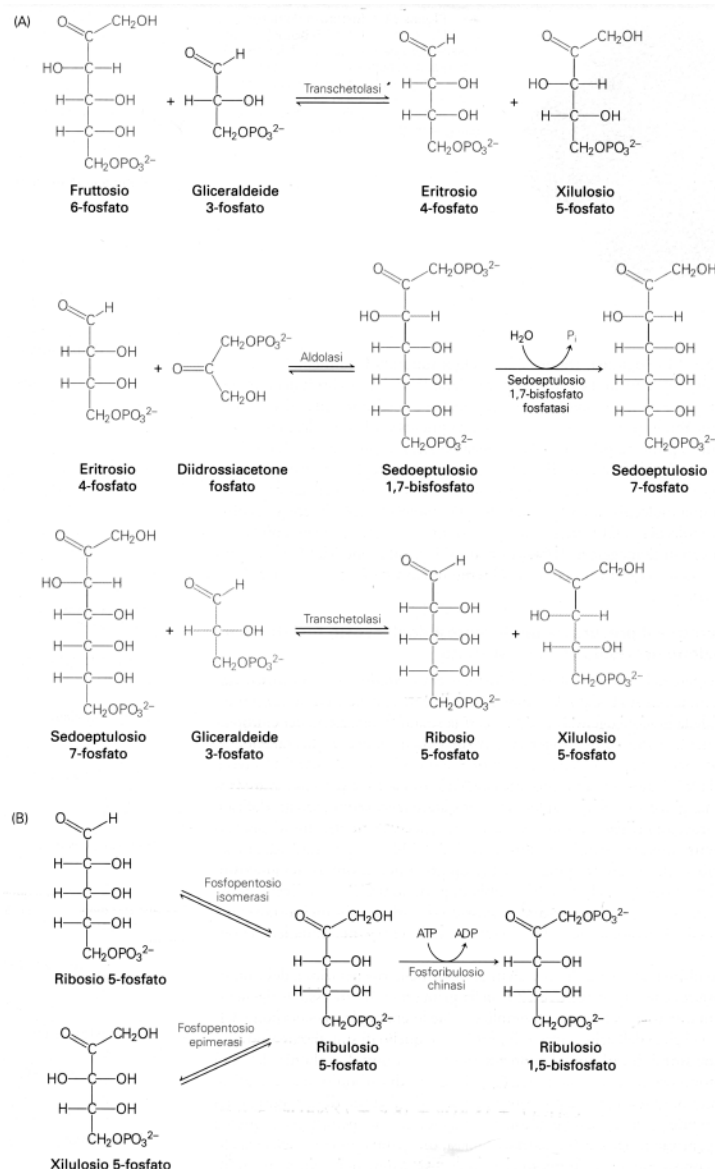
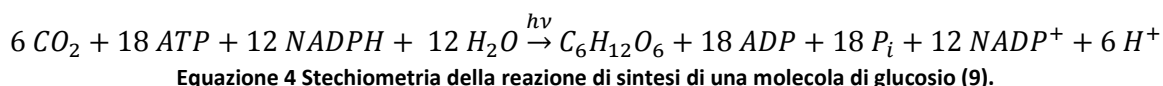


Figura 10 Fase III del ciclo di Calvin: rigenerazione del ribuloso 1,5-difosfato (9).

Nel complesso per sintetizzare una molecola di esoso le fasi del ciclo devono essere ripetute sei volte: sono necessarie perciò 6 molecole di CO₂, 12 di NADPH e 18 di ATP.

La reazione complessiva per la biosintesi di una molecola di glucosio è la seguente:



Nei paesi caldi e secchi, il sistema si adatta alle condizioni ambientali: la fotosintesi viene accelerata in modo tale che la concentrazione di anidride carbonica sia elevata e la produzione di zuccheri a sei atomi di carbonio avvenga senza ulteriore dispendio energetico. Per fare ciò le piante attuano la via del C₄: molecole a quattro atomi di carbonio, come l'ossalacetato, trasportano l'anidride carbonica alle cellule della guaina del fascio, sito principale della fotosintesi (9).

2.3.1.3 LA RESPIRAZIONE CELLULARE: LA GLICOLISI, IL CICLO DELL'ACIDO CITRICO E LA CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

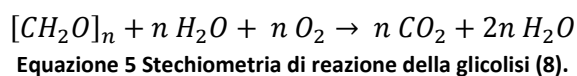
Delle macromolecole sintetizzate nella fotosintesi, una piccola parte viene utilizzata per la crescita della pianta, mentre il resto viene conservato come riserva di energia: la rottura dei legami chimici durante un processo catabolico rilascia una grande quantità di energia direttamente utilizzabile dalla pianta (8).

Nella respirazione cellulare molecole complesse vengono ridotte alle più piccole componenti con il rilascio di energia. Questo processo chimico è comprensivo della glicolisi, del ciclo di Krebs e della catena di trasporto degli elettroni/fosforilazione ossidativa.

A differenza della glicolisi che avviene nel citosol della cellula, tutti gli altri processi avvengono nei mitocondri, organi che contengono tutte le strutture metaboliche necessarie alle reazioni coinvolte. In essi molecole organiche come carboidrati, lipidi o proteine vengono scisse per dare composti inorganici come acqua e anidride carbonica.

Alla base dell'intero processo vi sono reazioni di ossido-riduzione ossia la perdita o l'aggiunta di elettroni da una molecola all'altra di una coppia redox.

Per molte piante il substrato quantitativamente più importante nel metabolismo respiratorio sono i carboidrati. La loro completa rottura avviene in condizioni aerobiche e la reazione che ne consegue è esattamente l'inverso della fotosintesi come mostrato, in termini generali, nell'equazione [5].



Tale reazione comporta la completa scissione degli zuccheri ad anidride carbonica e acqua.

Nella prima fase della respirazione avviene la glicolisi: dal glucosio e da tutti i carboidrati che si possono convertire in esso, si ottengono due molecole di piruvato.

Vi sono però percorsi competitivi alla respirazione: il glucosio 6-fosfato, primo intermedio glicolitico, può seguire il ciclo del pentoso fosfato in cui percorre a ritroso la fotosintesi per ottenere ribulosio 1,5-bisfosfato e anidride carbonica (in organismi non fotosintetici). Il prodotto finale piruvato invece in condizioni anaerobiche può subire due diversi processi di fermentazione: quella alcolica da cui deriva l'etanolo e quella lattica in cui viene sintetizzato il lattato (8).

La glicolisi può essere suddivisa in tre stadi: nel primo vi è la conversione del glucosio in fruttosio 1,6-bisfosfato con una fosforilazione, isomerizzazione e una seconda fosforilazione; la seconda fase prevede la scissione dell'esoso in due unità a tre atomi di carbonio interconvertibili; nella terza fase per ciascuna unità tricarboniosa è prevista un'ossidazione fino a ottenere il prodotto finale. Queste fasi sono evidenziate in figura 11.

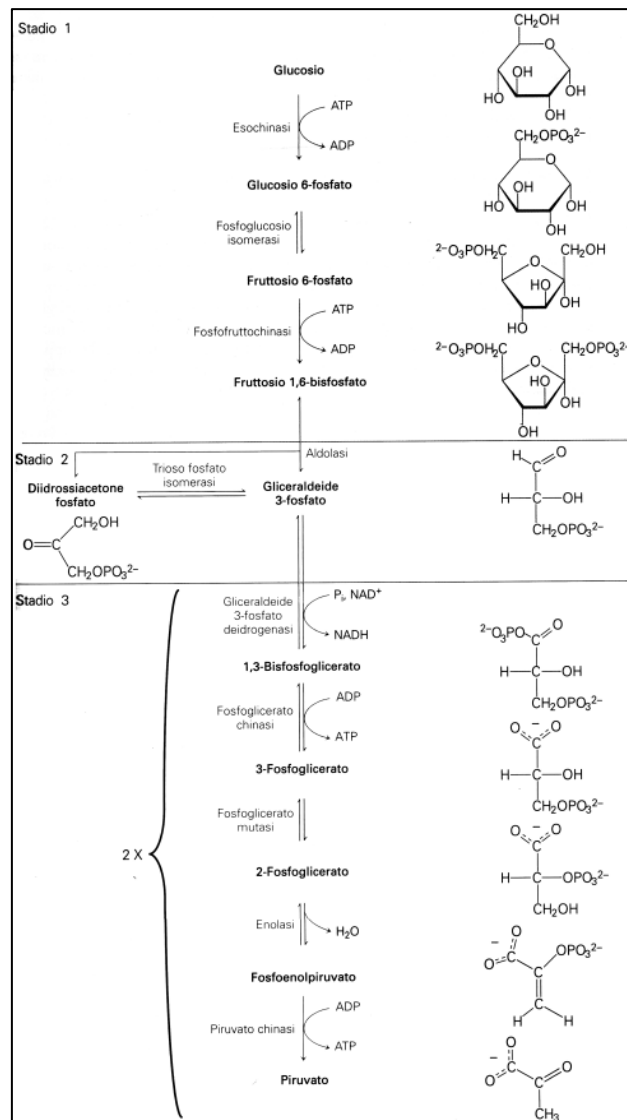


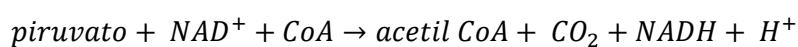
Figura 11 Gli stadi della glicolisi (9).

Ciascuna reazione ha uno specifico enzima che ne accelera la velocità.

Nella fase 1 vengono consumate 2 molecole di ATP ma nella fase 3 ne vengono prodotte 4 per ogni molecola di glucosio scisso. Inoltre vi è anche la formazione di 2 molecole di NADH per riduzione di NAD⁺.

Molti degli intermedi presenti sono coinvolti in processi biosintetici poiché rappresentano degli ottimi substrati: dal 3-fosfoglicerato deriva la serina e alcuni suoi derivati, dal fosfoenolpiruvato diversi amminoacidi aromatici ed infine dal piruvato l'amminoacido alanina e i suoi derivati. Come già accennato, il piruvato può percorrere diverse strade: oltre a quelle citate, la più importante è la sua completa ossidazione a CO₂ e acqua nei mitocondri attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici o ciclo di Krebs, in presenza di ossigeno.

L'ingresso del piruvato nel ciclo di Krebs o ciclo dell'acido citrico avviene con la sua conversione ad acetil coenzima A mediante la reazione sotto descritta.



Equazione 6 Reazione di formazione dell'acetil coenzima A (9).

Dalla reazione si liberano 2 elettroni che verranno trasferiti successivamente dal NADH alla catena di trasporto degli elettroni (8).

Questa reazione irreversibile che collega la glicolisi al ciclo di Krebs avviene nella matrice mitocondriale ed è catalizzata dal complesso del piruvato deidrogenasi costituito da tre distinte proteine.

In figura 12, è mostrato lo schema di reazioni del ciclo di Krebs con i corrispondenti enzimi.

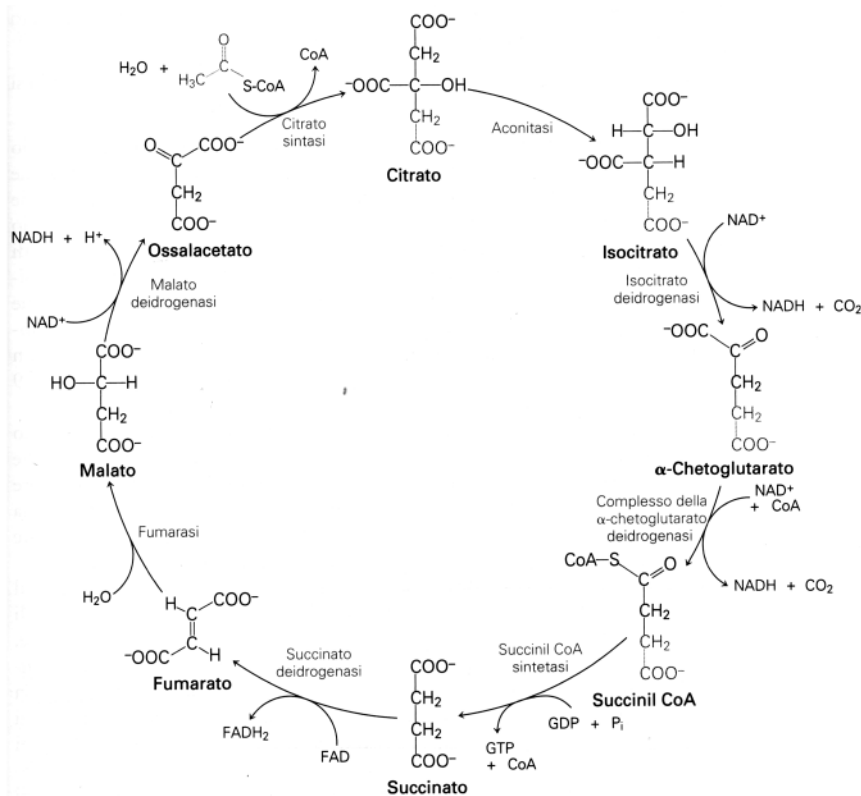


Figura 12 Il ciclo dell'acido citrico (9).

All'inizio del ciclo (in alto a sinistra), l'acetil coenzima A e l'ossalacetato condensano nel citrato che isomerizza a isocitrato. Quest'ultimo subisce una reazione di decarbossilazione ossidativa accompagnata dalla riduzione di NAD^+ a NADH . Da qui si libera una prima molecola di CO_2 .

Con processo simile, l' α -chetoglutarato prodotto viene trasformato in succinil-coenzima A (6). Esso viene trasformato in succinato attraverso la rottura del legame tioestereo del succinil coenzima A in una reazione accoppiata alla fosforilazione di ADP o GDP, altro nucleoside difosfato purinico.

Attraverso un'ossidazione a fumarato, idratazione a malato e una seconda ossidazione, l'ossalacetato è rigenerato dal succinato. Nella prima reazione di ossidazione viene ridotto il FAD: questo accettore di elettroni, per essere ridotto, richiede una quantità di energia inferiore, fattore favorevole a questo punto della reazione in cui la variazione di energia non è sufficiente per ridurre il NAD^+ (9).

Trattandosi di un ciclo vi sono più punti d'accesso: il piruvato infatti non è l'unico substrato, prodotto o no dalla glicolisi, ad entrare nel ciclo. Il malato per esempio entra come tale quasi alla fine del ciclo portando alla formazione di una sola molecola di NADH , importante nelle reazioni successive; molti amminoacidi, precedentemente transamminati, se necessario, tra cui la glicina prodotta dalla fotorespirazione, possono servire da substrato per la respirazione cellulare in alcuni tessuti (9).

Come per la glicolisi, gli intermedi di reazione del ciclo di Krebs sono fonte di precursori per le biosintesi:

- citrato -> acidi grassi e steroli
- α -chetoglutarato -> glutammato -> altri amminoacidi -> purine
- succinil coenzima A -> porfirine, eme, clorofilla

- ossalacetato -> aspartato -> altri amminoacidi, purine, pirimidine (6).

Nella membrana mitocondriale interna delle cellule sono presenti numerose piccole molecole proteiche in grado di promuovere il flusso di elettroni trasferiti tramite il NADH dalla glicolisi e dal ciclo di Krebs all'ossigeno (2).

Le molecole proteiche, riunite in una catena, sono ripetute in più copie lungo la membrana interna, e il loro ancoraggio è favorito dalle numerose creste e avvolgimenti presenti in essa. Complessivamente possono essere riunite in 4 complessi proteici a più subunità detti Complessi I-IV (6).

Tra i quattro complessi vi sono due trasportatori mobili di elettroni: l'ubichinone o coenzima Q, il benzochinone con una lunga catena laterale e il citocromo C, proteina solubile ferro-zolfo in grado di attraversare senza difficoltà lo spazio inter-membrana.

Il Complesso I è un NADH deidrogenasi che ossida il NADH a NAD⁺ passando gli elettroni al flavina mononucleotide (FMN), un trasportatore di elettroni, che si riduce.

Il Complesso II si occupa dell'ossidazione del succinato a fumarato, cedendo altri elettroni al trasportatore mobile ubichinone che si riduce. Il Complesso III (citocromo bc₁) trasferisce gli elettroni al complesso del citocromo c che a sua volta trasferisce un elettrone alla volta all'ultimo complesso (citocromo c ossidasi), trasportatore terminale. Ogni quattro molecole di citocromo c ossidate, una molecola di ossigeno viene ridotta a due di acqua (6).

I passaggi sopra descritti sono riassunti in figura 13.

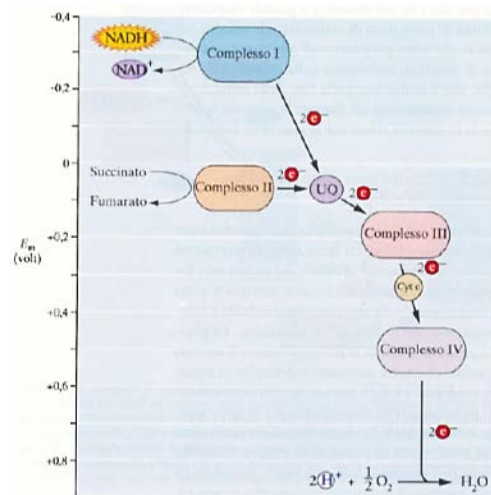


Figura 13 Catena di trasporto degli elettroni (6).

Le reazioni di ossido-riduzione che determinano il flusso di elettroni nella catena di trasporto degli elettroni sono ovviamente accompagnate da un flusso di protoni dalla matrice allo spazio inter-membrana mitocondriale, favorito dalla notevole energia prodotta nei passaggi precedenti. Ciò che si forma è un gradiente protonico tra le parti separate della membrana interna. Il gradiente creato spinge i protoni a tornare all'interno della matrice attraverso un canale proteico, l'ATP sintasi, unica parte della membrana interna permeabile ai protoni. L'energia liberata da questo flusso favorisce la reazione di sintesi di ATP nella matrice mitocondriale prima caratterizzata da una bassa concentrazione di ioni H⁺ (2).

Alla fine di tutto il processo di respirazione cellulare, a partire da una molecola di glucosio, sulla base di fonti di letteratura, le molecole totali di ATP, sottraendo quelle utilizzate per i processi chimici intermedi, sono 30 (9).

2.3.1.4 LA FOTORESPIRAZIONE

Un processo competitivo alla respirazione, che si verifica soprattutto nelle piante delle aree tropicali a causa delle alte temperature, è la fotorespirazione: l'enzima RuBisCO catalizza la reazione di formazione di fosfoglicolato e 3-fosfoglicerato a partire dal ribulosio 1,5-bisfosfato che reagisce con O₂. La fotorespirazione è un processo metabolico che migliora le conseguenze di una inefficiente reazione di ossigenazione dell'enzima coinvolto nello step principale della fissazione del carbonio nella fotosintesi. Il sottoprodotto principale ottenuto dalla fotorespirazione è anidride carbonica, rilasciata approssimativamente in proporzione del 25% rispetto al carbonio fissato nella fotosintesi, riducendo così l'energia immagazzinata dal sistema. La funzione della fotorespirazione rimane controversa: alcuni ricercatori hanno suggerito per esempio che sia necessaria per l'assimilazione del nitrato dal suolo (15) o che funzioni come una sorta di "valvola di sicurezza" prevenendo l'accumulo di radicali liberi prodotti da reazioni in condizioni di elevata ossigenazione, che potrebbero danneggiare le funzioni metaboliche delle cellule per ossidazione delle membrane (8).

2.3.2 GLI ENZIMI

Il termine enzima deriva dal greco "nel lievito": questo nome venne attribuito dai fratelli Buchner che per primi estrassero gli enzimi da un preparato di lievito macinato con della sabbia in grado di catalizzare la reazione di fermentazione dello zucchero ad alcol etilico (14).

Gli enzimi, come già accennato, sono catalizzatori naturali di reazioni chimiche che in loro assenza non avverrebbero: ad oggi, nonostante i numerosi sforzi tecnici, la sintesi di macromolecole per via chimica fornisce ancora scarsi risultati (14).

La loro funzione è di abbassare l'energia libera di attivazione dello stato di transizione ΔG^\ddagger di una reazione in modo tale che dai reagenti si possa arrivare ai prodotti. Essa corrisponde alla differenza di energia tra l'energia libera dei reagenti e quella dello stato di transizione: questa differenza di energia molto spesso è elevata e processi anche semplici non sarebbero in grado di avvenire spontaneamente.

Gli enzimi inoltre sono selettivi e specifici: un enzima si lega selettivamente a un reagente, detto substrato di reazione, nel suo sito attivo, distinguendolo anche tra molecole simili come gli isomeri. Un enzima funziona solo per una data molecola, ne fa avvenire la reazione specifica (molto spesso catalizza selettivamente una sola reazione con quell'unico substrato), resta inalterato alla fine del processo e in linea teorica può essere riutilizzato all'infinito.

La specificità degli enzimi ha anche un lato negativo: una piccola modificazione sul sito attivo o la presenza di un inibitore nelle zone limitrofe, può bloccare l'attività dell'enzima. Vi sono inibitori competitivi, ossia molecole simili al substrato che si legano al sito attivo impedendo il legame con l'enzima e inibitori incompetitivi che si legano invece al complesso sito attivo-substrato impedendo ai prodotti di reazione di staccarsi dall'enzima (9).

Gli enzimi sono formati da proteine e come tali, sono soggetti a denaturazione. Avverse condizioni ambientali potrebbero modificare l'attività dell'enzima rallentandone l'azione o addirittura inibendola completamente a causa della denaturazione delle sue proteine.

Il pH e l'alta temperatura sono fattori ambientali che ne modificano l'attività (2).

Alcuni enzimi richiedono la presenza di cofattori, molecole non proteiche che collaborano nell'attività catalitica: molto spesso si tratta di ioni metallici o nucleotidi (14).

Il legame degli enzimi con il metabolismo del sistema sta nell'esistenza di meccanismi di controllo: per inibizione per feedback s'intende il meccanismo per il quale il prodotto stesso di reazione agisce da

inibitore bloccando l'attività dell'enzima che ne gestisce la sua produzione, per esempio per evitare una produzione oltre la quantità necessaria.

Oltre al consueto nome comune, ogni enzima ha un nome sistematico definito dall'Unione internazionale di biochimica e biologia molecolare (IUBMB) sulla base del tipo di reazione che catalizza e al substrato su cui agisce.

Il nome è così composto: substrato/tipo di reazione seguita dalla desinenza -asi.

Le reazioni sono di sei tipi:

1. ossidoriduttasi -> reazioni di ossido-riduzione
2. transferasi -> trasferimento di gruppi funzionali
3. idrolasi -> reazioni di idrolisi
4. liasi -> eliminazione di gruppi con formazione di doppi legami
5. isomerasi -> isomerizzazione
6. ligasi -> formazione di legami accoppiata all'idrolisi di ATP.

Al nome sistematico, preceduto dalla sigla E.C. (Enzyme Commission), segue una sequenza di 4 numeri separati da punti che indicano:

- il primo numero indica la classe principale cui l'enzima appartiene, secondo la descrizione precedente;
- il secondo numero specifica il substrato, il legame interessato dalle reazioni o il donatore di elettroni;
- il terzo numero dà ulteriori indicazioni sulla reazione catalizzata, o sul gruppo rimosso o sull'accettore di elettroni;
- il quarto numero è un numero di serie assegnato arbitrariamente e progressivamente.

Si stima che in natura siano presenti circa 30000 enzimi, dei quali solamente 3000 sono stati catalogati dalla IUBMB, 300 sono stati studiati a fondo e 30 utilizzati per importanti applicazioni pratiche (16).

2.3.3 METABOLITI PRIMARI

Gli organismi, dal punto di vista elementare, sono molto simili: ossigeno, idrogeno e carbonio rappresentano da soli il 98% del totale degli atomi presenti in un organismo.

Assieme all'azoto, questi vengono definiti elementi strutturali, i restanti sono detti micro- o oligoelementi (9).

Dalla combinazione degli elementi strutturali, alla base di tutti gli organismi, si formano 4 categorie di biomolecole: proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici. Queste macromolecole sono ottenute dalla polimerizzazione dei cosiddetti metaboliti primari, amminoacidi, acidi grassi, zuccheri e nucleotidi.

2.3.3.1 AMMINOACIDI E PROTEINE

Le proteine vengono autonomamente sintetizzate dalle piante a partire dalle sostanze nutritive ricavate dall'aria, dall'acqua e dal suolo; gli animali invece devono nutrirsi dei vegetali per integrare nel loro metabolismo questi elementi essenziali per la vita e crescita. Infatti, le piante ricavano il carbonio e l'ossigeno dall'aria, l'idrogeno dall'acqua e l'azoto dal suolo attraverso percorsi metabolici secondari.

Le proteine hanno moltissime funzioni: in seguito se ne elencano alcune.

Proteine enzimatiche: fungono da catalizzatori di reazioni chimiche.

Proteine strutturali: sono l'elemento costituente di tessuti fibrosi per il supporto meccanico di alcune strutture cellulari.

Proteine di deposito: in alcune strutture dell'organismo (semi, uova ecc.) si depositano amminoacidi di riserva.

Proteine di trasporto: alcune hanno la capacità di trasportare altre molecole da una parte all'altra delle membrane. Un esempio è l'emoglobina, trasportatrice di ossigeno.

Proteine ormonali: alcuni ormoni, responsabili del coordinamento delle attività di un organismo, sono costituiti da proteine.

Proteine recettoriali: risposta della cellula a stimoli chimici, come quelli generati dalle cellule nervose.

Proteine contrattili: alcune sono responsabili del movimento.

Proteine di difesa: protezione contro alcune specifiche malattie (anticorpi) (2).

Le proteine sono polimeri lineari le cui unità base sono gli amminoacidi, composti con un atomo di carbonio centrale a cui è legato un idrogeno, un gruppo acido carbossilico COOH, un gruppo basico amminico NH₂ e un gruppo R variabile, caratteristico per ciascun amminoacido.

Si tratta perciò di molecole chirali (quattro sostituenti diversi sull'atomo di carbonio) e pertanto ne esistono due isomeri, un isomero L (levogiro) e uno D (destrogiro). La maggior parte degli amminoacidi sintetizzati dagli organismi viventi è nella forma L, in riferimento alla conformazione della L-gliceraldeide.

Inoltre, a pH neutro gli amminoacidi sono molecole zwitterioniche, ossia sono presenti come ioni dipolari: il gruppo amminico come protonato (NH₃⁺) e il gruppo carbossilico deprotonato (COO⁻). Variando il pH, l'equilibrio si sposta verso una delle due specie.

I gruppi R possibili permettono di distinguere diversi amminoacidi: gli amminoacidi presenti in natura sono 20, ma recentemente ne sono stati aggiunti altri due. Essi possono essere classificati nel seguente modo:

- Amminoacidi idrofobici, con gruppi R non polari (idrocarburiche)

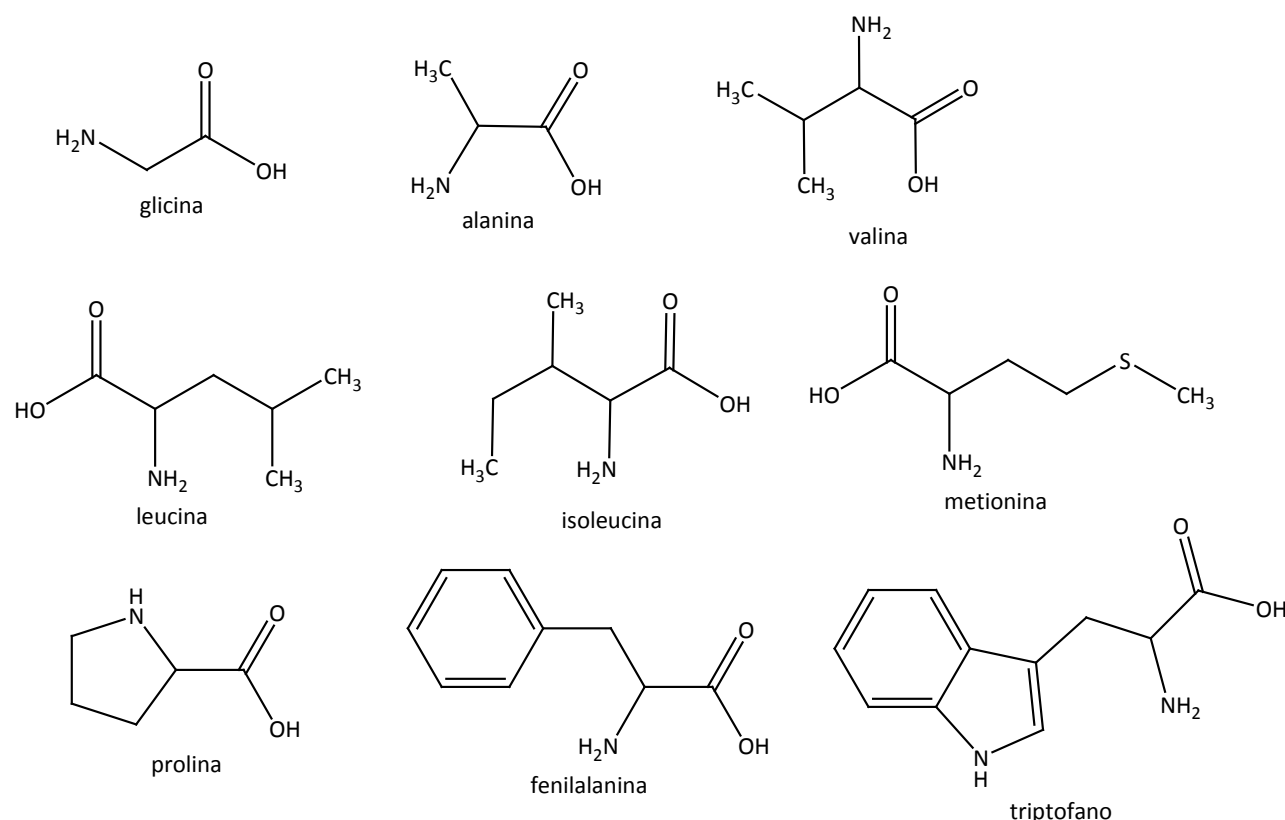


Figura 14 Amminoacidi idrofobici, con gruppi R non polari.

- Amminoacidi polari, con gruppi R neutri ma con carica distribuita non uniformemente

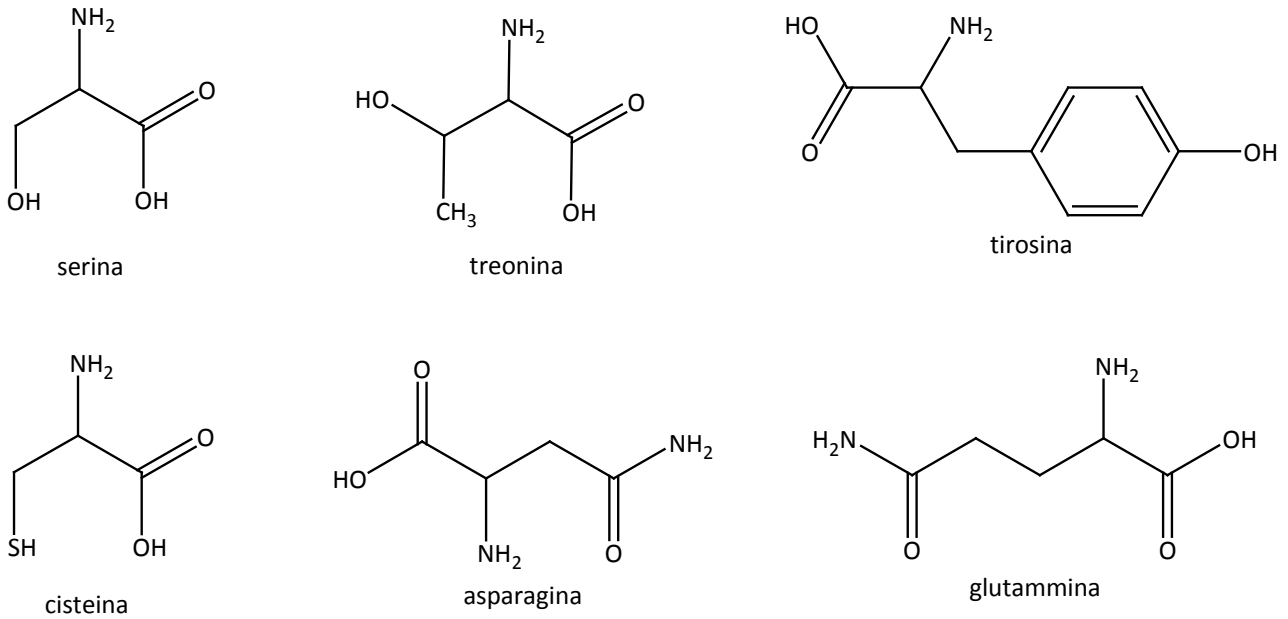


Figura 15 Amminoacidi polari, con gruppi R neutri.

- Amminoacidi carichi positivamente, con R carico positivamente a pH fisiologico

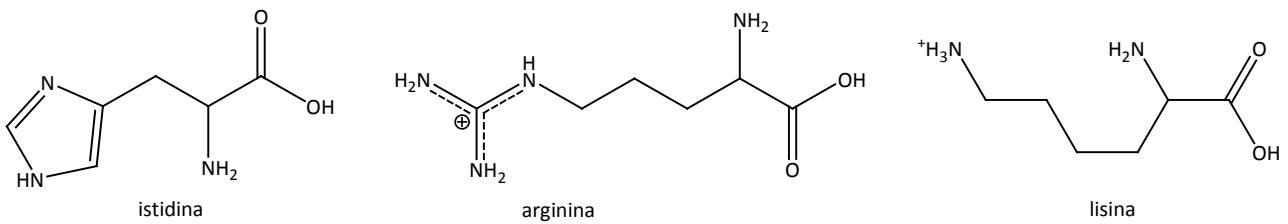


Figura 16 Amminoacidi carichi positivamente.

- Amminoacidi carichi negativamente, con R⁻ a pH fisiologico

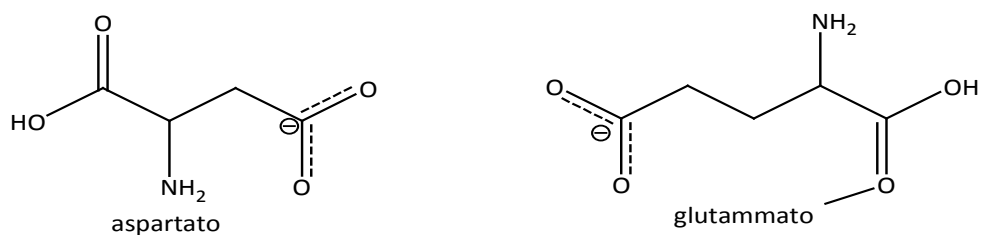


Figura 17 Amminoacidi carichi negativamente.

Gli amminoacidi derivano dagli scheletri carboniosi prodotti nella glicolisi, dalla riduzione fotosintetica del carbonio, dalla via ossidativa dei pentoso fosfato e dal ciclo dell'acido citrico.

Le vie proposte per la sintesi nelle piante degli amminoacidi derivano in gran parte da studi su microbi o lieviti, ma mostrano una complessità maggiore (6). Una sintetica rappresentazione è presente in figura 18.

Tale complessità e il numero elevato di enzimi impegnati nel sistema metabolico delle piante non permettono una conoscenza completa dei meccanismi coinvolti: la biochimica e la biologia molecolare si propongono di ampliare studi a riguardo (6).

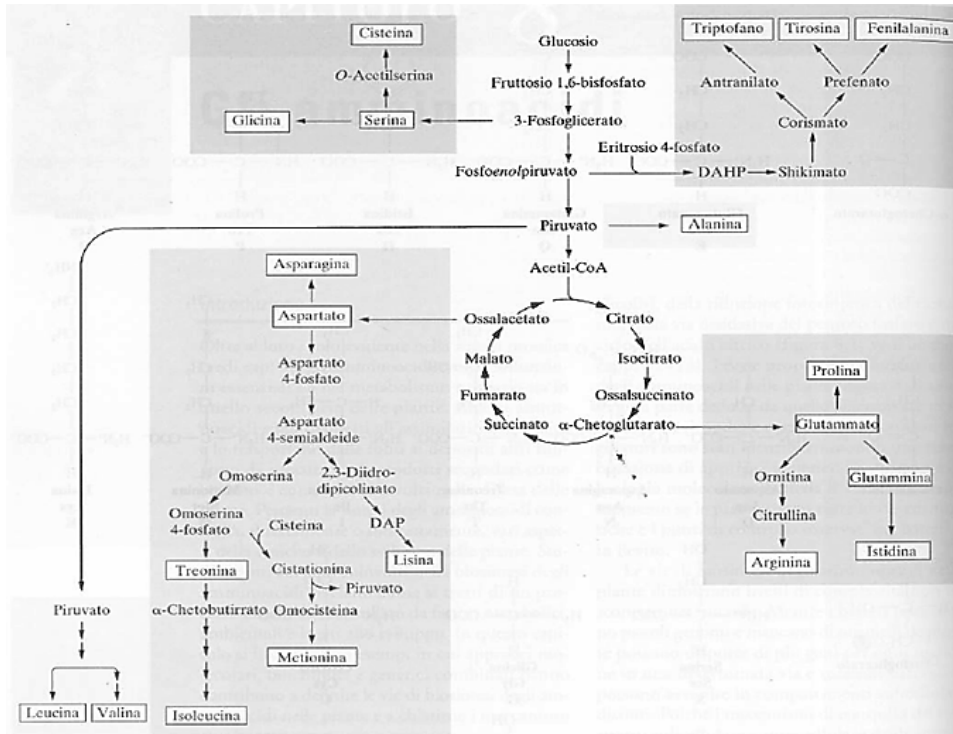


Figura 18 Rappresentazione schematica della glicolisi e del ciclo di Krebs con gli amminoacidi derivati dai diversi precursori intermedi (6).

Tra gli amminoacidi citati, glutammato e glutammina, aspartato e asparagina sono detti amminoacidi di trasporto dell'azoto. Essi, infatti, sono in grado di trasportare l'azoto a tessuti di deposito e riserva affinché la cellula, nel momento in cui debba provvedere alla formazione di composti organici vitali come proteine o acidi nucleici, possa disporre dell'azoto necessario (6).

L'azoto si presenta in due forme, inorganico e ione ammonio, ed entrambi possono essere assimilati dalle piante. L'assimilazione primaria (azoto inorganico) prevede l'assimilazione dell'azoto presente nel suolo, mentre quella secondaria di quello presente nello ione ammonio libero delle piante: questo deriva da diversi meccanismi metabolici catalizzati, che prevedono la degradazione degli amminoacidi citati al fine di ottenere lo ione libero e disponibile (6).

Il ciclo GS/GOGAT (glutammina sintetasi/glutammato sintasi) rappresenta la via più importante per l'assimilazione dell'azoto.

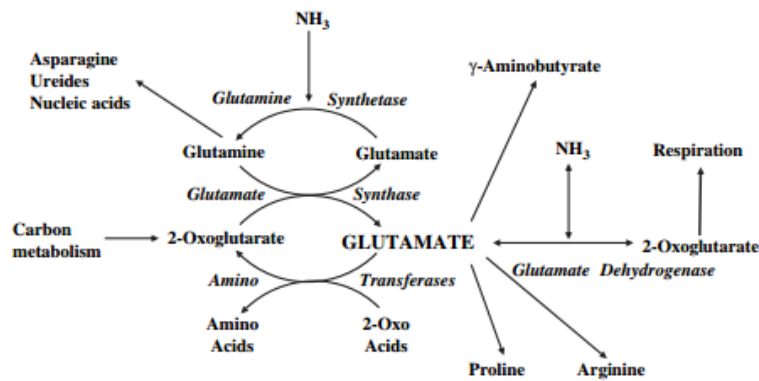


Figura 19 Ciclo GS/GOGAT (17).

In figura 19, si illustra sia la sintesi dell'acido glutammico che alcune delle vie metaboliche in cui è coinvolto.

Mediante l'enzima glutammina sintetasi, il glutammato e l'ammonio formano la glutammina, gli acidi nucleici e gli ureidi. Il glutammato, invece, è sintetizzato a partire da un α -chetoglutarato, come il 2-ossoglutarato, più l'ammonio liberato dalla reazione inversa di quella sopra citata. L'enzima coinvolto, anche per le successive reazioni, è il glutammato deidrogenasi (GDH): l'enzima glutammina sintetasi è presente anche in questa reazione come enzima collaboratore (17).

Dall'acido glutammico si avviano reazioni per la produzione di altri amminoacidi come la prolina e l'arginina, ma anche GABA, che si accumula nelle piante in risposta a stress come l'acidificazione, le basse temperature, la mancanza di ossigeno. Le reazioni in questione avvengono nel citoplasma. Inoltre il glutammato è un precursore nella sintesi della clorofilla nelle foglie in via di sviluppo (17).

La glutammina è invece un precursore nella sintesi dell'asparagina a partire dall'aspartato, mediante l'uso dell'enzima asparagina sintetasi e il trasferimento dell'azoto del gruppo ammidico della glutammina all'aspartato.

La reazione endoergonica proposta è rappresentata in figura 20.

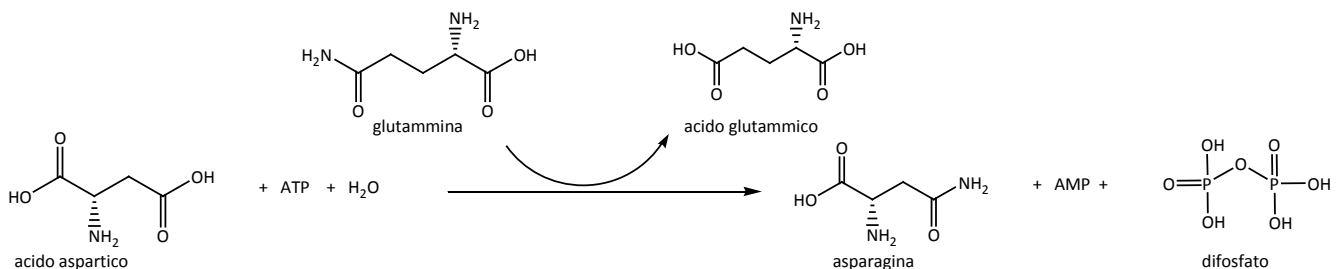


Figura 20 Sintesi asparagina dall'acido aspartico.

Alcuni studi verificarono l'influenza negativa attuata dalla luce sulla concentrazione dell'asparagina prodotta in questa via biosintetica. Viceversa, le concentrazioni di glutammina aumentano se la pianta cresce alla luce (6).

L'acido aspartico, formato dalla transaminazione dell'ossalacetato derivato dal ciclo di Krebs o prodotto mediante l'azione dell'enzima fosfoenolpiruvato-carbossilasi nel citoplasma (18), a sua volta, è coinvolto in un ciclo metabolico di sintesi di altri amminoacidi, come mostrato in figura 21.

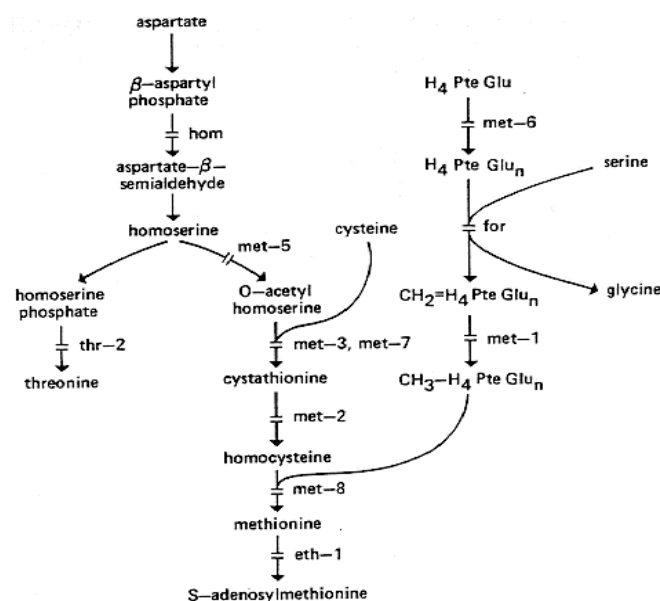


Figura 21 Metabolismo dell'aspartato (18).

I prodotti delle reazioni, catalizzate da specifici enzimi, non sono unicamente lisina, treonina e metionina, ma, come si vede in figura, ad ogni passaggio ci sono altri composti, ugualmente importanti a livello cellulare. Un successivo passaggio prevede una serie di reazioni in cui la treonina è convertita a isoleucina. Per la sintesi della metionina, invece, oltre all'acido aspartico di partenza, si utilizza un altro aminoacido, la cisteina.

Inoltre l'aspartato, con la glicina e la glutammina, è necessario nella sintesi dell'anello purinico di alcune basi nucleotidiche: l'azoto del prodotto proviene dai tre diversi aminoacidi. Un esempio è la sintesi dell'inosina monofosfato a partire dal ribosio-5-fosfato (19).

Per quanto riguarda gli aminoacidi aromatici, la via metabolica seguita è inserita nel complesso metabolismo dell'acido shikimico. Gli aminoacidi aromatici rappresentano il 20% del carbonio fissato dalle piante superiori in quanto garantiscono la sintesi di importanti metaboliti secondari come indoli, fitormoni come l'acido salicilico e alcuni alcaloidi, fitoalessine di difesa, auxina e lignina strutturale (6).

In figura 22, lungo la linea verticale è rappresentata la via metabolica dell'acido shikimico (1), da cui deriva il corismato (2) per la sintesi di fenilalanina (4) e tirosina (5) e l'antranilato (3) per quella del triptofano (6).

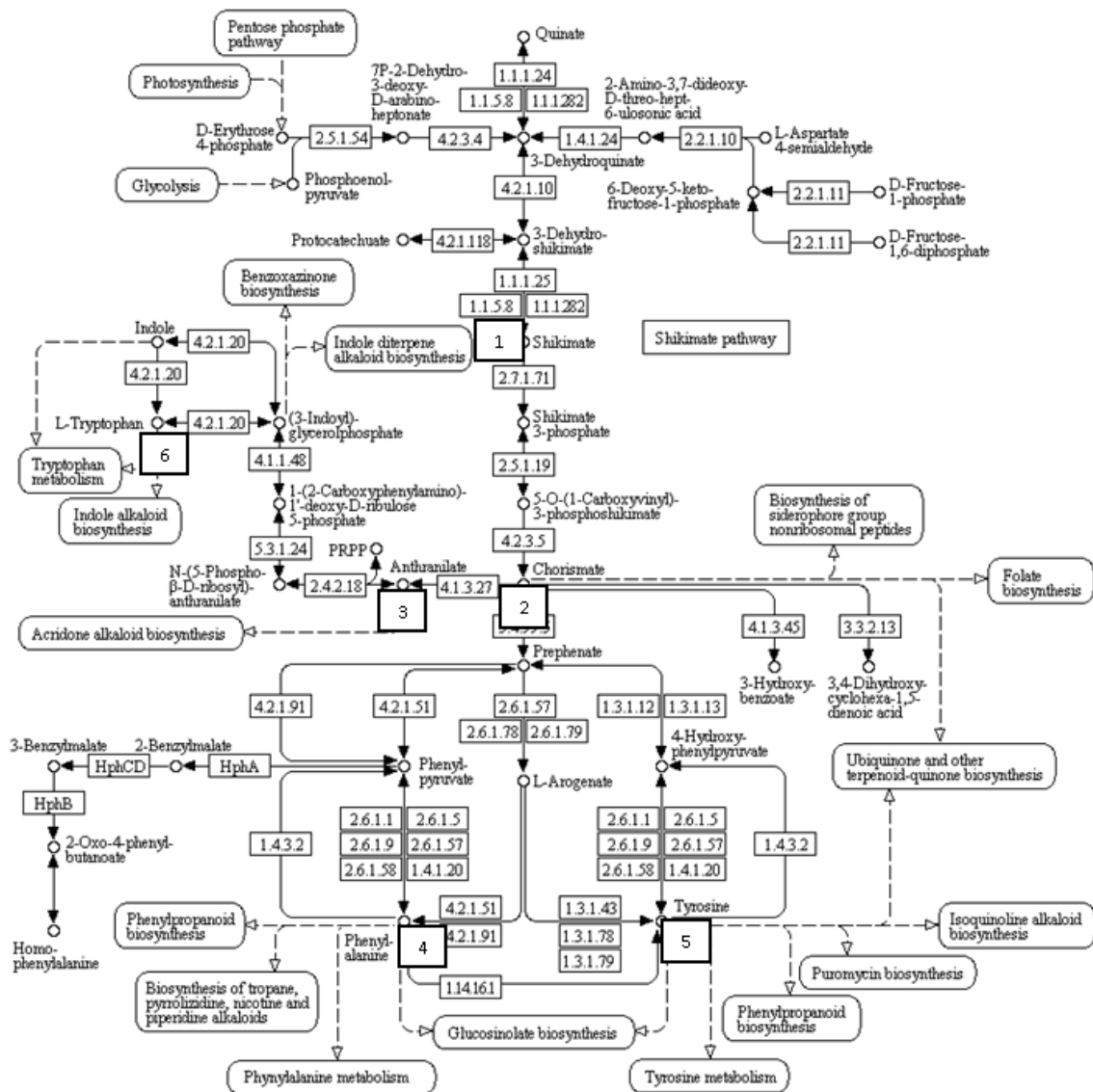


Figura 22 Sintesi aminoacidi aromatici nelle piante (10).

Evidenze sperimentali confermano che la sintesi di questi amminoacidi avviene nei plastidi delle piante superiori (20).

Nelle piante inoltre, fenilalanina e tirosina sono coinvolte nel metabolismo di alcuni flavonoidi, di acidi idrossicinnamici da cui deriva anche la nicotina e di composti glucosinolati (6).

La sequenza degli amminoacidi in una proteina è detta struttura primaria ed è codificata dal DNA. La sintesi delle proteine avviene nei ribosomi, complessi macromolecolari costituiti da proteine e rRNA, nei quali viene catalizzata la reazione di formazione dei legami peptidici tra gli amminoacidi.

I ribosomi sono posti nei tre compartimenti dove avviene la sintesi amminoacidica, determinandone il nome di ribosomi citoplasmatici, plastidici e mitocondriali.

La sintesi proteica avviene in tre fasi: inizio (codone di inizio lettura da parte del rRNA), allungamento (lettura successiva di codoni) e terminazione (raggiungimento di uno dei tre codoni di arresto).

Il legame tra un amminoacido e il successivo è detto peptidico, dovuto ad una reazione di condensazione (perdita di acqua) tra un gruppo carbossilico di un amminoacido e il gruppo amminico dell'amminoacido successivo.

Questa reazione è endoergonica perché l'equilibrio, a pH fisiologico, è spostato verso le forme dissociate, ma nonostante questo i legami peptidici sono stabili in quanto la cinetica di reazione dell'idrolisi è piuttosto lenta (9).

Una catena polipeptidica è caratterizzata dalla sequenza $-N-C-C-N-C-C-$ in cui tutti i gruppi carbossilici e amminici, tranne quelli contenuti nei gruppi R laterali, sono posti lungo una direzione.

Le proteine però assumono anche una struttura secondaria: nonostante l'unione tra un gruppo carbossilico ed uno amminico, si può creare un legame debole, come il legame idrogeno, tra l'atomo di idrogeno del gruppo amminico (l'azoto ha parziale carica negativa) e l'ossigeno del gruppo carbossilico, a intervalli regolari lungo la catena: si crea così un primo ripiegamento della catena su se stessa, che può assumere una forma ad α -elica o a foglietto β .

Allo stesso modo, ma ad intervalli irregolari, la formazione di legami idrofobici tra i gruppi R delle catene laterali comporta l'ulteriore ripiegamento della catena: oltre a legami idrogeno e legami ionici forti, si ricordano i legami a ponte disolfuro S-S tra due residui cisteinici, mediante il gruppo tiolico $-SH$, che nella formazione della catena non erano stati modificati. La disposizione che assumono nello spazio è detta struttura terziaria.

A questo punto, ciascuna subunità (peptide con una determinata struttura terziaria) interagisce con un'altra subunità, creando una grande proteina con una certa disposizione e forma nello spazio.

Quest'ultima è detta struttura quaternaria.

In tutto questo groviglio di amminoacidi, ognuno ha una posizione determinata e ogni proteina è unica, perché anche solo un amminoacido diverso o un'errata successione di un'unità base può provocare gravi malattie (9).

2.3.3.2 I CARBOIDRATI

I carboidrati, o polisaccaridi, sono molecole composte da uno o più zuccheri ossia molecole di formula bruta $(CH_2O)_n$ con n il numero di zuccheri legati nella catena carbossilica. I carboidrati possono essere formati da un solo zucchero (monosaccaride) o da un numero elevato di zuccheri (polisaccaridi).

Originariamente il nome carboidrati era stato assegnato ad alcune sostanze naturali di formula bruta $C_n(H_2O)_{n+2}$ detti anche idrati di carbonio. Oggi si sa che i carboidrati sono formati anche da atomi di azoto o zolfo.

I legami tra i saccaridi hanno natura differente dal legame peptidico delle proteine: si tratta di legami covalenti in grado di stabilire strutture molecolari differenti, con lo scopo di deposito di energia fino a complessi per il segnale di riconoscimento cellula-cellula (9).

La conservazione della vita è proprio garantita dalla fotosintesi clorofilliana, reazioni attraverso cui il mondo vegetale sintetizza il glucosio e zuccheri derivati a partire da composti inorganici (si veda il paragrafo 2.3.1).

I monosaccaridi, gli zuccheri più semplici, fungono da “combustibile” ma anche costituente fondamentale per i sistemi biologici o ancora come base della molecola di DNA.

Questi sono formati da una catena, lineare o ciclica, di atomi di carbonio legati a gruppi ossidrilici. Il gruppo carbonilico caratterizzante (terminale) può essere di tipo aldeidico o chetonico: ne deriva la classificazione in aldosi e chetosi. Il numero di atomi di carbonio permette di chiamarli invece triosi, tetrosi, esosi ecc e più precisamente aldosesi o chetopentoso (esempi in figura 23) sulla base del tipo di gruppo funzionale che lo zucchero possiede.

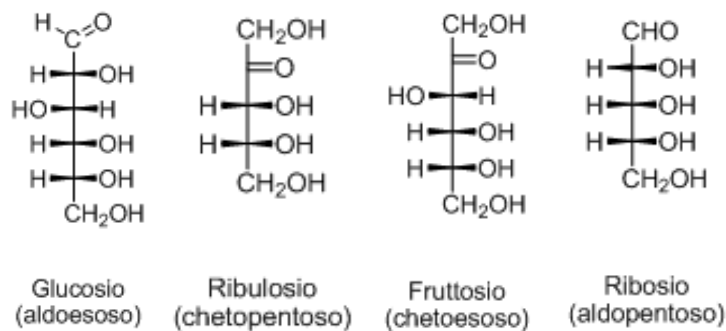


Figura 23 Alcuni tra gli zuccheri più diffusi.

Gli zuccheri si possono rappresentare in forma aperta o chiusa.

I monosaccaridi sono composti cristallini dal sapore dolce. Sono composti polari, solubili in acqua e solventi alcolici, mentre non lo sono in solventi organici apolari. Molti di questi, allo stato solido, sono presenti in due forme cristalline con proprietà chimico-fisiche diverse, corrispondenti a due isomeri distinti sul carbonio anomero (distinto tra emiacetalico ed emichetalico). Due anomeri sono soggetti, in soluzione acquosa, al fenomeno di mutua rotazione ovvero l’inter-conversione tra le due forme fino al raggiungimento di una condizione di equilibrio dipendente da fattori strutturali e ambientali. La mutua rotazione consiste nell’apertura dell’anello, inversione della configurazione del carbonio anomero (causata dal fatto che l’attacco al carbonile può avvenire da entrambe le facce) e richiusura dell’anello con configurazione opposta.

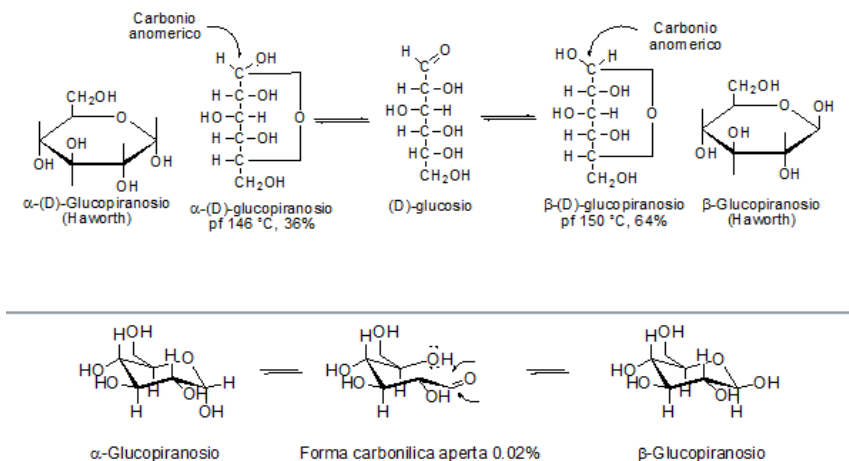


Figura 24 Mutua rotazione del glucosio.

Si definiscono oligosaccaridi una serie di 2, 3 fino a 10 zuccheri semplici, uguali o diverse, ottenuta per condensazione degli stessi in forma ciclica, uniti attraverso la formazione di un legame acetalico tra un monosaccaride e l'ossidrile di un secondo monosaccaride. Il legame si dice glicosidico.

Si dicono invece glicosidi, quei composti, che oltre a zuccheri semplici legati mediante legami glicosidici, contengono un'unità diversa detta aglicone, dove è presente un ossidrile di natura alcolica o fenolica: se lo zucchero è un glucosio questi si dicono glucosidi.

I glicosidi sono largamente diffusi in natura ed esibiscono spiccata attività biologica e farmacologica.

Tra i disaccaridi più comuni si ricorda il saccarosio, costituito da un'unità di glucosio e una di fruttosio, il lattosio da una di glucosio e una di galattosio ed infine il maltosio formato da due molecole di glucosio.

Il saccarosio, per esempio, nelle piante è utilizzato per il trasporto di zuccheri da una parte all'altra del sistema.

Il legame glicosidico tra le diverse unità può essere di tipo α (maltosio e saccarosio) oppure β (lattosio): α significa che il gruppo ossidrile del carbonio anomero è in posizione assiale, equatoriale per l'isomero β .

I polisaccaridi sono macromolecole costituite da un numero elevato di unità base, che varia da centinaia a qualche migliaia.

Il polisaccaride più abbondante nelle piante è la cellulosa, un polimero lineare di glucosio unito da un legame β -1,4-glicosidico, che rappresenta il principale costituente della parete cellulare che riveste le cellule vegetali (2). La sua resistenza è dovuta alla sua particolare struttura: strati di catene di cellulosa creano una rete grazie a legami idrogeno tra i gruppi ossidrilici del glucosio. Circa 80 molecole di cellulosa si organizzano in una microfibrilla e numerose microfibrille si allineano parallelamente a formare la vera e propria fibra di cellulosa.

L'amido, invece, è costituito da unità di glucosio unite da un legame α -glicosidico. Vi sono due forme di amido: l'amilosio, lineare e l'amilopectina, forma ramificata. La differenza si deve alla formazione, oltre ai legami 1,4 glicosidici tra due molecole di glucosio successive, di legami 1,6-glicosidici con un glucosio di un'altra catena lineare.

L'amido è una riserva di glucosio: viene prodotto e depositato sotto forma di granuli nei plastidi e al momento di carenza di energia viene prelevato ed utilizzato.

Esso non si organizza in strati come la cellulosa, perciò i suoi gruppi ossidrilici sono liberi: ne consegue la solubilità in acqua di questo polisaccaride.

L'amido e il saccarosio sono entrambi sintetizzati a partire dal pool di esosi fosfato prodotti nel ciclo di Calvin (si veda paragrafo 2.3.1.2), ma in siti differenti: il saccarosio è sintetizzato nel citosol mentre l'amido, in entrambe le forme, nei plastidi. In particolare, i plastidi coinvolti sono gli amiloplasti, che contengono il carbonio necessario per la sintesi dell'amido e fungono da organi di riserva.

In alcuni casi, come nelle cellule in fase di sviluppo, il saccarosio necessario per lo sviluppo non può entrare tal quale nella cellula, ma necessita di una degradazione nelle molecole costituenti mediante l'enzima invertasi, in una reazione però irreversibile (6).

Oltre agli zuccheri già citati, un'altra classe importante è costituita dagli ammino-zuccheri, ovvero zuccheri contenenti un gruppo amminico. Il più diffuso è la glucosammina che, con una struttura molto simile alla cellulosa, si organizza per formare la chitina, il polisaccaride costituente dell'esoscheletro dei crostacei (2).

I monosaccaridi, specialmente glucosio e ribosio, hanno una notevole facilità nel formare composti complessi con ammine (N-glucosidi), da cui derivano le 5 basi azotate presenti nei nucleotidi del DNA, le antocianine, i glucosidi steroidei (saponine) e quelli cianogenici, come la linamarina delle leguminose.

2.3.3.3 I LIPIDI

I lipidi sono molecole poco solubili in acqua ma altamente solubili in solventi organici, poiché sono costituiti da regioni idrocarburiche in cui sono presenti legami apolari (2).

I lipidi rivestono molti ruoli nelle piante: costituiscono una riserva di energia, determinano la struttura delle membrane e si occupano di alcune vie di trasduzione del segnale.

I lipidi, diversamente da amminoacidi, zuccheri e acidi nucleici, non formano polimeri.

Se ne distinguono 5 classi:

- Acidi grassi liberi (sostanza nutriente)
- Acilgliceroli (riserva di acidi grassi)
- Fosfolipidi (lipidi di membrana)
- Glicolipidi (costituenti di membrana)
- Steroidi (ormoni) (9).

L'assenza di atomi di ossigeno dimostra l'elevata riduzione di questi composti: ciò comporta una maggiore quantità di energia da loro prodotta durante una reazione di ossidazione. Un esempio è la fotosintesi, in cui le sostanze nutritive vengono ossidate ad anidride carbonica ed energia.

Gli acidi grassi liberi sono costituiti da una catena lineare idrocarburica (solo atomi di carbonio e idrogeno) alla cui testa è legato un gruppo carbossilico (acido). Il numero di atomi di carbonio è solitamente pari, frequente C16 o C18.

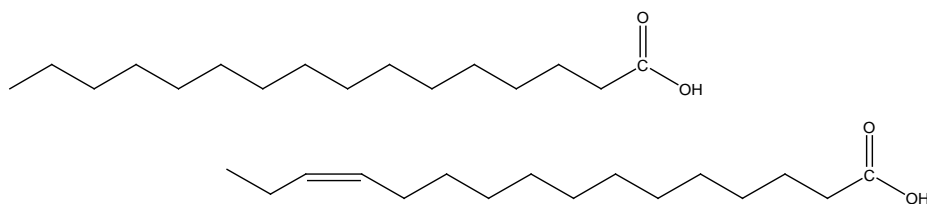


Figura 25 Acidi grassi saturi e insaturi.

Se la catena non contiene doppi o tripli legami è detta satura, altrimenti insatura (figura 25). La maggior parte degli acidi grassi vegetali ha natura insatura (2).

Il nome deriva dall'idrocarburo da cui è formato ossia dal numero di atomi di carbonio che la forma: per esempio l'acido ottadecanoico deriva dall'idrocarburo ottadecano (C18) in cui la numerazione avviene a partire dal carbonio carbossilico.

La presenza di doppi legami comporta un abbassamento del punto di fusione dell'acido e la formazione di una regione rigida a causa delle repulsioni elettroniche che l'insaturazione comporta (9).

In particolare studi dimostrano che la temperatura di fusione varia con la posizione di un doppio legame nella catena dell'acido grasso: si nota che quando il doppio legame si trova tra il carbonio C9 e C10 di un acido grasso C18 la temperatura è minima. La temperatura è anche superiore ai 40°C quando il legame si trova all'inizio o alla fine dell'acido grasso (6).

I lipidi insaturi si trovano soprattutto nelle membrane, nelle riserve e nelle cere extracellulari (esteri di acidi grassi a catena lunga che nei vegetali fungono da strato di protezione).

La combinazione di uno, due o tre acidi grassi con una molecola di glicerolo, alcol a tre atomi di carbonio, determina la formazione degli acilgliceroli, mediante un legame estereo tra l'ossidrilico dell'acido e quello del glicerolo.

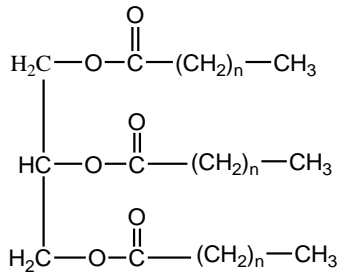


Figura 26 Schema generale di un acilglicerolo.

I triacilgliceroli, detti anche trigliceridi, sono molecole idrofobiche capaci di immagazzinare in modo estremamente efficiente una quantità elevata di energia, nella forma più anidra, e quindi velocemente utilizzabile, possibile.

I fosfolipidi sono lipidi di membrana, abbondanti in tutte le membrane biologiche. Sono costituiti da una struttura molto simile ai trigliceridi: al glicerolo, oltre a due catene lipidiche, è legato un alcol legato ad un gruppo fosforico. Essi hanno un comportamento ambivalente nei confronti dell'acqua: le code sono idrofobe mentre il gruppo fosfato, e la molecola a cui è legato, sono idrofili.

Due catene fosfolipidiche si dispongono parallelamente e sulla base della struttura molecolare, le teste polari si dispongono sulla superficie esterna, a contatto con l'acqua, mentre la coda si posiziona verso l'interno, componendo così un doppio strato fosfolipidico, caratteristico delle membrane cellulari che delimitano la cellula dall'ambiente esterno.

Il glicerolo non è l'unico anello portante: se la catena principale è diversa, questi si dicono fosfogliceridi.

Se il fosfogliceride contiene la sfingosina, un alcol più complesso del glicerolo, esso si definisce sfingolipide. In particolare, il composto ottenuto si può definire anche diacilglicerolo-3-fosfato o fosfatidato.

Tra gli alcol coinvolti vi sono l'amminoacido serina, l'etanolammina, la colina e l'inositolo.

Alcuni lipidi contengono anche una o più molecole di zucchero: glucosio o galattosio frequentemente nelle piante sono legati a dei lipidi. Tra i glicolipidi, quello più semplice è il cerebroside; il più complesso è invece il ganglioside contenente oligosaccaridi fino a sette unità di zuccheri sotto forma di catena ramificata (9).

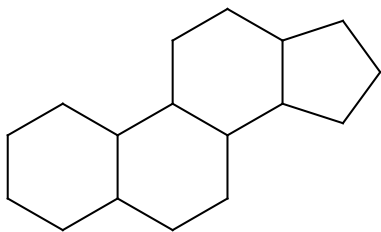


Figura 27 Struttura base steroidea.

Infine vi sono gli steroidi, che si comportano da ormoni e facilitano la digestione dei lipidi ingeriti con la dieta.

A differenza degli altri lipidi, questi presentano una struttura ciclica, costituita da 4 anelli, tre di cicloesano e uno di cicloesano condensati.

A partire dal nucleo steroideo, varie modifiche portano all'elevata diversità degli ormoni.

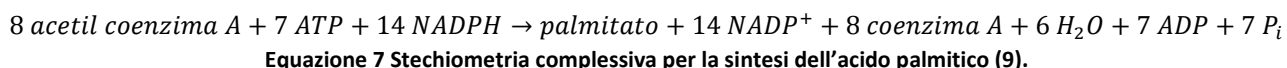
Lo steroide più comune e precursore di molti altri steroidi è il colesterolo, componente delle cellule animali.

Nelle piante, il più comune steroide è la brassinolide, importante per lo sviluppo e la crescita delle cellule: si sintetizza naturalmente da un altro steroide delle piante, il campesterolo.

L'acetil coenzima A è il principale precursore nella sintesi dei lipidi. La sintesi degli acidi grassi avviene in tre fasi:

- Nella prima fase l'acetil coenzima A viene trasportato fino al citoplasma sotto forma di citrato e viene poi ripristinato dalla scissione del citrato, che sintetizza anche ossalacetato.
- Nella seconda fase l'acetil coenzima A con una serie di due reazioni viene trasformato in malonil coenzima A
- Nella terza fase l'acido grasso viene sintetizzato con una serie di reazioni di condensazione, riduzione e deidratazione a partire dal malonil coenzima A appena formato e da un'altra molecola di acetil coenzima A (9).

Tale biosintesi è endoergonica, avviene nei plastidi, e nel complesso, per la sintesi di una molecola di palmitato, acido grasso saturo a 16 atomi di carbonio, presenta la seguente stechiometria di reazione:



Molto spesso acidi grassi prodotti o lo stesso malonil coenzima A sono necessari all'esterno del plastidio: per la loro fuoriuscita si utilizza un cofattore proteico essenziale, la catena trasportatrice di acili (ACP).

Nel reticolo endoplasmatico avviene invece l'allungamento della catena dell'acido grasso.

Il malonil coenzima A è inoltre precursore della sintesi di alcune antocianine, flavonoidi e amminoacidi malonati (6).

Passando ad un livello di complessità superiore, triacilgliceroli, fosfolipidi e sfingolipidi sono sintetizzati a partire da fosfatidato (diacilglicerolo 3-fosfato): esso si forma per condensazione di due acidi grassi con una molecola di glicerolo 3-fosfato.

Per la sintesi dei triacilgliceroli è sufficiente una reazione di acilazione del gruppo fosfato del fosfatidato, mentre per i fosfolipidi, la sintesi avviene a partire da un alcol e un diacilglicerolo: una delle due molecole deve essere attivata (solitamente con citidina trifosfato) poiché la reazione è endoergonica (9).

Entrambi i gruppi di composti vengono sintetizzati nel reticolo endoplasmatico.

Vi sono due vie distinte per la sintesi dei lipidi di membrana: la via procariotica che avviene all'interno dei plastidi e la quella eucariotica nella quale le reazioni di sintesi si svolgono nel reticolo endoplasmatico e i lipidi vengono poi trasferiti ai plastidi all'interno dei quali avviene l'allungamento di catena o eventuali modificazioni (6).

In quest'ultima via vengono sintetizzati gran parte dei fosfolipidi che costituiscono le membrane cellulari a partire dall'acido fosfatidico, nei cloroplasti vengono invece sintetizzati tutti i glicerolipidi.

I lipidi così prodotti differiscono per tipo e posizione di acidi grassi in essi contenuti. In alcuni casi, la loro caratterizzazione chimica permette di risalire al sito di origine (6).

Per gli sfingolipidi, presenti in tutte le membrane plasmatiche degli eucarioti, alla reazione di condensazione della serina con il palmitoil coenzima A, seguono in sequenza una riduzione, un'acilazione e un'ossidazione per la formazione di una ceramide poi funzionalizzata diversamente al gruppo ossidrilico terminale (9).

2.3.3.4 GLI ACIDI NUCLEICI

Gli acidi nucleici sono polimeri lineari, i cui monomeri sono i nucleotidi. I nucleotidi sono costituiti da una base azotata, uno zucchero e un gruppo fosfato. Il blocco zucchero-base azotata, privo del gruppo fosfato, si dice nucleoside; la formazione del legame estereo con uno o più gruppi fosforici porta al nucleotide o nucleoside fosfato.

Lo zucchero è un pentosio, un anello a 5 atomi di carbonio: i pentosi coinvolti sono il deossiribosio e il ribosio, raffigurati in figura 28. Quando l'acido nucleico contiene lo zucchero deossiribosio esso viene definito acido deossiribonucleico o DNA; se invece è presente il ribosio si dice acido ribonucleico o RNA.

Le basi azotate sono invece di due tipi: pirimidiniche (anello non aromatico a sei atomi di carbonio, eterosostituito con atomi di azoto) e puriniche (anello pirimidinico condensato con un anello a cinque atomi di carbonio, entrambi sostituiti da alcuni atomi di azoto). Citosina, timina e uracile fanno parte della prima famiglia, mentre adenina e guanina appartengono alla seconda.

L'uracile è la base azotata che nell'RNA sostituisce la timina.

La sintesi dei nucleotidi con basi pirimidiniche avviene a partire da molecole semplici: la CO₂, l'aspartato e la glutammina, attraverso l'intermedio orotato, nei plastidi, sede principale della biosintesi delle pirimidine.

La sintesi di quelle puriniche, invece, è ben più complessa e poco studiata (6).

L'acido nucleico si forma quando ogni zucchero si lega al successivo mediante un legame fosfodiesterico: il gruppo fosfato fa da ponte tra il carbonio 5' di uno zucchero e il carbonio 1' del successivo formando un nuovo scheletro zucchero-fosfato-zucchero-fosfato che presenta come pendagli le diverse basi azotate, diversificando e rendendo unica ogni catena polinucleotidica.

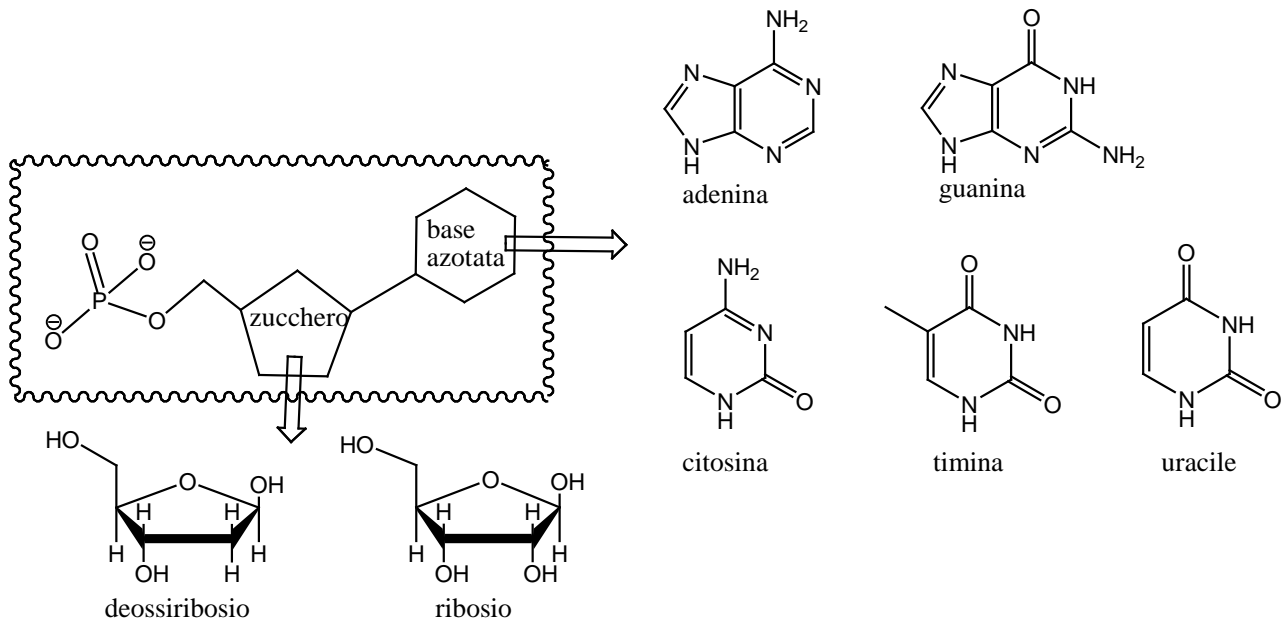


Figura 28 Struttura base e componenti degli acidi nucleici.

Ciascuna catena nucleotidica si avvolge a spirale attorno ad un asse immaginario con una seconda catena polinucleotidica per formare la cosiddetta doppia elica, in cui le basi azotate, poste all'interno dell'elica, sono appaiate nel seguente modo: adenina-timina, citosina-guanina. Nella catena dell'RNA la timina è sostituita dall'uracile che si accoppia sempre con la citosina.

La conoscenza di un filamento permette in questo modo la conoscenza anche delle basi azotate presenti nel filamento accoppiato. I legami che garantiscono questa interazione sono legami idrogeno che, seppur deboli singolarmente, nel complesso hanno un elevato contenuto energetico (2).

2.3.3.4.1 ACIDI NUCLEICI E CODICE GENETICO

I geni sono l'unità di ereditarietà che ogni organismo riceve dal proprio genitore: si tratta di un tratto di DNA caratterizzante per la codifica di una determinata proteina. Esso rappresenta il collegamento tra genotipo (corredo genetico del DNA) e fenotipo (caratteristiche visibili, derivate da specifiche proteine e quindi geni) di un organismo (2).

L'ordine delle basi nucleotidiche determina la struttura primaria della proteina sintetizzata che, a sua volta, determina la funzione che essa svolge nella cellula. Nel DNA perciò è contenuto tutto il materiale genetico ereditato dalle cellule genitori, mentre l'RNA si occupa della trascrizione delle informazioni contenute nel DNA e della sintesi di proteine specifiche.

Nelle piante, a differenza delle cellule procariotiche, il DNA è contenuto in plastidi e mitocondri oltre che nel nucleo, nei quali vi sono anche tutte le strutture necessarie per effettuare la sintesi proteica (6).

I processi a cui il DNA e l'RNA sono sottoposti sono i seguenti: la *trascrizione*, che avviene nel nucleo, in cui sequenze di DNA fungono da stampo per la sintesi dell'RNA; la *traduzione*, in cui un RNA specifico, messaggero, viene decodificato dai ribosomi della cellula ottenendo la sequenza amminoacidica di una o

più proteine che determinano le caratteristiche fenotipiche dell'organismo; la *replicazione*, necessaria per trasmettere alle cellule figlie l'informazione genetica.

Il DNA, serie di geni caratterizzanti, è utilizzato come stampo per la sintesi di una molecola di RNA, nel processo di trascrizione, mediante l'enzima RNA polimerasi. Vi sono tre tipi di RNA, mRNA (messaggero), rRNA (ribosomiale) e tRNA (transfer). Nel primo passaggio si ha la trascrizione di una molecola di pre-mRNA, sottoposto ad una serie di reazioni necessarie per produrre un mRNA, destinato, dopo la sua maturazione, ad essere tradotto in proteina.

Infatti, nel citoplasma, un mRNA viene letto e tradotto nella sequenza amminoacidica dettata dal DNA genitore. Il ritmo di traduzione è di tre nucleotidi per volta, detti codoni: ogni codone, ossia la sequenza di tre basi di mRNA, corrisponde ad un amminoacido. Il raccordo tra l'amminoacido sintetizzato e il codone è gestito da una piccola molecola di RNA detta tRNA, costituito nella sua parte terminale da un anticodone, ossia le tre basi che si appaiano solo e unicamente ad uno specifico codone del mRNA. La corretta interpretazione di questa relazione, cioè l'insieme delle regole attraverso le quali viene tradotta l'informazione codificata nel materiale genetico è detta codice genetico (6).

Il codice genetico è definito degenerare in quanto, se si considerano le possibili combinazioni per la codifica di un amminoacido, alcuni amminoacidi possono essere codificati da più di una tripletta di basi nucleotidiche. Infatti ogni codone ha tre nucleotidi, ognuno dei quali ha solo una delle quattro basi azotate possibili: il numero di possibili codoni è $4^3=64$, rispetto ai soli 20 amminoacidi classificati in natura. Vi sono inoltre tre codoni che non codificano amminoacidi ma sono segnali d'arresto nella traduzione, codoni di arresto o nonsense (UAA, UAG o UGA) (6). Gli acidi nucleici sono fondamentali nella sintesi delle proteine (vedi paragrafo 2.3.3.1) ma soprattutto per la trasmissione del patrimonio genetico di un organismo alle cellule figlie, durante la divisione cellulare. Dapprima i due filamenti della struttura a doppia elica del DNA vengono separati ad opera dell'enzima elicasi utilizzando ATP e delle single-strand-binding-proteins (SSBPs) in grado di mantenere stabile la denaturazione del DNA necessaria per separare le catene polinucleotidiche.

In seguito, le DNA polimerasi permettono di costruire un filamento complementare ad ogni catena polinucleotidica, come fossero uno stampo. La catena però non è direttamente costituita dal DNA appena separato ma viene sintetizzata attraverso un primer, ossia un breve segmento di RNA, complementare allo stampo originale, sintetizzato dagli enzimi primasi specifici. Le DNA polimerasi possono ora aggiungere deossiribonucleotidi all'estremità ossidrilica 3' di un acido nucleico solo in direzione 5'->3'. Per sopperire all'unidirezionalità delle DNA polimerasi, si sono messi a punto due meccanismi di replicazione, uno continuo a partire da un filamento guida, con il proprio segnale di avvio e uno ritardato in cui vengono sintetizzati piccoli frammenti di DNA, detti di Okazaki, anch'essi con il proprio innesco che poi dovrà essere sostituito da DNA con enzimi selettivi.

La replicazione appena descritta è detta semiconservativa perché ognuna delle due nuove doppie eliche di DNA sono costituite da una catena appena sintetizzata ed una originale (9).

2.3.3.4.2 MODIFICAZIONI DEL DNA: LE MUTAZIONI GENETICHE

Per organismo geneticamente modificato s'intende un organismo in cui parte del proprio patrimonio genetico viene modificato con la sostituzione, l'inserimento o l'eliminazione di un tratto di gene non proprio. Queste modificazioni talvolta non portano ad alcun danno alla specie ospite perché la modificazione non riguarda un amminoacido importante per la funzione della proteina, altre invece possono essere dannose poiché producono proteine inattive o determinano la variazione del normale funzionamento della cellula (2). Si dice transgenico un organismo in cui viene unicamente introdotto

nell'organismo ospite un gene da un organismo di specie diversa, cisgenico quando proviene dalla stessa specie. L'inserimento avviene mediante le innovative tecniche d'ingegneria genetica.

In tempi moderni la transgenesi è una tecnica molto utilizzata visti i notevoli vantaggi offerti a livello medico, farmacologico o di ricerca. È applicata su diversi tipi di organismi e permette di valutare la reazione a stress esterni, di progettare farmaci che pongano rimedio a problemi e malattie attuali o, in agricoltura, per imprimere resistenza o maggior sviluppo a piante utilizzate a scopi alimentari.

La modificazione genetica apportata su organismi vegetali è molto sfruttata negli ultimi anni. Le motivazioni sono varie: dal miglioramento sulla produzione alla resistenza ad attacchi esterni, alla creazione di specie nuove all'uso terapeutico. A fini sperimentali, piante transgeniche sono state utilizzate per i vaccini (AIDS, papilloma virus, epatiti, vaiolo ecc).

Per quanto riguarda invece la resistenza, vari batteri sono stati introdotti nelle piante per garantire una maggior tolleranza a stress atmosferici quali temperatura estrema, salinità, siccità e inondazioni, resistenza a virus, funghi e batteri, erbicidi o insetti.

Non di minore importanza è lo studio di piante transgeniche per l'ottenimento di raccolti più abbondanti nelle coltivazioni su larga scala: secondo i dati diffusi dall'ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotechnology Applications), nel 2005 le piante transgeniche occupavano più di 81 milioni di ettari, concentrati prevalentemente negli Stati Uniti, Argentina, Canada, Brasile e Cina. In tutte le nazioni dell'Europa, vengono coltivate piante transgeniche, ma solo con fini sperimentali e in condizioni controllate.

I modi per indurre una mutazione sono vari, tra i più utilizzati l'uso di batteri e virus come vettori per il trasferimento genico. Piccoli anelli di DNA batterico, plasmidi, costituiti dalla sequenza nucleotidica delle proteine d'interesse, vengono inseriti nell'organismo ospite. L'inserimento può avvenire per permeabilizzazione o microiniezione.

Viene ad esempio utilizzato l'*Agrobacterium*, un microorganismo innocuo per l'uomo e molto diffuso in natura, che possiede la capacità di trasferire alcuni suoi geni alle piante, oppure metodi fisici, attraverso la biobalistica, ovvero "sparando" microproiettili ricoperti di DNA dentro le cellule vegetali. Le cellule vegetali ora possiedono oltre al proprio corredo genetico, una parte di codice genetico di tipo procariotico.

Le moderne tecnologie inoltre permettono di selezionare selettivamente il tratto di DNA in cui il transgene andrà ad inserirsi, evitando effetti indesiderati.

Perché la mutazione avvenga è necessario che il DNA ospite sia in grado di dare avvio alla traduzione di quel tratto di DNA estraneo: su quest'ultimo si inserisce anche un primer, adatto al DNA ospite. Una volta nella cellula, il DNA estraneo si replica e riproduce portando con sé informazione genica estranea a quella dell'ospite (2).

Per effettuare fisicamente la clonazione è necessario inserire nel plasmide una proteina di restrizione che permette di tagliare il DNA ospite in modo che quello estraneo possa essere introdotto, delle estremità adesive per ri-unire DNA ospite-DNA estraneo e l'enzima DNA ligasi per formare i legami covalenti necessari.

Le piante, per esempio, sono utilizzate per la produzione di proteine ricombinanti ad uso terapeutico, come ad esempio l'ormone della crescita dell'uomo, prodotto come proteina di fusione con la nopalina sintasi dell'*Agrobacterium* di tabacco e girasole. Ciò è stato possibile sfruttando la capacità dell'*Agrobacterium* di infettare le piante attraverso il trasferimento e la successiva integrazione nel DNA cromosomico di una regione del proprio plasmide Ti (induttore di tumore a livello del colletto della pianta), senza dover purificare la proteina ottenuta (21).

I plasmidi sono strutture circolari di DNA libero all'interno della cellula, presenti in specie batteriche come gli *Agrobacterium*, in grado di autoreplicarsi, indipendentemente dal DNA dell'organismo ospite. Non costituiscono organelli essenziali per i batteri ma conferiscono alcuni vantaggi come la resistenza agli

antibiotici o la capacità di metabolizzare sostanze non comuni o complesse in sostanze essenziali per il sistema.

Questi contengono un segmento di DNA detto T-DNA, contenente geni per la sintesi di opine, di enzimi che le degradano e di fitormoni come auxine e citochinine. Le opine sono composti derivati dagli amminoacidi che possono esser prodotti unicamente dopo la codifica del T-DNA nei plasmidi di certi batteri, che riescono poi a degradarle in componenti essenziali quali carbonio e azoto. Quando il T-DNA entra nel nucleo, si integra con il DNA dell'organismo ospite. L'eccesso di fitormoni prodotti può causare una crescita abnorme dei tessuti modificati, poiché avvia vie metaboliche prima non utilizzate, accartocciamento delle foglie, riduzione di produzione del seme e del tempo di vita della pianta (22).

Un altro esempio è il riso, un alimento povero di vitamina A, la cui mancanza nella dieta nell'uomo potrebbe causare gravi disturbi, come la cecità. L'introduzione del gene responsabile della sua biosintesi può diminuire il rischio di tali problematiche nei paesi orientali, grandi consumatori di riso.

Dalla controparte, numerose discussioni sui possibili effetti negativi dovuti alla modificazione genetica: modificazione equilibrio pianta-ambiente, invasività della stessa perché più resistente, annullamento della biodiversità, alterazione dei valori nutrizionali ed infine effetti tossici delle proteine sintetizzate in questo modo. Indubbio è il controllo attuato a livello scientifico, sia sul rischio ambientale sia sul rischio per la salute dell'uomo (23).

2.3.4 I METABOLITI SECONDARI

In generale i prodotti naturali o metaboliti primari sono definiti come quei composti che influenzano le interazioni ecologiche tra la pianta e l'ambiente (6).

I metaboliti secondari possono essere classificati in diversi modi: sulla base della struttura chimica, della composizione, della solubilità in vari solventi o mediante il processo di sintesi.

Una prima classificazione basata sulla struttura chimica della sostanza risulta abbastanza difficoltosa vista la complessità chimica reale dei composti costituenti il pattern metabolico delle piante, la combinazione tra molecole diverse e la varietà tra le specie.

Nel presente lavoro di tesi si è deciso di seguire la suddivisione proposta da Housome (11), in cui si presentano quattro principali classi di composti, sulla base della composizione chimica di base: composti fenolici (circa 8000 composti), terpenoidi (circa 25000), alcaloidi (circa 12000) e gluconosilati ossia composti contenenti zolfo (11).

2.3.4.1 I COMPOSTI FENOLICI

I composti fenolici e polifenolici sono costituiti da un anello aromatico o fenolico (contenente un gruppo acido) nella sua struttura di base. Molti composti sono a basso peso molecolare, ma con la polimerizzazione possono assumere anche pesi maggiori. Oltre al ruolo fondamentale nella composizione della membrana plasmatica della cellula, sono importanti per i meccanismi di difesa agli stress ambientali, per la formazione di lignina, il polimero principale costituente il legno, come molecole odorose. Circa il 40% del carbonio disponibile nella biosfera deriva proprio dai composti fenolici presenti come fenilpropanoidi o tannini idrolizzabili (24).

La sintesi dei composti fenolici nelle piante, come flavonoidi, lignina e acidi fenolici, può essere stimolata da agenti esterni come l'attacco microbico, la radiazione solare, la temperatura o ancora stress chimici (11).

I composti fenolici, come moltissimi altri metaboliti secondari, seguono il percorso metabolico dell'acido shikimico, con un evidente aumento in concentrazione quando la pianta è sottoposta ad attacco batterico (25). In figura 29 si evidenziano tutti i prodotti derivati dalle trasformazioni operate dall'acido shikimico.

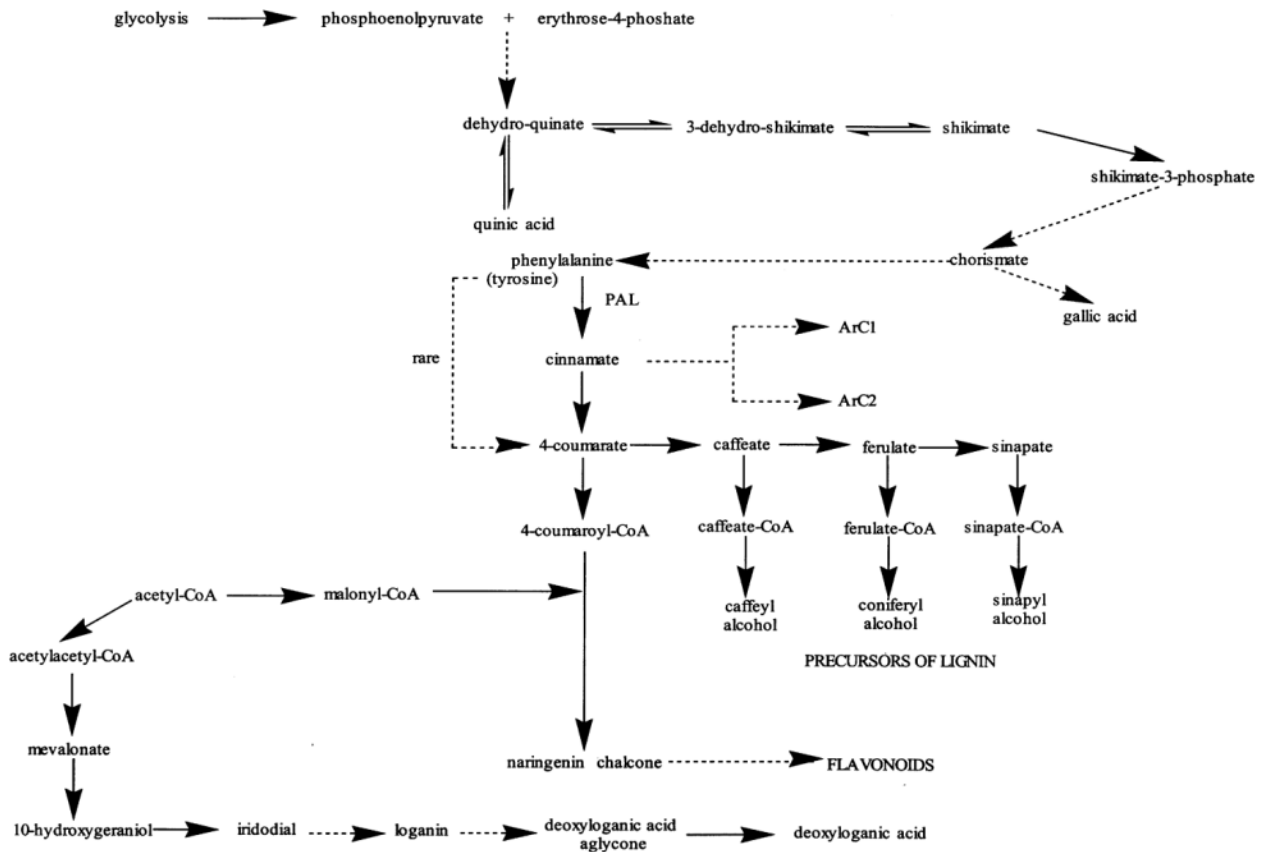


Figura 29 Meccanismo biosintetico dei composti fenolici (26).

Tra i prodotti della via metabolica dell'acido shikimico vi sono importanti aminoacidi aromatici come la fenilalanina e la tirosina attraverso l'intermedio corismato. I carboidrati sono la fonte principale per questo metabolismo che avviene unicamente nei cloroplasti.

La fenilalanina poi è substrato di partenza per il cosiddetto metabolismo dei composti fenilpropanoidici: in questa via vengono prodotti alcuni alcaloidi, acidi idrossicinnamici, precursori di lignine e lignani e flavonoidi. La biosintesi solitamente avviene nel citoplasma, dove sono contenuti gli enzimi per le reazioni di sintesi e quelli di trasporto verso gli altri tessuti che richiedono l'utilizzo delle sostanze prodotte (26).

I flavonoidi sono una classe di composti fenolici, solubili in acqua, che prendono il nome dal loro colore in natura, il giallo. Sono composti da almeno tre anelli a 6 atomi di carbonio (15 atomi di carbonio perché tre sono in comune), due aromatici e il terzo ossigeno sostituito, condensati e non, coinvolti nella filtrazione della luce, nel fissaggio dell'azoto e nella colorazione di fiori e foglie. Sono composti segnale prodotti e rilasciati come essudati dalla radici in caso di infezione da batteri. Alcuni flavonoidi hanno la capacità di difendere la pianta dalle radiazioni UV-B, come il kaemferolo, altri come la luteolina e apigenina sono coinvolte nel meccanismo di risposta all'interazione pianta-batterio e favoriscono l'assorbimento dell'azoto (6).

Da studi in vitro si deduce un'elevata attività anti-infiammatoria, proprietà epatotossiche, estrogeniche e cardio-protettive (27).

Essi sono molto diffusi in natura e nelle cellule vegetali si ritrovano soprattutto nei vacuoli (6).

Nella tavola in figura 30, si presentano le vie metaboliche di sintesi dei flavonoidi con i relativi enzimi utilizzati.

Nodi cruciali e svincoli per la sintesi di molecole differenti, sulla base del sito/ tessuto in cui le reazioni avvengono, sono per esempio la liquiritigenina, il p-cumaroil coenzima A, la quercitina e il kaemferolo.

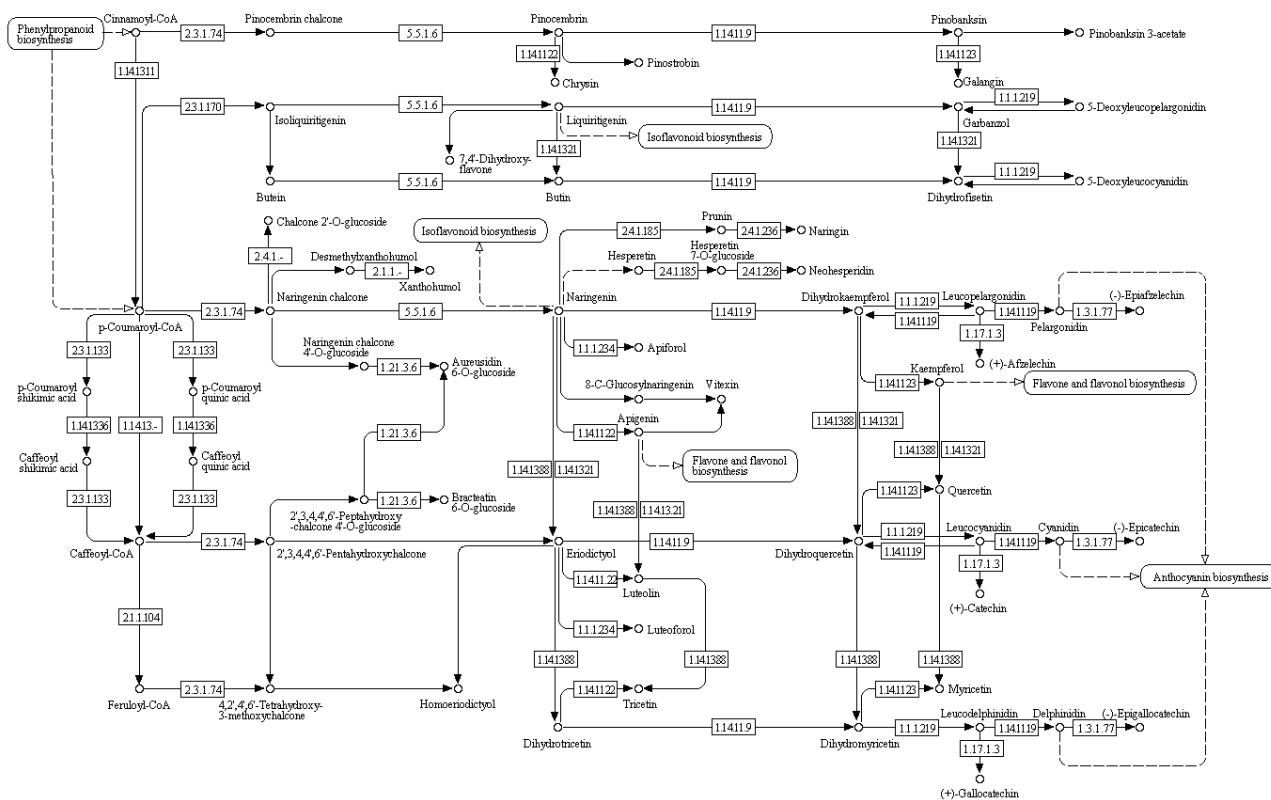


Figura 30 Vie biosintetica dei flavonoidi (10).

Questo ricco gruppo di composti, sulla base dei vari atomi o gruppi funzionali legati agli anelli, si può suddividere in alcuni sottogruppi (11).

Tabella 1 Suddivisione in sottoclassi dei flavonoidi (11).

NOME	STRUTTURA BASE	CARATTERISTICHE	ESEMPI
Flavonoli		Presenti in frutta e verdura. Diversi per la posizione del gruppo ossidrilico	Quercitina, Kaempferolo, Isoramnetina
Flavoni		Presenti in erbe e cereali. Studi sull'effetto anti-sclerosi, osteoporosi, diabete e alcuni cancro.	Apigenina, luteolina
Antocianidine		Pigmento vegetale	Cianidine, delfinidine, malvidina
Calcione		Agente anti tubercolosi	

La sintesi dei singoli composti può essere ricostruita seguendo la singola via metabolica nella mappa in figura 30.

Tra i metaboliti secondari sintetizzati dalle piante, i più diffusi sono i composti fenolici, composti da almeno un anello aromatico legato a uno o più gruppi idrossilici: questi derivano dallo stilbene.

Tra questi si citano l'acido gallico, l'acido caffeico, l'acido vanillico, l'acido cinnamico e l'acido cumarico. L'acido salicilico, anch'esso un acido carbossilico derivante dal metabolismo dei composti fenolici, ha un ruolo come molecola segnale in risposta a stress ambientali, in particolare in seguito a attacchi di organismi patogeni come insetti e batteri.

Come l'acido salicilico, molti di questi acidi fenolici hanno un'attività antipatogena e allopatica. Acidi come il benzoico e derivati, il vanillico e il caffeico invece sono degli ottimi antimicrobici. Gli acidi idrossicinnamici e i loro derivati (acidi clorogenico, sinapico, ferulico e p-cumarico) possiedono una forte attività antiossidante tanto da inibire l'ossidazione dei lipidi. Altri ancora come l'acido siringico sono responsabili del gusto amaro e astringente di alcune verdure (11) o danno il caratteristico odore e profumo al caffè, alla vaniglia, tè, nocciole e peperoncino (27).

Ciò che diversifica enormemente il pattern metabolico delle singole piante è la combinazione dei metaboliti secondari con altri acidi, con zuccheri o poliammine. Le poliammide ad esempio si combinano spesso con gli acidi idrossicinnamici, formando, tra i metaboliti più comuni, la caffeoilputrescina o la cumaroilspemidina, largamente diffusi poiché coinvolti nei processi di sviluppo e di risposta agli stress subiti dalla pianta (28).

I lignani sono invece composti bifenolici coinvolti nella sintesi della lignina, componente idrofobica principale della parete cellulare. I lignani delle piante derivano dalla fenilalanina attraverso la dimerizzazione di alcol cinnamici sostituiti e un nucleo dibenzilbutanico. Anche questi composti (come pinosresinolo, podofillotossina e steganacin) hanno un ruolo di difesa, in risposta all'attacco di insetti e sono una delle più importanti classi dei fitoestrogeni (11).

L'importanza di questi composti è anche legata al metabolismo dell'uomo: molti composti come secoisolariciresinolo, matairesinolo e pinosresinolo possono essere convertiti in enterolignani dalla flora batterica intestinale e assorbiti dal corpo, dimostrando spiccate attività antiossidanti, anti-estrogeniche e di riduzione di alcuni tipi di cancro (11).

2.3.4.2 I TERPENOIDI

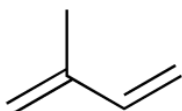


Figura 31 Isoprene.

I terpenoidi sono una classe molto ricca di composti derivati dalle trasformazioni su un'unità isoprenica (con 5 atomi di carbonio), mostrata in figura 31.

Sulla base del numero di unità di isoprene connesse, i terpenoidi si distinguono in mono-, di-, sesqui- e triterpeni (27).

Molti terpeni prodotti dalla pianta sono composti volatili che attraggono specifici insetti per l'impollinazione o inibiscono la germinazione o lo sviluppo di piante competitive (29). Sono importanti anche per la colorazione di alcuni fiori, il profumo di piante o radici commestibili.

Essi hanno un ruolo importante nei tradizionali rimedi alle erbe, come antibatterici, antitumorali e per altre proprietà farmaceutiche. Ben conosciuti sono i cannabinoidi, anch'essi terpenoidi.

I terpenoidi hanno diverse proprietà, sulla base delle quali possono essere suddivisi:

- componenti strutturali di membrana (fitosteroli)
- pigmenti fotosintetici (fitolo, carotenoidi)
- trasportatori di elettroni (ubichinone, plastochinone)
- ormoni (gibberelline, acido abscisico)
- mediatori nell'assemblaggio di polisaccaridi (poliprenil fosfato).

I terpenoidi sono inoltre largamente sfruttati a livello industriale per la produzione di polimeri come adesivi, gomme, vernici, ma anche prodotti fitosanitari in agricoltura (30).

Ogni gruppo di molecole ha un particolare ruolo nelle attività della pianta: i carotenoidi forniscono diverse colorazioni alle verdure e sono precursori nella sintesi di fitormoni, modulando lo sviluppo delle cellule; i tocoferoli proteggono la membrana dei cloroplasti dove avviene la sintesi sia della clorofilla che dei carotenoidi; infine gli steroli sono fondamentali nella cellula perché garantiscono la fluidità e la permeabilità del doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari (11).

Per quanto riguarda la via metabolica di sintesi dei terpenoidi vi sono due possibilità: un percorso è quello dell'acido mevalonico (MVA), mentre il secondo è il cosiddetto MEP/DOXP (2-C-metil-D-eritritolo 4-fosfato/1-deossi-D-xilulosio 5-fosfato). Il primo percorso, il più utilizzato, è sfruttato in batteri, piante, animali e funghi, mentre il secondo è intrapreso da batteri, alghe e piante.

I due percorsi sono presentati in figura 32, come raffigurati dal database Kegg Pathway.

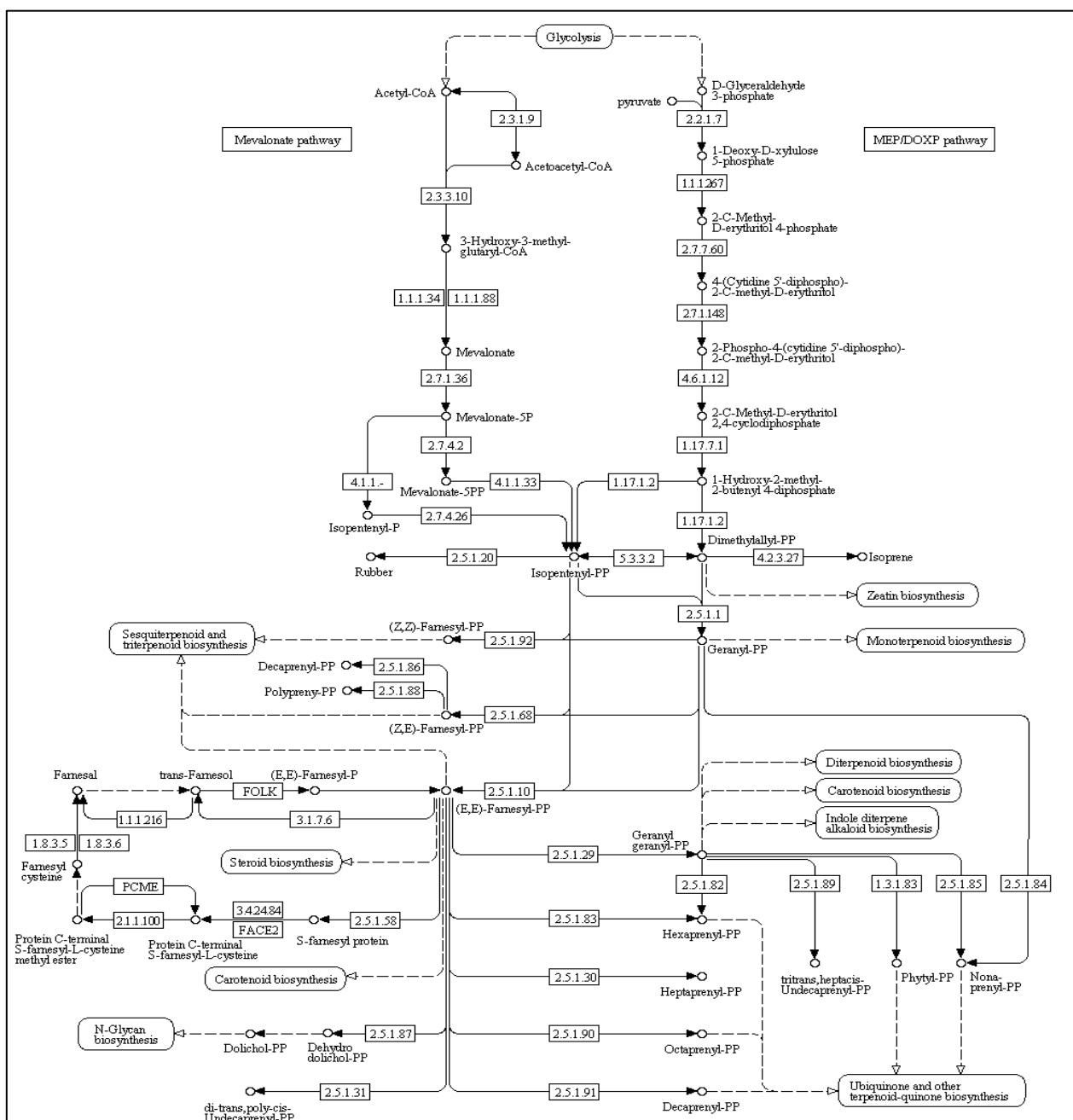


Figura 32 Percorso metabolico dei terpenoidi e derivati (10).

Nel primo step della via MVA, c'è la conversione dell'acetil coenzima A nella specie IPP (isopentenil pirofosfato) da cui si attiva la sintesi dei blocchi principali di sesqui- e triterpenoidi.

In base alla funzione che svolgono, ci sono tre siti diversi per la sintesi di questi composti: nel citosol vengono prodotti sesquiterpenoidi e triterpenoidi, nei plastidi si sintetizzano mono-, di- e tetraterpenoidi e infine nei mitocondri e/o nell'apparato di Golgi l'ubichinone (30).

2.3.4.3 GLI ALCALOIDI

Gli alcaloidi sono una classe di composti, dalla composizione più svariata e disomogenea, costituiti da carbonio, idrogeno e azoto, talvolta anche ossigeno. Nella struttura è solitamente presente un gruppo con proprietà acide. Si pensa che la presenza di azoto nella struttura della molecola sia dovuta all'amminoacido da cui esso è stato prodotto, come per esempio l'acido nicotinico deriva dall'acido aspartico e dal triptofano.

Gli alcaloidi sono prodotti naturali delle piante ma anche di funghi, batteri o animali. Il ruolo degli alcaloidi negli organismi vegetali è principalmente quello di difesa: in molti casi infatti sono composti tossici per insetti e microrganismi. La loro varietà strutturale riflette la diversità dei loro effetti e delle proprietà che possiedono. Molti alcaloidi, date le loro proprietà bioattive, sono usati a scopo terapeutico come analgesici o antitumorali nell'industria farmaceutica (morfina), altri invece sono importanti stimolanti per l'industria alimentare e nutraceutica (caffeine e nicotina), altri infine droghe (cocaina), veleni (stricnina) o composti allucinogeni.

Una classificazione semplice degli alcaloidi sarebbe impossibile vista la vastità delle combinazioni chimiche strutturali con altre molecole in cui essi sono coinvolti, ma ci si può limitare a distinguere gli alcaloidi sulla base della struttura chimica di partenza, che può essere indolica, pirrolidinica (lobelina), pirazolica, tropanica (atropina), imidazoica (pilocarpina).

Il meccanismo biosintetico è molteplice: vi sono varie vie che portano alla formazione dei diversi alcaloidi e derivati.

- Sintesi alcaloidi indolici (dal triptofano)

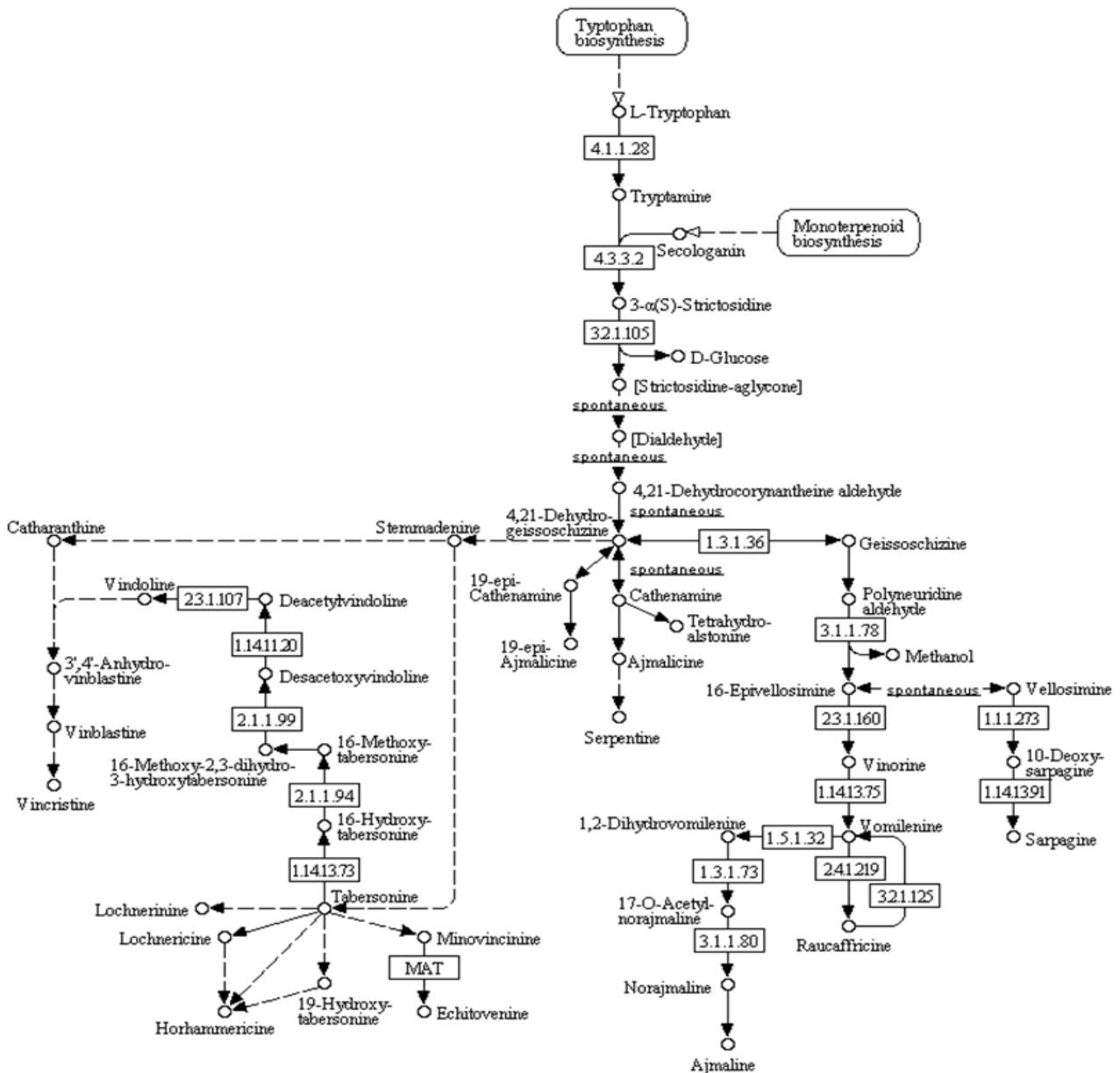


Figura 33 Sintesi di alcaloidi con struttura base indolica (10).

- Sintesi alcaloidi con base tropano, piperidina e piridina (da lisina, arginina e prolina)

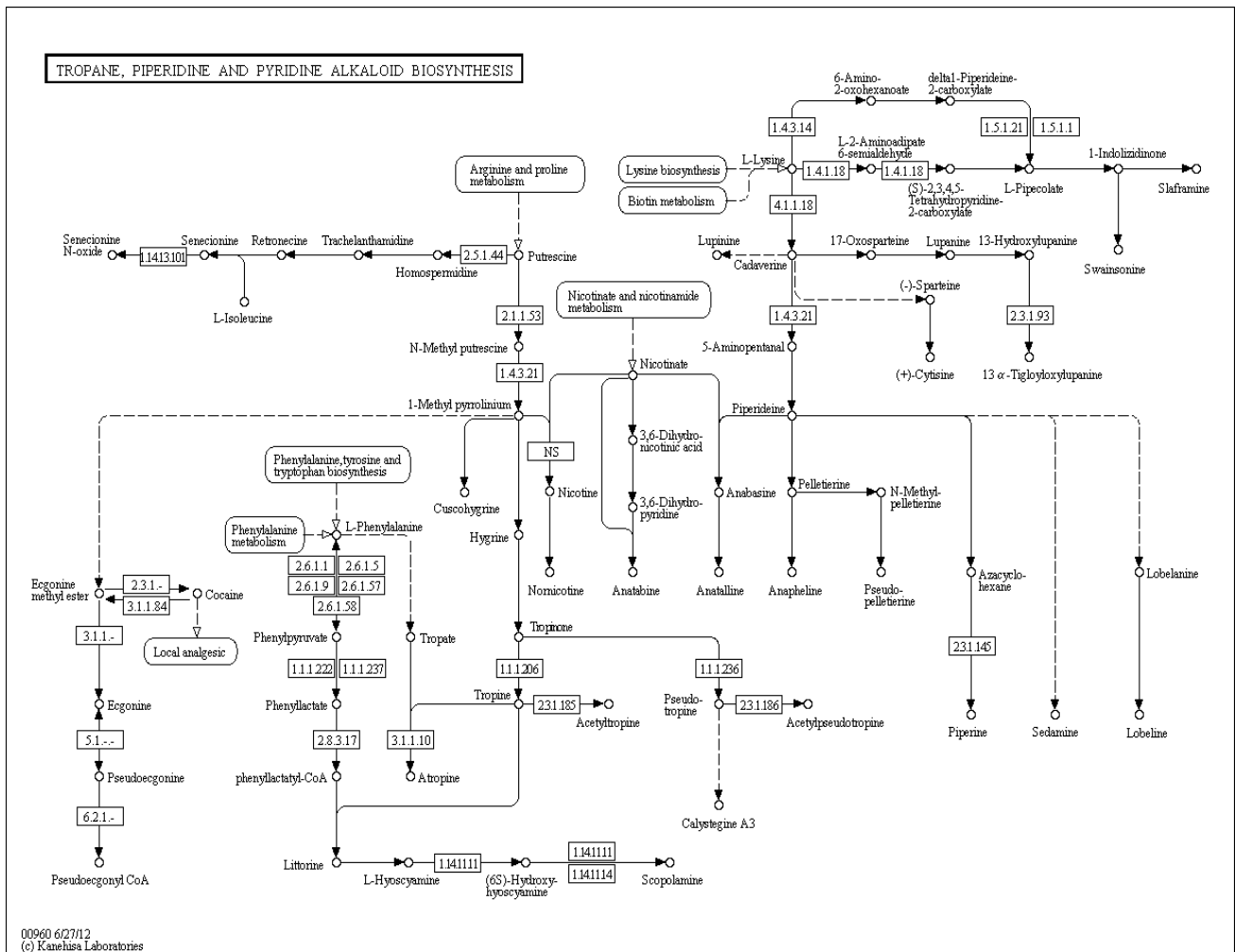


Figura 34 Sintesi di alcaloidi a partire da tropano, piperidina e piridina (10).

Questo meccanismo biosintetico è strettamente legato a quello di sintesi della nicotina e tutti i suoi derivati, anch'essi classificati come alcaloidi.

- Sintesi di alcaloidi dall'ornitina: ne derivano composti pirrolidinici, pirrolizidinici o derivati come putrescina o spermidina

- Sintesi di composti imidazolici: esiste una via che utilizza l'istidina ed una che utilizza la purina.

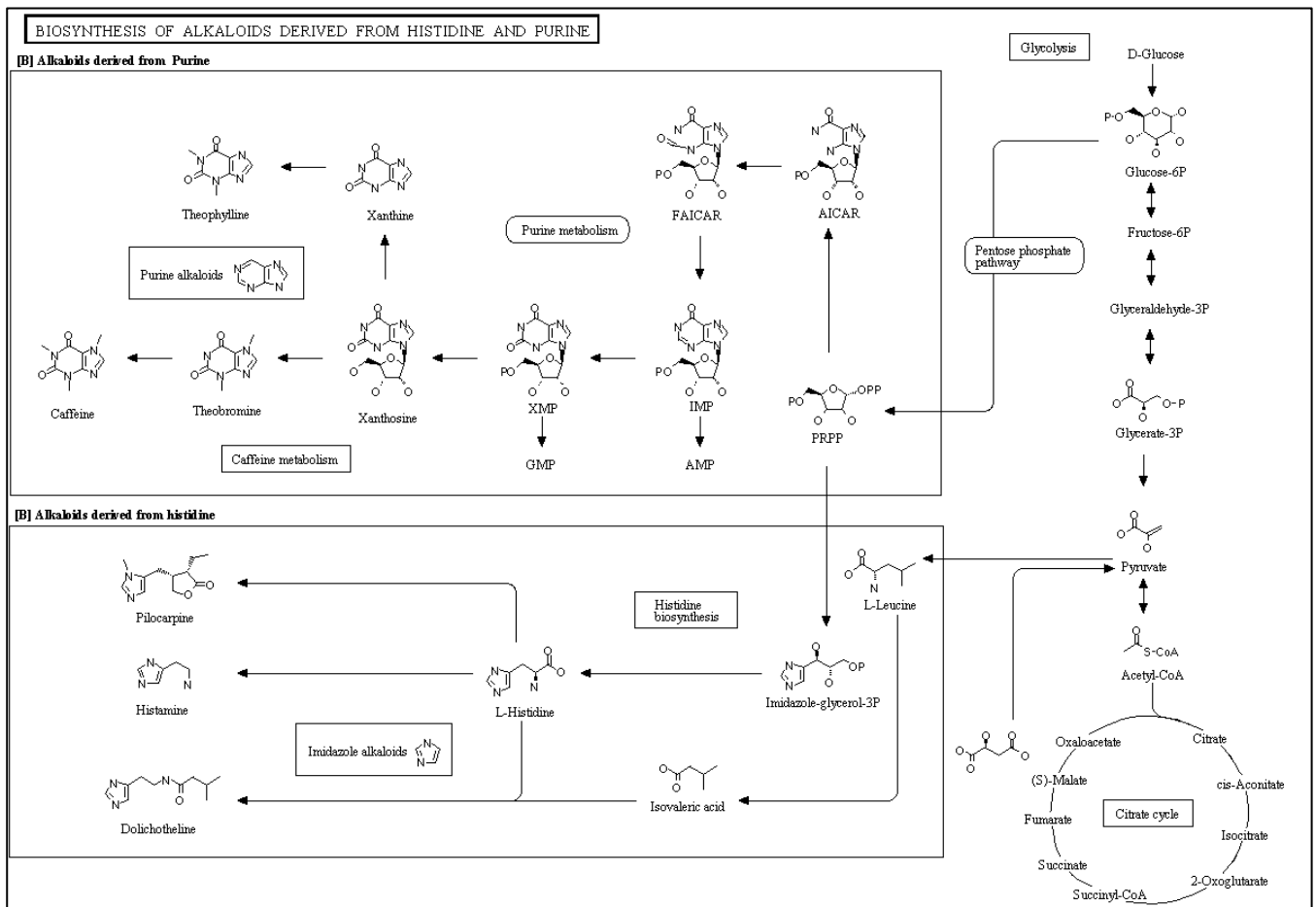


Figura 35 Sintesi alcaloidi da istidina e purina (10).

In questa via viene prodotta la caffeina.

Come spesso accade nei sistemi biologici, vi è la possibilità che gli alcaloidi si combinino con altre componenti presenti nella pianta: una classe particolare degli alcaloidi è quella dei glucoalcaloidi detti anche saponine. Le saponine sono composti da una o più unità glucosidiche idrofiliche legate ad un triterpenoide. La loro caratteristica, proprio come evidenzia il nome, è l'attività surfattante che si manifesta con la formazione di schiuma quando miscelati in acqua. Nelle piante hanno un ruolo fondamentale nella difesa da attacchi microbici o da erbivori. Nella dieta, abbassano il livello di colesterolo nel sangue e inibiscono la crescita di cellule tumorali. Alcune saponine però possono essere tossiche sia per l'uomo che per animali e insetti (11). Dalla combinazione con steroli, si possono identificare anche alcaloidi steroidei come la solanidina, un alcaloide caratteristico della famiglia delle *Solanaceae*.

2.3.4.4 I GLUCOSINOLATI

I glucosinolati sono un gruppo di composti derivati da aminoacidi contenenti atomi di zolfo, e un gruppo derivato dal glucosio o altri zuccheri (11). La loro struttura contiene inoltre uno o più atomi di azoto: risultano perciò una classe piuttosto limitata.

La loro struttura può essere alifatica, aromatica o indolica sulla base dell'amminoacido da cui derivano. Gli aminoacidi che presentano un atomo di zolfo sono la metionina e la cisteina, ma i composti glucosinolati derivano anche dalla fenilalanina, triptofano e tirosina.

Tra questi composti si cita la progoitrina e la sinigrina presente nei cavolfiori, glucoiberina e la gluconasturtina, presente nei cavoli e nei broccoli.

Dai glucosinati si ricavano pesticidi e sostanze di difesa da attacco di erbivori.

Questi composti vengono facilmente idrolizzati in oli dall'enzima mirosilasi per dare isocianati e derivati che agiscono come protettori da agenti esterni. Inoltre i glucosinolati sono precursori di composti responsabili dell'aroma, soprattutto amaro e pungente di molte verdure (11).

L'enzima mirosilasi è situato negli idioblasti, cellule completamente diverse dal resto dei tessuti che fungono da sacca di riserva per oli, resine e gomme (31).

La biosintesi di questi composti consiste in una prima elongazione dell'amminoacido di partenza, lo sviluppo del cuore della struttura con reazione di ossidazione, solfonazione o glucosilazione che portano ad una struttura di natura basica e infine la modifica delle catene secondarie (31).

Il meccanismo proposto è riassunto in figura 36.

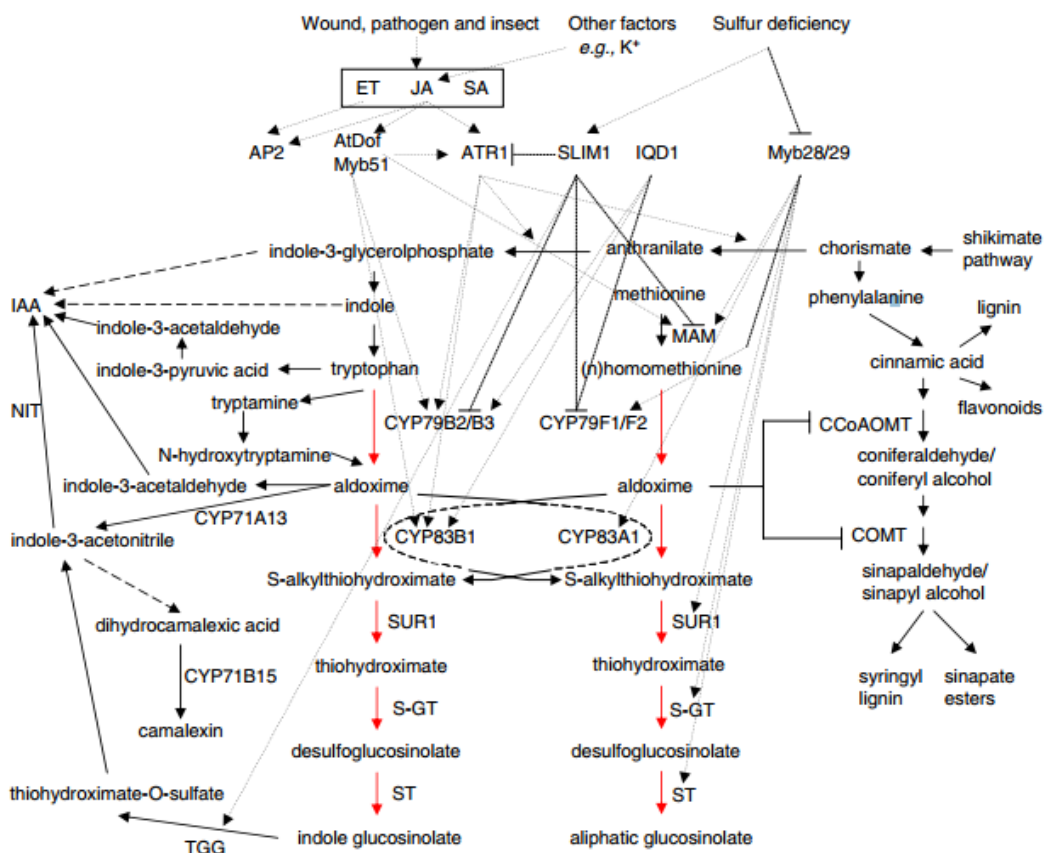


Figura 36 Sintesi composti glucosinolati per azione di agenti patogeni o stress (32).

In figura 36, si evidenzia come la formazione di questi composti possa essere dovuta a condizioni di stress esterni, come agenti patogeni o insetti (32).

2.3.5 METABOLOMICA

La metabolomica è lo studio sistematico delle uniche impronte chimiche lasciate da specifici processi cellulari; essa riguarda tutti i processi chimici che coinvolgono i metaboliti presenti in un sistema biologico come una cellula, un tessuto o un organismo nella sua interezza. La metabolomica, nella sua forma più ambiziosa, ha come obiettivo la caratterizzazione completa di tutti i metaboliti, conosciuti e sconosciuti,

presenti in un certo sistema biologico. Essa trova applicazione in diversi ambiti di ricerca, dal controllo di qualità di prodotti alimentari, alla caratterizzazione strutturale di nuove molecole, all'identificazione di molecole bioattive di interesse farmaceutico, allo studio delle interazioni tra i diversi livelli funzionali di un organismo biologico (genomico, trascrizionale, metabolico) (33). Ampio sviluppo negli ultimi anni sta avendo l'applicazione della metabolomica allo studio delle piante, sia nella ricerca di base per approfondire la conoscenza dei meccanismi metabolici, sia per diretta applicazione alimentare o farmaceutica. Uno degli ambiti di interesse è lo studio dei meccanismi di difesa e risposta delle piante, sottoposte a stress ambientali o a modificazioni genetiche, al fine di identificare potenziali applicazioni in ambito agricolo, in un contesto sempre più vicino al cambiamento climatico, per far fronte all'incremento della richiesta alimentare e alla necessità di selezionare organismi resistenti alle più comuni condizioni ambientali sfavorevoli. In questo caso la metabolomica si sta rivelando uno strumento importante per rilevare gli effetti di modifiche genetiche a livello metabolico, identificare gli organismi con determinate caratteristiche di interesse nonché confrontare i profili metabolici di organismi di diverse specie o cresciuti in differenti condizioni ambientali (34).

Mediante l'utilizzo di diverse tecniche analitiche, la metabolomica permette di caratterizzare in modo completo un sistema biologico, identificando le relazioni tra metaboliti e vie biosintetiche e le relazioni causa-effetto tra metabolismo e fattori esterni.

Ogni organismo, qualunque esso sia, ha un proprio pattern di metaboliti primari e secondari che lo identifica e soprattutto diversifica da altre specie. Individuare le componenti chimiche di un sistema, anche in condizioni non usuali, permette di ricostruire i meccanismi metabolici della pianta dalla sua nascita fino alla morte, spontanei o causati da agenti esterni.

Vista la vastità delle matrici ambientali esistenti, la varietà di strumenti analitici che è possibile utilizzare, la numerosità delle tecniche preparative dei campioni impiegate, non esiste a tutt'oggi un metodo univoco di analisi metabolomica, valido per ogni matrice; è stato però possibile negli anni verificare una procedura pre-analitica e strumentale il più adatta possibile ai diversi sistemi biologici.

La nascita del gruppo "Chemical Analysis Working Group" (CAWG) permise la stesura di dati standard minimi riguardanti gli aspetti chimici di un'analisi metabolomica tra cui la preparazione del campione, l'analisi sperimentale, il controllo qualità, l'identificazione dei metaboliti e l'elaborazione dei dati in modo tale da garantire la riproducibilità delle analisi e confrontabilità del dato ottenuto (35).

Sulla base di prove sperimentali e presupposti teorici, il CAWG ha proposto le condizioni operative ritenute migliori per l'analisi metabolomica "untargeted" di campioni biologici, cioè volta all'identificazione non mirata di tutti i metaboliti presenti nel campione (36).

In esso si descrivono i diversi metodi di estrazione del campione, la necessità di avere almeno tre repliche indipendenti di un campione (35), il tipo di conservazione del campione, la tipologia di colonna cromatografica da utilizzare per diversi tessuti, gli strumenti di analisi e relativi parametri, i software di supporto per l'identificazione dei metaboliti.

Le tecniche analitiche più utilizzate in metabolomica sono la spettrometria di massa e l'analisi NMR, che permettono di effettuare misure ad elevata risoluzione, identificando spesso in maniera univoca le molecole, garantendo l'assegnazione di un nome IUPAC a partire da spettri di frammentazione di massa e in relazione alle sue caratteristiche strutturali (risonanza tra atomi attivi).

Ad oggi si utilizzano tecniche via via sempre più sofisticate come la separazione cromatografica con uno strumento UHPLC, accoppiato ad uno spettrometro ad alta risoluzione e accuratezza, l'uso di tecniche ifenate MS-NMR o ancora lo sviluppo di sistemi automatizzati per l'analisi dei dati con il supporto di banche dati sempre aggiornate (33).

La cromatografia permette di definire proprietà come la polarità e idrofobicità delle molecole separate: tempi di ritenzione differenti ne determinano le caratteristiche (33).

La spettrometria di massa, invece, per l'identificazione e la caratterizzazione dei metaboliti, sfrutta la misura accurata del rapporto massa/carica delle molecole, ioni e frammenti, la determinazione dell'abbondanza isotopica relativa degli ioni e infine la frammentazione di alcuni ioni genitori (37).

È possibile stabilire 4 livelli d'identificazione dei metaboliti.

I livelli sono i seguenti:

1. Confidently identified compounds
2. Putatively annotated compounds
3. Putatively annotated compounds classes
4. Unknown compounds.

Il primo livello, in cui la probabilità di un'accurata identificazione è alta, si ha confrontando due o più proprietà con uno standard dell'analita, analizzato nelle medesime condizioni di analisi. Nonostante ciò, anche con l'utilizzo di uno standard non è possibile distinguere diversi isomeri con le medesime caratteristiche cromatografiche o di massa, specialmente se stereoisomeri (37).

Si può assegnare un nome a una molecola con livello di confidenza 2 nel caso in cui non si sia in possesso di standard di confronto e si valutino caratteristiche chimico-fisiche e/o spettri di massa presenti in letteratura (35): questo è il livello massimo di accuratezza assegnabile nell'identificazione di analiti in assenza di uno o più standard.

In LC-MS e UHPLC-MS la precisione nella misura del rapporto m/z fa sì che siano sufficienti spettri di frammentazione e tempi di ritenzione per confrontare un analita con una molecola a cui è stato precedentemente assegnato nome e struttura (37).

Quando invece sono solo le proprietà chimico-fisiche caratteristiche di una classe di composti ad essere confrontabili con i dati ottenuti, si può assegnare un livello di identificazione 3 (35).

Infine nel livello 4 rientrano tutti i metaboliti a cui non si è assegnato una formula bruta o di struttura oppure quando, pur non avendo conferma da dati di letteratura o database, è possibile ipotizzare una formula bruta nuova.

Per effettuare una corretta identificazione delle molecole nell'analisi untargeted è necessario avere informazioni pregresse riguardo alle molecole che possono essere presenti nel sistema in studio, al fine di poter discriminare tra i composti più o meno probabili all'interno delle librerie o perlomeno delle classi di metaboliti di interesse.

L'identificazione richiede l'utilizzo della formula bruta, il confronto con gli spettri di massa e di frammentazione presenti nelle librerie, che devono essere noti e corrispondere con quelli della molecola ignota. È utile inoltre la conoscenza delle vie biosintetiche e la verifica di una possibile relazione con altre molecole precedentemente identificate.

Sulla base delle conoscenze pregresse dell'utente sul sistema biologico in esame e il suo metabolismo, è possibile infine caratterizzare le componenti chimiche del sistema e verificare gli effetti delle modificazioni genetiche e/o stress subiti.

3. Materiali e metodi

3.1 I campioni: piante di *Nicotiana Langsdorffii*

La *Nicotiana L.* è un genere di piante appartenente alla divisione delle *Magnoliophyta* e alla famiglia delle *Solanaceae*. È una pianta proveniente dal Nord e Sud America, dall'Australia, dal Sud Africa occidentale e dal Pacifico meridionale. Si contano circa 57 specie conosciute di *Nicotiana*, dai vari utilizzi (38).

Di tutte le specie, la più conosciuta è *Nicotiana Tabacum*, sfruttata per la produzione di foglie di tabacco: il nome deriva dal francese Jean Nicot, ambasciatore francese in Portogallo, che nel 1561 la presentò alla corte reale francese come farmaco per eliminare alcuni tipi di vermi o parassiti dell'intestino; successivamente venne utilizzata nel continente americano come pianta ornamentale e per la produzione di tabacco.

La *Nicotiana* è una delle piante più intensamente studiate, non solo per l'importanza economica ma anche per quanto riguarda i problemi legati alla salute dell'uomo (38).

Numerosi studi riguardano la sua evoluzione, diffusione, le caratteristiche fisiologiche e molecolari. È stata inoltre utilizzata lungamente come pianta modello per lo studio degli effetti dovuti all'applicazione di modificazioni genetiche, in particolare a *Nicotiana Langsdorffii* Weinmann e *Nicotiana Glauca*.

Nel presente lavoro di tesi la specie utilizzata è *Nicotiana Langsdorffii* Weinmann sia di tipo Wild, ossia senza alcuna modificazione, sia soggetta a mutazione genetica e/o sottoposta a stress ambientali. La modificazione genetica, ossia l'inserimento nella pianta di un contenuto genetico non proprio, produce uno sbilanciamento nell'equilibrio dei fitormoni presenti e un significativo cambiamento nella risposta di difesa agli agenti esterni (39).

Le piante, prodotte in vitro come cloni e cresciute in condizioni controllate, sono state sottoposte a stress biotici (modificazione genetica) e abiotici (stress termico, idrico e chimico (Cr^{VI})) per verificare la risposta chimica e metabolica della pianta e gli eventuali effetti dovuti alla combinazione di stress diversi sul medesimo organismo.

Le piante analizzate sono state trasformate con il gene per il recettore dei glucocorticoidi di ratto (recettore GR) e con il gene ROL C, proveniente da *Agrobacterium rhizogenes*: per entrambe le modificazioni genetiche, la moltiplicazione di ciascun genotipo è stata ottenuta prelevando porzioni dello stelo comprendenti gli internodi (40) e inserite nella pianta wild di *Nicotiana*.

Il recettore GR è il recettore a cui il cortisolo e altri glucocorticoidi si legano: essi appartengono alla classe degli ormoni steroidei presenti in molte cellule di animali vertebrati, funghi e piante.

Il nome glucocorticoidi (glucose + cortex + steroid) deriva dalle seguenti caratteristiche: regolazione della produzione del glucosio, estrazione dalla corteccia surrenale e struttura steroidea. Fin tanto che il recettore non è legato al suo ormone, esso si trova nel citosol della cellula.

Per quanto riguarda la relazione con il glucosio, essi ne regolano la quantità nel sangue, aumentandone la concentrazione o mantenendola costante mediante meccanismi di accumulo o d'inibizione dei meccanismi che lo producono, come l'idrolisi dei grassi.

La loro eccessiva presenza però può causare vari effetti negativi tra cui lo scorretto assorbimento del calcio o l'aumento del rischio d'infezioni.

Regolano inoltre i geni che controllano lo sviluppo, il metabolismo e la risposta immunitaria.

Una volta legati, il recettore e l'ormone formano un complesso che viene trasferito, attraversando la membrana plasmatica, nel nucleo della cellula, dove si lega ai cosiddetti GRE (elementi di risposta dei glucocorticoidi) nella regione del promotore dei geni, attivando il processo di trascrizione genica. Questo processo è detto trasattivazione, mentre quello inverso transrepressione. Un esempio di GRE è il DNA-elemento di risposta che attiva il gene di trascrizione dei geni (41).

In base al tipo di cellula si avrà una risposta differente: le proteine codificate nella trasattivazione hanno numerosi effetti come l'azione antiinfiammatoria, determina l'aumento della gluco-genesi e l'attività dell'enzima tirosina ammino-transferasi. La proteina ottenuta dalla trascrizione e traduzione di un frammento di DNA ricombinante (ossia ottenuto dalla combinazione di materiale genetico proveniente da specie diverse, come per un plasmide con il gene d'interesse inserito in un organismo ospite) è detta proteina ricombinante e il prodotto è un organismo geneticamente modificato.

L'*Agrobacterium rhizogenes* è un batterio Gram-negativo del suolo che produce nelle piante dicotiledoni la malattia definita come radici pelose: induce cioè la formazione di radici laterali da quelle secondarie, condizionando lo sviluppo della pianta (42).

Il plasmide contenuto nell'*Agrobacterium rhizogenes* è il Ri-plasmide (root inducing).

Nelle piante del genere *Nicotiana*, i geni dell'*Agrobacterium* più utilizzati sono rolA, rolB e rolC: il loro effetto è un aumento della capacità delle auxine di modificare la differenza di potenziale elettrico intermembrana delle cellule modificate. Il gene rolC inoltre aumenta la velocità di formazione di gibberelline e citochinine (43), oltre che di alcaloidi del tropano, dell'indolo e antrachinonici (44).

L'oncogene rolA si è verificato determini un aumento di produzione di nicotina e di antrachinoni nelle piante, il rolB invece nella produzione di resveratolo, un importante stilbene che rallenta la formazione e lo sviluppo di carcinomi (44).

Oltre alla modificazione genetica, le piante utilizzate sono state sottoposte ad alcuni stress abiotici (stress idrico, stress termico, stress chimico).

Le condizioni di stress possono causare cambiamenti nel sistema genetico, fisiologico o ormonale della pianta (45).

Per indurre le condizioni di stress idrico è stato utilizzato, mediante aggiunta nel terreno di coltura, del polietilen glicol 6000 (PEG6000), un polimero in grado di simulare la carenza di acqua nelle piante, il cui numero indica il peso molecolare medio del polimero sintetizzato.

Questo si comporta come un agente osmotico di non-penetrazione dell'acqua dal sistema radicale della pianta, causando un notevole aumento del potenziale osmotico del soluto Ψ_s (46).

Il potenziale osmotico, dovuto alla presenza di ioni che trattengono l'acqua diminuendone la concentrazione, è solo uno delle tre componenti del potenziale idrico Ψ_I .

Il potenziale idrico è comprensivo di potenziale osmotico Ψ_s , potenziale di pressione Ψ_p e potenziale di matrice Ψ_T (equazione [8]).

$$\Psi_I = \Psi_p - \Psi_s - \Psi_T$$

Equazione 8 Potenziale idrico espresso come funzione del potenziale osmotico, del potenziale di pressione e del potenziale di matrice (46).

Si ha un potenziale di pressione quando, con l'aumento di acqua in entrata nel sistema, il sistema stesso produce una pressione verso le pareti: questa avrà segno positivo. Infine il contributo di matrice, simile al potenziale osmotico, riguarda sostanze organiche più complesse, che trattengono l'acqua.

Ciò che permette il flusso d'acqua all'interno della pianta è la differenza di potenziale idrico tra due sistemi: è necessario che il potenziale idrico del suolo sia maggiore di quello della pianta affinché non accada che il terreno stesso privi la pianta dell'acqua che può assorbire mediante le radici.

Lo stress idrico comincia quando la richiesta della pianta supera la disponibilità del suolo.

In risposta a questo stress sono numerose le molecole che vengono prodotte in quantità maggiore: acido abscisico, prolina e clorofille ne sono un esempio.

Le piante possono rispondere anche attraverso la chiusura degli stomi, la cui apertura causerebbe la perdita di acqua per traspirazione (47).

Questo tipo di stress è stato applicato sia alle piante di tipo wild (non modificate) che a quelle geneticamente modificate, con l'obiettivo di simulare un problema oggi molto sentito, soprattutto in agricoltura.

La concentrazione di PEG6000 utilizzata nel laboratorio del Dipartimento di biologia di Firenze, che ha fornito tutte le piante utilizzate nelle analisi di questo lavoro di tesi, è 20%: dopo una serie di prove sperimentali, tale quantità risulta la più adeguata per simulare la carenza idrica necessaria per valutare gli effetti dello stress idrico (40).

Per stress termico s'intende un aumento della temperatura, anche di 15°C, oltre la temperatura dell'ambiente, mantenuta per un tempo tale da creare un danneggiamento permanente nella crescita e sviluppo della pianta. Lo shock termico per la pianta non riguarda solo la temperatura applicata, ma anche la durata dell'applicazione e la velocità con cui essa aumenta (48).

Per individuare la corretta temperatura dello stress termico, le piante di *Nicotiana* sono state esposte per due ore a temperature non consuete: i risultati hanno mostrato un significativo effetto con una temperatura di 50°C, temperatura utilizzata in seguito per indurre lo stress in tutte le piante (40).

Infine le piante sono state sottoposte all'azione di cromo esavalente, tossico, cancerogeno e potente ossidante per tutti i sistemi biologici (in altri studi si utilizzano anche altri metalli pesanti come Cadmio (Cd^{II}) (45) o Piombo (39). Nonostante esso abbia la tendenza a ridursi a cromo in stato di ossidazione III, meno tossico, il cromo e le specie derivate, hanno la capacità di penetrare la membrana plasmatica e causare l'inibizione della crescita delle piante, riduzione del tempo di vita, diminuzione nella sintesi di clorofilla e della fotosintesi (45).

3.2 Metodologie analitiche

3.2.1 MATERIALI, SOLVENTI E STRUMENTI UTILIZZATI

3.2.1.1 ATTREZZATURE E MATERIALI

- Bagno a ultrasuoni (Ultrasonic FALC)
- Bilancia analitica (Ohaus, Analytical plus)
- Impianto di depurazione dell'acqua Purelab: Option-R pure water system accoppiato a Purelab Ultra Analytic ultra pure water system (Elga Lab Water, High Wycombe, UK).
- Mulino a sfera (MM 400 Retsch, Verder Scientific, Haan, Germany))
- Agitatore Vortex zx³ (CDL, VELP, Scientific Inc., New York, USA)
- Centrifuga (centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, Germania)
- UHPLC (Ultimate 3000, RSLC nano system, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Germany)
- LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Germany).
- Software Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Germany)
- Matracci in vetro da 100mL
- Becker
- Portaprovette (Eppendorf AG, Hamburg, Germania)
- Micropipette da 100 e 1000 μL , con puntali sterili in polietilene (Eppendorf AG, Hamburg, Germania)
- Siringhe in polietilene
- Vial ambrate in vetro da 2 mL per autocampionatore (Agilent, Waldbronn, Germania)
- Tappi in polipropilene con rivestimento interno in PTFE, per vial in vetro per stoccaggio (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Filtri in PTFE 0,20 μm , diametro 25 mm, Phenex

3.2.1.2 SOLVENTI

- Acetonitrile Ultragradient, (Romil LTD, Cambridge, UK)
- Acqua ultrapura (18.2 M Ω cm)
- Detergente per vetreria ContradR 2000 concentrato (VWR International s.r.l.; Milano, Italia)
- Metanolo Ultragradient (Romil LTD, Cambridge, UK)

3.2.1.3 STANDARD DI RIFERIMENTO

Per la preparazione dei campioni è stato utilizzato acido salicilico marcato ¹³C Fluka-Sigma Aldrich come standard interno per verificare la confrontabilità e ripetibilità della procedura analitica, sia a livello pre-analitico che strumentale.

Sono stati aggiunti 10 μL di una soluzione di Acido Salicilico ¹³C a concentrazione 9.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.2.1.4 COLONNA CROMATOGRAFICA

La colonna cromatografica utilizzata è una Zorbax SB-Aq Narrow Bore RR 2.1 x 150 mm, 3.5 μm (Agilent Technologies, Wilmington, USA). La fase stazionaria permette una buona separazione sia dei composti polari sia di quelli a media-bassa polarità. La lunghezza della colonna permette di ottenere una buona separazione anche per un elevato numero di composti.

3.2.2 PROCEDURA DI TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

I campioni, suddivisi per tipo di modificazione e stress, sono stati macinati in giare di teflon, contenenti una sfera di teflon, all'interno delle quali sono stati aggiunti circa 1.5 g di campione ciascuna. Le giare sono state poste in un mulino meccanico per 5 minuti ad una frequenza di 20 Hz. La sfera di teflon contenuta nella giara ha permesso la macinazione del campione, poi trasferito in una provetta eppendorf e conservato in congelatore.

Una volta raccolti i campioni, liofilizzati e macinati, si procede con la fase pre-analitica.

Seguendo la logica del protocollo, visto in precedenza nel paragrafo 2.3.5, le scelte di solventi, eluenti e loro acidificazione, modalità di estrazione e tempi, sono volti ad ampliare lo spettro di molecole che si possono identificare.

In ciascuna provetta Eppendorf da 2 mL, si aggiungono 100 mg di ogni campione (con accuratezza 0.001 g), 100 µL di acido salicilico marcato ¹³C (SA*) a una concentrazione di 9.7 ng/µL e 1.5 mL di soluzione estraente preparata in precedenza. La soluzione è costituita dal 75% di MeOH in H₂O, 0.1% acido formico (AF) che risulta essere un'ottima soluzione estraente in quanto permette l'efficace estrazione di molecole con un vasto range di polarità (36).

In seguito si è utilizzato un miscelatore Vortex, per omogeneizzare la soluzione ottenuta, in modalità manuale alla velocità di 20 Hz per 5 secondi. L'aggiunta di solvente e l'immediata omogeneizzazione del campione permettono anche la riduzione dell'attività degli enzimi presenti in matrice (36).

Per l'estrazione dei metaboliti presenti, i campioni sono stati posti per 30 minuti in un bagno a ultrasuoni, riempito di H₂O fino a coprire completamente il campione e l'estraente, in modo da garantire un'estrazione efficace e completa.

Dopo centrifugazione a 14680 rpm (revolutions per minute) per 20 minuti, il surnatante viene trasferito in siringhe di polietilene precedentemente lavate con MeOH e attivate. Sono stati utilizzati filtri di politetrafluoroetilene (PTFE), idrofobo e chimicamente inerte, con dimensione dei pori 0.20 µm; questi sono stati attivati con un ciclo di 2 mL di MeOH ed 1 mL di H₂O.

Successivamente la siringa, con il filtro, è stata asciugata con un flusso di N₂.

Il filtrato è stato raccolto in vials ambrate da 2 mL per analisi HPLC.

Le tipologie di campioni analizzati sono le seguenti:

- NLWT: (wild type) piantine di *Nicotiana Langsdorffii* non soggette a modificazioni genetiche né stressate
- WT idrico: piantine non soggette a modificazioni genetiche ma sottoposte a stress idrico
- WT Cr: piantine non soggette a modificazioni genetiche ma sottoposte a stress chimico
- WT termico: piantine non soggette a modificazioni genetiche ma sottoposte a stress termico
- NLGR: *Nicotiana Langsdorffii* (NL) geneticamente modificate per il recettore dei glucocorticoidi di ratto ma non sottoposte ad alcuno stress
- GR idrico: NL geneticamente modificate per il recettore dei glucocorticoidi di ratto e sottoposte a stress idrico
- GR Cr: NL geneticamente modificate per il recettore dei glucocorticoidi di ratto e sottoposte a stress chimico
- GR termico: NL geneticamente modificate per il recettore dei glucocorticoidi di ratto e sottoposte a stress termico
- ROLC: *Nicotiana Langsdorffii* geneticamente modificate per il gene rol C proveniente da *Agrobacterium rhizogenes* ma non sottoposte a stress
- ROLC idrico: ROLC sottoposte a stress idrico
- ROLC Cr: ROLC sottoposte a stress chimico
- ROLC termico: ROLC soggette a stress termico

- tre mix: campioni costituiti da un pool di tutti gli altri campioni, in cui sono perciò presenti tutte le tipologie di piante
- tre bianchi: campioni in cui è assente la matrice biologica.

La procedura è stata eseguita su tutti i campioni e per ciascuno sono state eseguite tre repliche.

I campioni sono stati conservati in frigorifero a 4°C fino al momento dell'analisi.

La massima semplificazione della procedura di trattamento del campione, riduce la possibilità di introdurre contaminazione nei campioni, permettendo di estrarre il maggior numero di analiti possibile in tempi brevi, di facilitare la riproducibilità analitica del metodo preparativo e perciò di poter preparare un numero elevato di campioni.

3.2.3 CONTROLLO QUALITÀ

Poiché non è possibile utilizzare un numero elevato di composti standard corrispondente al numero di analiti individuati nelle analisi sperimentali, non vi è un metodo pre-analitico e strumentale classicamente validato. La validazione non è tuttavia indispensabile in quanto non è stata effettuata la quantificazione dei composti ma esclusivamente l'analisi qualitativa; valutazioni di tipo quantitativo si sono basate sul confronto tra le intensità relative dei metaboliti nei campioni, analizzati tutti in sequenza in due giorni di lavoro preparativo e analisi strumentale.

Per garantire la validità del dato, perciò, ogni campione è stato preparato in tre repliche: in questo modo è stato possibile confrontare i campioni e verificarne la ripetibilità dell'intensità di segnale. Ogni campione inoltre era già costituito da una miscela omogenea di circa 10 piantine della stessa tipologia, così da minimizzare la variabilità biologica che è sempre presente, anche nei campioni coltivati in vitro.

Per verificare la ripetibilità dell'analisi strumentale all'inizio, a metà e alla fine della sequenza di analisi dei campioni, sono stati inseriti tre campioni mix, campioni di controllo, contenenti una matrice ottenuta dal mescolamento di tutti i tipi di piantine in possesso.

Queste analisi sono state effettuate per tre motivi:

- Realizzare i "data dependent" necessari al riconoscimento degli analiti mediante frammentazione
- Verificare la ripetibilità in fase di analisi dei campioni, in quanto i campioni mix contengono tutti i campioni e dovrebbero mantenere l'intensità di segnale degli analiti e l'andamento cromatografico generale dei singoli campioni
- Nella fase di elaborazione dei dati i campioni mix fungono da campione di riferimento. Inoltre in questa fase, hanno permesso di verificare l'esistenza di eventuali effetti "batch" o di cambiamenti significativi nel corso dell'analisi strumentale

I bianchi, costituiti da soluzione estraente e standard SA*, hanno seguito la medesima procedura pre-analitica e strumentale dei campioni. Questi sono stati analizzati per verificare la presenza di eventuali interferenti o analiti trattenuti in colonna, che potrebbero essere considerati dato significativo nei campioni in fase di elaborazione dei dati e identificazione dei metaboliti.

L'aggiunta dello standard interno all'inizio della procedura pre-analitica, l'acido salicilico marcato (¹³C) in tutti gli atomi di carbonio dell'anello aromatico, sia nei bianchi che nei campioni, è stata necessaria per verificare la ripetibilità e la costanza dell'intensità di segnale durante tutte le fasi e durata delle analisi.

In questo modo è possibile rendere confrontabile una procedura pre-analitica in assenza di un metodo precedentemente validato, di ridurre le variazioni di concentrazione e dei tempi di ritenzione degli analiti e inoltre verificare l'eventuale effetto dovuto alla presenza di una matrice piuttosto complessa nel campione.

3.2.4 PROCEDURA ANALITICA

Il metodo analitico prevede una fase di separazione cromatografica mediante cromatografo liquido ad elevate prestazioni (UHPLC Dionex) accoppiata ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione Orbitrap.

3.2.4.1 CROMATOGRAFIA

La cromatografia è una tecnica analitica che permette la separazione, l'identificazione (qualitativa) e la determinazione quantitativa di due o più analiti, presenti in una matrice in soluzione, se si tratta di cromatografia liquida. La loro separazione avviene sulla base della ripartizione degli analiti, contenuti nel campione, tra la fase stazionaria e una fase mobile che eluisce lungo una colonna cromatografica con una certa velocità di flusso, portando con sé analiti via via sempre più affini alla fase stazionaria.

Gli analiti che possono essere separati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) sono polari, termolabili o difficilmente volatizzabili, difficilmente separabili con la gas cromatografia o altre tecniche analitiche.

La fase stazionaria presente in colonna è costituita da particelle solide, di granulometria compresa tra 1.8 e 10 µm, impaccate nella colonna, generalmente in acciaio o in peek. Questi materiali permettono di lavorare a pressioni molto alte.

La fase stazionaria deve essere insolubile nella fase mobile utilizzata.

In campioni che presentano matrici complesse o pesanti, per evitare che la colonna si blocchi a causa di materiale solido nel campione, si può utilizzare una pre-colonna, posta tra l'iniettore e la colonna stessa, con lunghezza di qualche mm e avente la stessa fase stazionaria della colonna.

La fase mobile può essere costituita da un liquido puro o da una miscela di solventi a composizione nota, che viene fatta eluire attraverso la fase stazionaria della colonna cromatografica. L'eluizione può essere isocratica ossia i solventi fluiscono sempre con la stessa composizione durante tutta la corsa cromatografica oppure a gradiente di polarità, variando cioè le quantità relative dei solventi nel corso dell'analisi.

I composti della miscela da separare hanno diversa polarità, diverse caratteristiche chimiche e perciò diversa affinità con le fasi della colonna: un'analita eluisce velocemente trascinato dalla fase mobile quando, avendo poca affinità con la fase stazionaria, non viene trattenuto a lungo da essa; un analita con maggiore affinità sarà maggiormente trattenuto ed uscirà in tempi maggiori. La separazione avviene sulla base dei diversi rapporti di distribuzione dell'analita tra le fasi. Il coefficiente di distribuzione è definito nell'equazione [9].

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Equazione 9 Coefficiente di distribuzione dell'analita tra la fase stazionaria e la fase mobile (49).

con C_s e C_m rispettivamente la concentrazione dell'analita nella fase stazionaria e nella fase mobile. Un valore elevato del coefficiente di ripartizione indica che l'analita ha notevole affinità con la fase stazionaria.

Un rivelatore collegato ad un computer, misura la concentrazione del soluto nella fase mobile e, dopo l'elaborazione dei dati, riporta il segnale in funzione del tempo: si ottiene così un cromatogramma (figura 37), un grafico costituito da una serie di picchi, rappresentanti l'eluizione dei singoli analiti.

Il cromatogramma è un tracciato del segnale del rivelatore in funzione del tempo o del volume di eluente, dall'istante in cui la miscela è introdotta nella colonna fino al momento in cui raggiunge il rivelatore (49).

Gli analiti, uscendo dalla colonna in tempi differenti (diversi tempi di ritenzione), possono così essere distinti sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, in quanto l'area sottesa da un picco cromatografico è proporzionale alla quantità di soluto eluito.

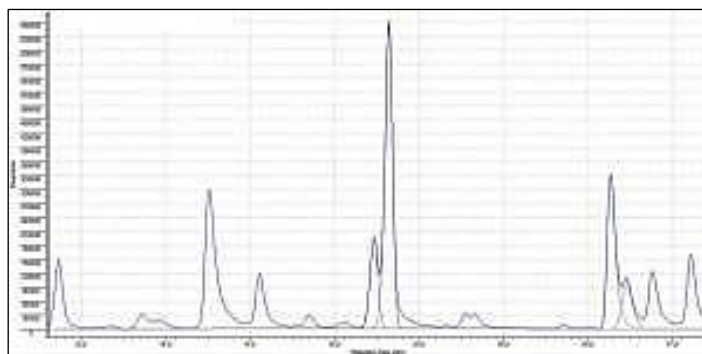


Figura 37 Tipico cromatogramma.

In questo lavoro di tesi lo strumento impiegato è un UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 della ditta Dionex (figura 38).

Lo strumento è dotato di due pompe: la fase mobile può essere pompata sia dalla pompa analitica sia da una nano pompa (RSLC nano system): ciò permette di operare una separazione cromatografica anche a flussi molto bassi (alcuni nL/min, con le opportune regolazioni strumentali) e di collegare a questo strumento un analizzatore di massa.



Figura 38 HPLC e spettrometro di massa utilizzati.

Le componenti fondamentali sono evidenziate in figura 38:

1. Il degaser, sistema di eliminazione delle eventuali bolle presenti nel solvente, che potrebbero compromettere l'efficienza cromatografica ed eventualmente il funzionamento dei rivelatori. Sopra il degaser è posto il vano porta bottiglie dei solventi;
2. Alloggiamento della pompa analitica e della nano pompa;
3. Vano termostato in cui è posta la colonna analitica;
4. Autocampionatore, che permette massima automazione nella fase di prelievo del campione.

Parte fondamentale dello sviluppo di una metodica analitica strumentale è sicuramente la scelta della colonna: numerose sono le tipologie di colonne nel mercato, diverse per il tipo di fase stazionaria, per la lunghezza e diametro, per le diverse dimensioni dei pori della fase stazionaria.

Come suggerito dal protocollo per le analisi metabolomiche (36), viste le caratteristiche di polarità delle molecole solitamente presenti, la colonna utilizzata è una C18-reverse phase ossia costituita da una fase stazionaria apolare e fase mobile polare, adatta alla separazione ottimale di sostanze semi/poco-polari.

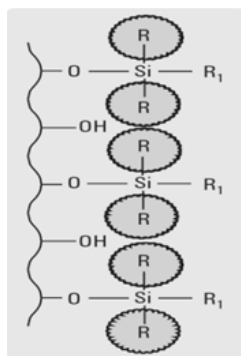


Figura 39 Rappresentazione della fase stazionaria della colonna cromatografica Zorbax SB-Aq.

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una colonna Zorbax SB-Aq (Stable Bond), colonna resistente a pH molto bassi per la stabilità chimica di legame, a temperature elevate (T massima 80°C) e caratterizzata da un'elevata riproducibilità in diverse fasi mobili acide. La fase stazionaria è costituita da silani a elevata purezza con catene laterali diisopropiliche che proteggono stericamente il legame silossanico sulla superficie della silice da attacchi idrolitici (figura 39).

I gruppi alchilici R sono coperti da brevetto.

Gli eluenti della fase mobile utilizzati sono acqua (solvente A) e acetonitrile (solvente B): il primo permette di separare nei primi minuti della corsa cromatografica le componenti più polari del campione, mentre l'acetonitrile è adatto alla separazione di molti composti semi-polari e gli isomeri.

Seguono i parametri utilizzati:

- Fasi mobili
 - A= H₂O 0.01% AF
 - B= ACN 0.01% AF
- Corsa cromatografica (gradiente di volume degli eluenti) in figura 40.

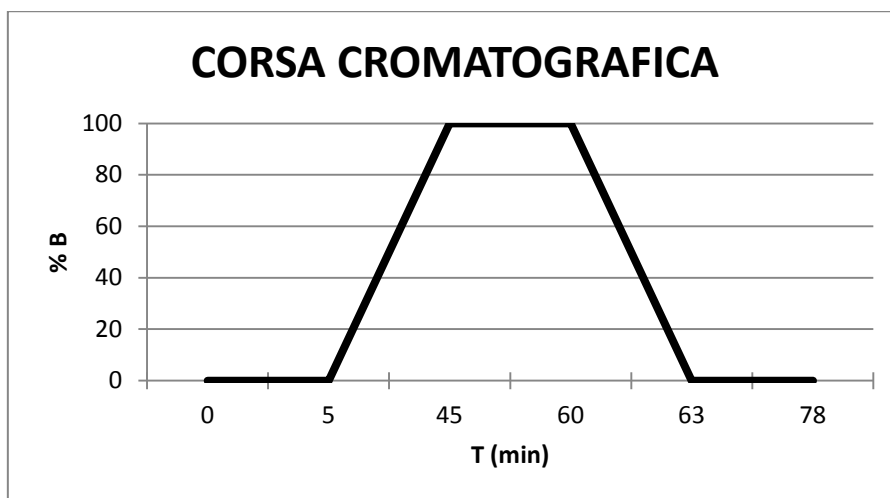


Figura 40 Corsa cromatografica.

- Velocità di flusso
 - 200 µL/min
- Volume d'iniezione
 - 5 µL
- Temperatura della colonna
 - 30°C

La corsa cromatografica è relativamente lunga: prevede una fase iniziale di isocratica in solvente polare (H₂O) in cui vengono separati i composti più polari presenti nei campioni, poiché non sono trattenuti dalla fase stazionaria non polare, seguita da una lenta variazione della percentuale di volume di solvente B (ACN) fino al 45° minuto, in cui si ha l'eluizione solo di acetonitrile.

Arrivati a questo punto del gradiente di volume %, la totalità dei composti è stata eluita e separata.

Ridurre il tempo della corsa cromatografica comporterebbe il rischio di perdere parte dell'informazione utile (alcuni analiti potrebbero co-eluire), ridurre la risoluzione di isomeri, aumentare la soppressione del segnale e favorire la formazione di addotti nella sorgente di ionizzazione (36).

Nel protocollo si ritengono sufficienti 60 minuti (36).

Per verificare la pulizia della colonna e controllare la riproducibilità dell'analisi, in termini di composizione e/o concentrazione degli analiti, all'inizio, al centro e alla fine della sequenza di analisi sono stati introdotti lavaggi con acqua, con la medesima corsa cromatografica. Inoltre all'inizio della sequenza sono state effettuate almeno 3 analisi a vuoto, iniettando 5 µL di un campione di mix, in modo da permettere alla matrice di entrare in equilibrio con la fase stazionaria.

Nella Cromatografia liquida i rivelatori più utilizzati sono:

-Rivelatori che rispondono alle proprietà fisiche globali della fase mobile come l'indice di rifrazione, la costante dielettrica, la densità ecc.

-Rivelatori delle proprietà del soluto come assorbanza, fluorescenza, intensità di corrente ecc.

I rivelatori più utilizzati sono detector UV-visibile o IR, ma sempre maggiore diffusione acquistano gli spettrometri di massa (49).

3.2.4.2 SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica che permette la separazione, sulla base del diverso rapporto massa/carica (m/z), di ioni, presenti in miscele complesse, generati mediante ionizzazione degli analiti in esame.

Dapprima il composto viene ionizzato, gli ioni prodotti vengono separati nell'analizzatore secondo il loro rapporto m/z e raggiungono il rivelatore, dove, attraverso l'emissione secondaria di elettroni, si genera il segnale elettrico opportunamente ampliato per produrre lo spettro di massa.

La tecnica permette inoltre di dare una misura dell'abbondanza relativa dei singoli ioni.

Lo schema a blocchi in figura 41 rappresenta i costituenti fondamentali dello strumento.

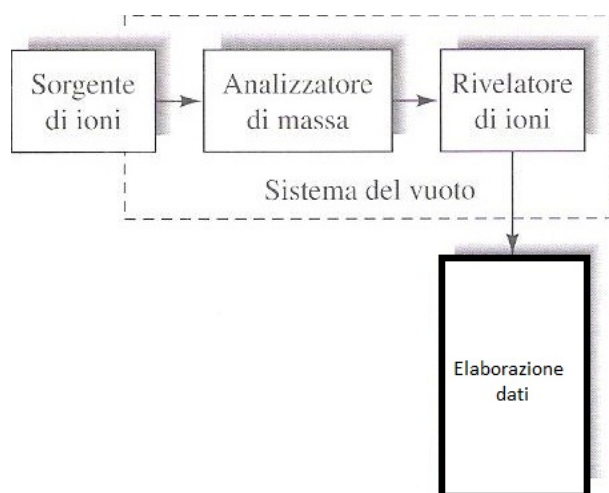


Figura 41 Schema a blocchi spettrometro di massa.

Come riportato in figura 41, la parte successiva alla sorgente ionica, in cui gli ioni sono sottoposti ad analisi spettrometrica, è realizzata in condizioni di vuoto spinto, circa tra 10^{-5} e 10^{-8} Torr.

a) SORGENTE DI IONIZZAZIONE

Un'importante differenza tra i vari spettrometri di massa in commercio è la sorgente di ionizzazione.

Le tipologie di ionizzazione sono molte e dipendono fondamentalmente dallo stato fisico del campione da analizzare: esse sono state ideate e progettate per ovviare alla differenza di pressione esistente tra il cromatografo liquido e lo spettrometro di massa in quanto il primo fornisce, in uscita dalla colonna, un campione liquido mentre lo spettrometro lavora su un gas a pressioni molto basse. L'accoppiamento HPLC/MS prevede perciò la ionizzazione degli analiti a cui segue la rimozione completa dell'eluente e infine l'inserimento di un'interfaccia in grado di trasmettere gli ioni all'analizzatore senza perturbare il vuoto creato.

I sistemi di ionizzazione più diffusi nell'accoppiamento HPLC/MS sono le sorgenti ESI (Electrospray Ionization) e APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

Queste sorgenti di ionizzazione sono classificate come sorgenti "soft": provocano una scarsa frammentazione del campione per cui lo spettro di massa è formato dai picchi cromatografici degli ioni molecolari protonati $[M + H]^+$, deprotonati $[M - H]^-$ o tuttal' più di qualche semplice addotto.

L'ESI è una tecnica di ionizzazione per elettro-nebulizzazione, adatta a molecole ad alto peso molecolare, composti ionici quali acidi o basi organiche, ma anche proteine o composti organometallici. È preferibile, invece, evitare la presenza di sali in sorgente, per non abbatte le prestazioni.

La ionizzazione elettrospray avviene a temperatura e pressione atmosferica.

Si descrivono in breve i passaggi fondamentali della ionizzazione ESI.

La soluzione contenente gli analiti, proveniente dalla separazione cromatografica in colonna, viene introdotta nella sorgente attraverso un capillare metallico, a cui è applicato un elevato potenziale elettrico (negativo o positivo in base all'analita) e nebulizzata all'interno della camera di ionizzazione.

In tal modo si forma uno spray di gocce cariche, di diametro di qualche micron (1-60 μm), che vengono indirizzate verso l'apertura posta sul controelettrodo costituita da un capillare e da uno skimmer (struttura a cono aperto).

La desolvatazione, favorita dalla temperatura della sorgente e dal flusso di gas ausiliario, permette la progressiva diminuzione del volume della goccia e il conseguente aumento di densità di carica superficiale. Questo processo prosegue fino al raggiungimento del "limite di Rayleigh", in cui la tensione superficiale della goccia non è più in grado di sopportare la repulsione coulombiana generata tra le cariche. Essa causa un'esplosione "coulombiana": le gocce si disgregano in goccioline di dimensioni inferiori, come schematizzato in Figura 42.

Questo meccanismo si ripete a cascata fino a quando tutto il solvente è evaporato, portando alla formazione di ioni desolvati di analita in fase gas, i quali possono avere carica unitaria o multipla, determinato dalla struttura degli analiti ma anche dai solventi utilizzati. Solitamente molecole ad alto peso molecolare portano alla formazione di ioni multicarica e miscele di H_2O e solventi organici migliorano l'eluizione delle molecole polari analizzate (metanolo, acetonitrile, isopropil alcol/ acqua).

Un altro importante accorgimento è l'ottimizzazione del pH dei solventi utilizzati, in quanto il contatto con analiti in soluzione potrebbe per esempio portare alla formazione di addotti.

La modalità di ionizzazione può essere sia negativa che positiva: molecole acide, in soluzione, formano ioni negativi in soluzione mentre molecole basiche formano ioni positivi. La formazione degli ioni dalle gocce è facilitata se la carica ionica e la carica sulla superficie delle gocce è la stessa: si usa la polarità positiva per analizzare ioni positivi e negativa per ioni carichi negativamente (50).

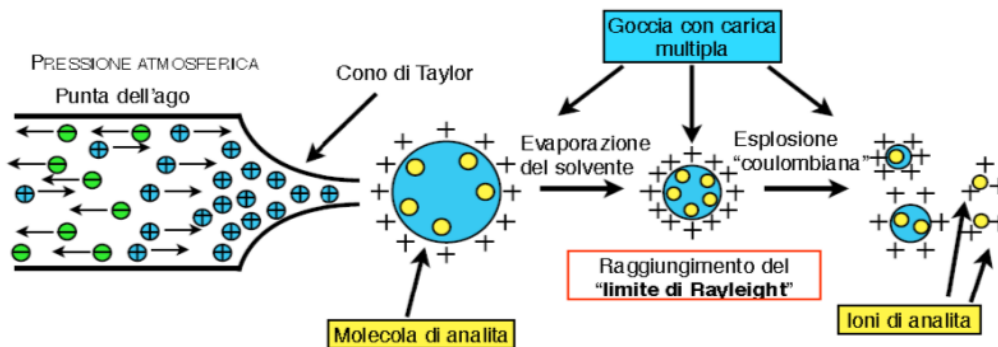


Figura 42 Schema ionizzazione sorgente ESI.

La sorgente ESI utilizzata per il presente lavoro è la Ion Max, prodotta dalla Thermo Scientific, costituita da una parte completamente rimovibile, a sinistra in figura 43, la cui vera parte di collegamento con l'analizzatore di massa è fissata alla struttura dello spettrometro e permette unicamente la rimozione, per pulizia, del cono del gas "sweep", evidenziato in figura 43 (51).



Figura 43 Visione della camera di ionizzazione del campione e dello sweep cone.

La ionizzazione è supportata dalla presenza di una serie di gas: oltre all'ingresso del campione, vi sono, infatti, appositi ingressi, nel probe, per lo "sheat gas" e l'"auxiliary gas", entrambi convogliati nella camera di ionizzazione in modo coassiale all'ingresso del campione (figura 44).

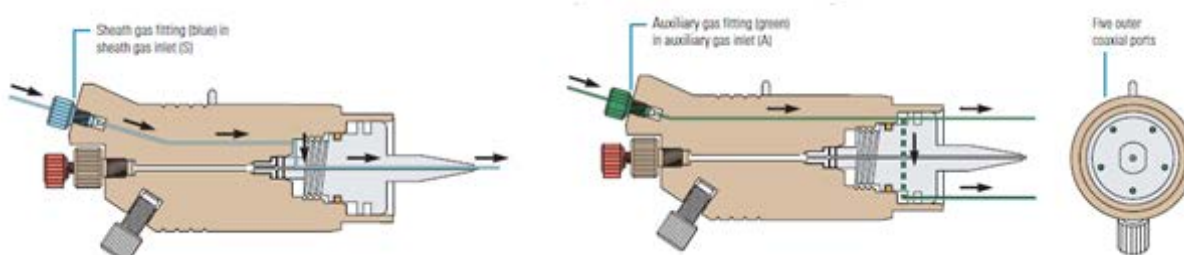


Figura 44 Schema ingresso flusso gas.

Lo “sheat gas” è costituito da azoto molecolare fatto fluire in modo coassiale alla direzione d’iniezione del campione, internamente ad esso, che favorisce la nebulizzazione della soluzione in una nebbia fine. Valori tipici, con flussi di eluizione sotto ai 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, sono tra le 10 e le 30 unità, mentre tra 30 e 60 unità con flussi maggiori ai 400 $\mu\text{L}/\text{min}$.

In figura 44 si mostra una sezione delle linee di flusso dei gas.

Il gas ausiliario invece, è un flusso di azoto coassiale ma esterno alla linea di iniezione del campione: questo gas è di supporto allo “sheat gas” nella nebulizzazione ed evaporazione del campione: valori tipici di flusso del gas ausiliario sono tra le 10 e 20 unità, ma nel caso in cui il flusso del campione sia inferiore a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, il gas non viene utilizzato (50).

In LC/MS il gas ausiliario è molto utilizzato perché contribuisce all’aumento del rapporto segnale/rumore di fondo, soprattutto con flussi elevati.

L’inclinazione del probe rispetto alla linea del campione è solitamente 60°, ma si possono fare piccole modifiche per migliorare la stabilità dello spray.

Un ultimo flusso di gas che può essere utilizzato è il cosiddetto “sweep gas”, gas introdotto dal retro dello sweep cone, mostrato nella parte destra della figura 44, che procede in senso opposto al flusso di ionizzazione del campione. L’azoto, eventualmente introdotto in questo modo, determina una maggiore declusterizzazione del solvente dagli analiti e riduce la formazione di addotti in sorgente: il sweep gas risulta necessario in campioni complessi o con matrici pesanti come per esempio il plasma o campioni ricchi di sali (52).

La sorgente APCI è invece adatta per la ionizzazione di composti a bassa o media polarità, di piccole dimensioni, polari e non, ma termicamente stabili.

I parametri strumentali applicati alla sorgente ESI per il presente lavoro sono riportati in tabella 2.

Tabella 2 Parametri strumentali sorgente ESI.

Temperatura del capillare (°C)	275		negativo	positivo
Temperatura di vaporizzazione (°C)	300	Voltaggio alla sorgente (kV)	3.5	4.5
Flusso “sheat gas” ($\mu\text{L}/\text{min}$)	35	Corrente alla sorgente (μA)	100	100
Flusso gas ausiliario ($\mu\text{L}/\text{min}$)	5	Voltaggio al capillare (V)	-40	24
Flusso “sweep gas” ($\mu\text{L}/\text{min}$)	0	Tube lens (V)	-100	100

b) ANALIZZATORE DI MASSA

Il secondo step della spettrometria di massa è rappresentato dal passaggio nell’analizzatore di massa.

La funzione dell’analizzatore di massa è differenziare e separare gli ioni prodotti nella sorgente di ionizzazione, in accordo al loro diverso rapporto massa/carica, utilizzando un campo magnetico e/o campo elettrico.

A seconda della modalità con la quale esplicano tale funzione si distinguono in analizzatori:

- a settore magnetico, dove si impiega un magnete o un elettromagnete per deviare il fascio di ioni proveniente dalla sorgente lungo una traiettoria con raggio di curvatura diversa
- a trappola ionica (ITMS), che trattiene tutti gli ioni liberandoli poi selettivamente al variare dell’intensità del campo elettrico oscillante (ne esistono due tipi: QIT (Quadrupole Ion Trap, tridimensionale) e LTQ (Linear Trap Quadrupole, bidimensionale o lineare)

- a quadrupolo
- a tempo di volo, in cui si applica un potenziale di accelerazione che separa gli ioni in base al tempo impiegato dagli stessi per raggiungere il rivelatore
- a trappola orbitale (Orbitrap) (49).

L'analizzatore di massa utilizzato in questo lavoro è il sistema LTQ-Orbitrap XL della Thermo Scientific, che accoppia un sistema di rivelazione a trappola ionica lineare con la tecnologia di rivelazione Orbitrap. L'analizzatore a trappola ionica tridimensionale (ITMS) è costituito da tre elettrodi, due terminali detti End Caps ed uno centrale costituito da due anelli.

Una nuova versione della trappola ionica è la trappola ionica lineare, denominata anche trappola ionica quadrupolare bidimensionale (2D-QIT), costituita essenzialmente dalla struttura base di un quadrupolo di trasmissione.

Questi dispositivi hanno la funzione di intrappolare gli ioni e dividerli in base al rapporto m/z : sono particolarmente interessanti in quanto è possibile selezionare lo ione d'interesse e, mediante la collisione con l'elio contenuto al loro interno, frammentarlo, ottenendo una serie di ioni frammento caratteristici. Questa tecnica è nota come CID (collision-induced dissociation), e può essere ripetuta più volte nel tempo, eseguendo così esperimenti di MS e MSⁿ.

La trappola lineare ionica LTQ, utilizzata nel presente lavoro di tesi, è costituita da un elettrodo toroidale centrale (anello) e due elettrodi a calotta laterali (end caps).

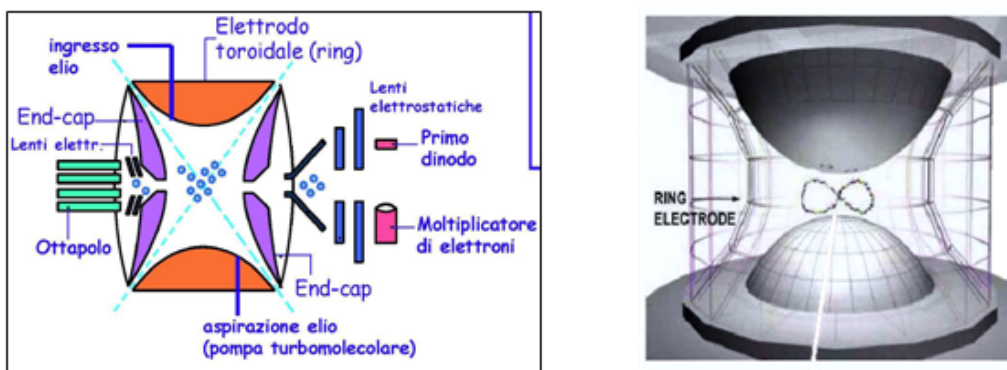


Figura 45 Raffigurazione trappola ionica lineare e movimento ionico.

All'interno della trappola vi è dell'elio che serve a rallentare gli ioni con velocità maggiore e ad accelerare quelli lenti mediante collisione, creando un pacchetto omogeneo di ioni con pari energie cinetiche.

Applicando un potenziale a radio frequenza all'elettrodo toroidale gli ioni rimangono intrappolati tra i tre elettrodi senza toccarne alcuno (potenziale d'intrappolamento). Il moto prodotto segue l'andamento in figura 45. Per far uscire gli ioni è necessario applicare un potenziale di risonanza sulle end caps.

L'analizzatore di massa Orbitrap rappresenta un'ottima alternativa all'analizzatore di massa FTICR (Fourier transform ion cyclotron resonance), dotato di un'elevata risoluzione, accuratezza e sensibilità, particolarmente usato in analisi di composti complessi, accoppiato ad una sorgente ESI (53).

L'Orbitrap, come dice il nome, è una trappola orbitale, sviluppata in un campo puramente elettrico, che si è sviluppata a partire da un dispositivo di accumulo di ioni, detta trappola di Kingdon, dall'idea di Alexander Makarov.

Nella trappola di Kingdon vi è un elettrodo (catodo) centrale sottile, come un filo, che corre coassialmente attraverso un elettrodo cilindrico esterno, il cui volume è delimitato da due "endcaps", mascherine laterali, rappresentata in figura 46.

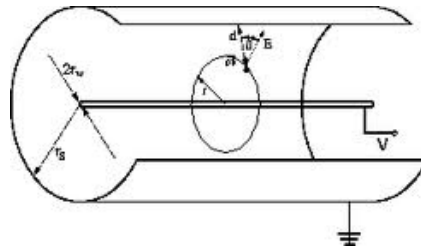


Figura 46 Trappola di Kingdon.

Una tensione di corrente continua (DC) è applicata tra l'elettrodo centrale e quello cilindrico producendo un potenziale radiale logaritmico tra i due elettrodi [10] dato da:

$$\Phi = A \ln r + B$$

Equazione 10 Potenziale radiale logaritmico della trappola di Kingdon (54).

con A e B costanti e r è il raggio.

Quando uno ione viene creato all'interno della trappola o viene introdotto in essa, perpendicolarmente, con una certa velocità iniziale, lo ione adotta un'orbita stabile circolare a causa della differenza di potenziale tra gli elettrodi, maggiore di quella espressa dalla formula [11]:

$$qV = \frac{1}{2}mv^2 \left(\frac{R}{r}\right)$$

Equazione 11 Differenza di potenziale tra gli elettrodi della trappola di Kingdon (54).

dove R ed r sono rispettivamente il raggio dell'elettrodo esterno e di quello centrale.

Il movimento è completato dall'applicazione di un potenziale, di segno opposto, agli elettrodi di testa, creando così un movimento stabile orbitale (rotatorio) in direzione assiale.

Tale trappola poteva essere accoppiata a svariati detector di massa, come elettromoltiplicatori, tubi fotomoltiplicatori ecc (54).

Dopo molte variazioni, nei primi anni '90, Makarov sviluppò, dalla trappola di Kingdon, l'Orbitrap, dalle forme più snelle lateralmente e tozze nella parte centrale per entrambi gli elettrodi (vedi figura 47).

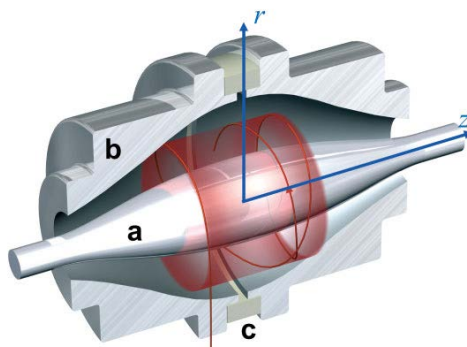


Figura 47 Orbitrap (55).

Nella sezione in figura 47, in a è rappresentato l'elettrodo centrale attorno al quale si muovono gli ioni su un'orbita spirale, b è l'elettrodo esterno che in c, si evidenzia essere tagliato a metà da un anello isolante di ceramica (55).

L'Orbitrap è molto piccolo: il diametro maggiore per l'elettrodo centrale è di 8 mm, mentre per quello esterno 20 mm (56).

Anche in questo modello, tra l'elettrodo esterno e quello interno si applica una tensione di corrente continua, detto potenziale elettrostatico quadro-logaritmico dato dall'espressione [12]:

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left(\frac{r}{R_m} \right) + C$$

Equazione 12 Potenziale elettrostatico quadro-logaritmico Orbitrap (56).

dove: r e z sono le coordinate cilindriche, k la curvatura del campo e R_m il raggio caratteristico.

Tale potenziale determina un movimento orbitalico attorno all'elettrodo centrale e contemporaneamente un'oscillazione lungo l'asse z (56).

Il movimento degli ioni lungo l'asse z può essere descritto da un'oscillazione armonica, completamente indipendente dal movimento radiale, la cui frequenza di oscillazione è pari a:

$$\omega = \sqrt{\frac{z}{m}} k$$

Equazione 13 Frequenza di oscillazione ioni (56).

Il movimento rotazionale invece, che include anche una componente angolare, dipende dalla posizione iniziale degli ioni e dall'energia cinetica posseduta lungo quella direzione. Considerando l'Orbitrap come un analizzatore elettrostatico a 360°, il raggio della traiettoria, corrispondente a quello dell'analizzatore, è dato dall'equazione [14]:

$$r = \frac{2qV}{qE}$$

Equazione 14 Raggio di curvatura Orbitrap (56).

in cui qV rappresenta l'energia cinetica prima dell'iniezione e qE la forza generata dal campo elettrico applicato agli ioni nel loro percorso (56).

Nella successiva figura, sono rappresentati i passaggi che portano alla produzione di uno spettro di massa (Intensità vs m/z).

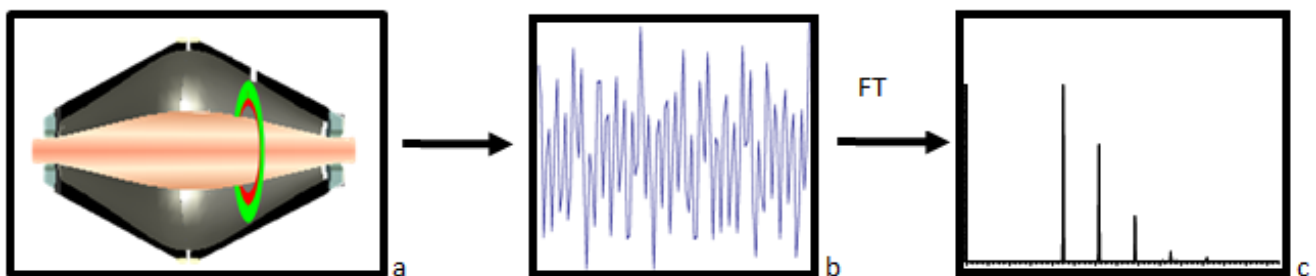


Figura 48 Produzione spettro di massa attraverso una trasformata di Fourier (57).

Il movimento dei pacchetti di ioni a m/z differenti (parte a della figura 48) produce una corrente elettrica, detta corrente immagine (parte b), rilevata dall'elettrodo esterno come segnale transiente sul dominio di tempo.

La rilevazione di questo segnale è seguita da una trasformata di Fourier che converte il segnale registrato nel dominio del tempo, in uno spettro in dominio di frequenza. Attraverso l'equazione 13, questo spettro viene convertito in uno spettro m/z (58), illustrato nella parte c della figura 48.

L'analizzatore così ottenuto ha come punti di forza l'alta risoluzione e accuratezza di massa. La capacità di uno spettrometro di differenziare le masse è dato dalla Risoluzione:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Equazione 15 Risoluzione (49).

con m = massa nominale del primo picco
 Δm = differenza di massa tra due picchi adiacenti

Come evidenziato dalla formula, la relazione tra massa e risoluzione è inversamente proporzionale, perciò la risoluzione diminuisce all'aumentare del rapporto m/z dello ione misurato (55).

Lo strumento utilizzato può lavorare a diversi valori di risoluzione (7500, 15000, 60000) fino ad un massimo di 100.000 ad un valore di m/z di 400.

L'accuratezza di massa è invece un parametro che dipende direttamente dalla capacità di uno strumento di separare i picchi adiacenti e quindi dalla risoluzione.

La stima dell'accuratezza di massa è espressa mediante il valore dell'errore sulla massa misurata, espressa in parti per milione (ppm), determinato dalla funzione [16]:

$$e_m = \frac{m_a - m_t}{m_t} * 10^6$$

Equazione 16 Errore sulla massa misurata (59).

Dove m_a = massa accurata sperimentale
 m_t = massa esatta teorica (59).

Per mantenere elevata l'accuratezza di massa, o per lo meno conoscerne il valore, si esegue una calibrazione di massa.

La calibrazione di massa esterna, per lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi, eseguita al massimo ogni sette giorni, avviene mediante l'infusione diretta di una miscela di composti noti (caffeina, tetrapeptide MRFA e Ultramark 1621), in un range di massa da 50 a 2000 m/z e consente di ottenere un'accuratezza di massa di 5 ppm.

Per la calibrazione della ionizzazione positiva si è utilizzato la massa calibrante 524, mentre per quella in negativo, la massa 514.

Per una migliore accuratezza, fino a 2 ppm, si può utilizzare una calibrazione interna: si impiega uno ione di riferimento a massa nota, presente come impurezza, detto Lock mass e si valuta su questo rapporto m/z esattamente noto, l'errore sulla massa.

Le masse utilizzate si riferiscono a ioni generati da miscele di solventi, eventuali interferenti, contaminanti o ioni introdotti volutamente, di cui si conosce con precisione analitica la massa esatta, che si accumulano insieme agli ioni di nostro interesse.

Per picchi cromatografici con rapporto segnale/rumore maggiore a 10000, l'accuratezza di massa raggiunge anche i 0.2 ppm (54).

Per la calibrazione interna le masse utilizzate sono le seguenti:

positivo: 225.147000

negativo: 112.985630; 226.978453; 265.147900; 281.248600; 283.264200.

Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è rappresentato in figura 38.

Questo strumento è uno spettrometro di massa molto complesso e per questo molto flessibile: infatti può utilizzare tre diverse sorgenti di ionizzazione: ESI, APCI e la sorgente nano-ESI, che ben si adatta alla pompa nano presente nel cromatografo liquido ad esso accoppiato.

Il punto 2 in figura 38 indica il punto di aggancio per le sorgenti di ionizzazione che facilmente possono essere sostituite.

Questo strumento inoltre può lavorare anche in modo indipendente dalla parte cromatografica, per infusione diretta del campione, mediante l'uso di una pompa siringa, indicata con il numero 1 in figura 38.

Lo spettrometro di massa è stato utilizzato in due modalità: sono state fatte analisi in full scan di tutti i campioni e successivamente, con risoluzione più bassa, sono state effettuate delle analisi in modalità "data dependent" su campioni realizzati ad-hoc, mix di tutti i campioni a disposizione, anch'essi in 3 repliche.

In modalità di acquisizione full scan, si effettua una scansione continua nel range di massa scelto, individuando e separando tutti gli ioni prodotti, in base al loro rapporto m/z .

Il range di massa nel quale è stata effettuata l'analisi, con risoluzione pari a 60000, è tra 90 e 1500 m/z , range che comprende le piccole masse che si ritiene possano essere separate in questo tipo di campioni.

I "data dependent" sono invece delle frammentazioni delle molecole separate sulla base del loro rapporto m/z : questi permettono la verifica della corretta identificazione dell'analita, in base al gruppo funzionale staccatosi, della presenza di un frammento significativo o di distinguere isomeri.

La frammentazione avviene a partire da uno ione genitore e si può ripetere anche una seconda volta cioè frammenta uno degli ioni figli ottenuti dalla prima frammentazione.

Tale acquisizione può essere condotta sia nella trappola ionica, a bassa risoluzione, che nella trappola orbitalica, ad alta risoluzione.

Programmi come Chem Draw, possono essere un buon supporto per prevedere, a partire dalla formula di struttura della molecola ipotizzata, rotture di legame o riarrangiamenti della stessa, a seguito della ionizzazione del campione.

L'Orbitrap, però, è solo la parte terminale di tutto il complesso percorso che gli ioni compiono da quando vengono creati nella sorgente di ionizzazione. Nel complesso l'ottica ionica dello spettrometro di massa è rappresentata in figura 49.

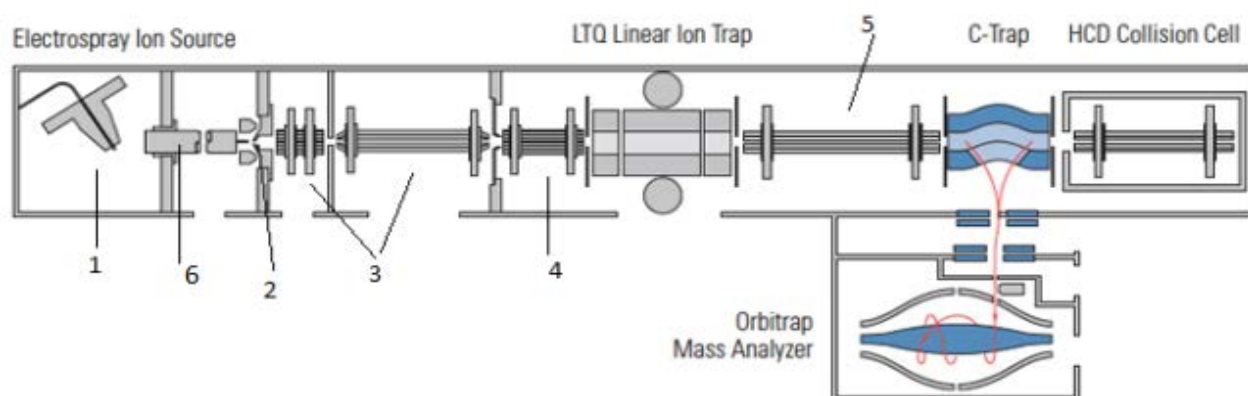


Figura 49 Ottica ionica dello spettrometro di massa ibrido LQ Linear Ion Trap (52).

Gli analiti separati mediante HPLC vengono infusi direttamente nella sorgente di ionizzazione (indicata dal numero 1 in figura 49) passando attraverso un capillare riscaldato (6), cui è applicato un potenziale che permette la declusterizzazione degli ioni solvatati e li guida, attraverso lo skimmer (2), ad una serie di lenti e sistemi ottici (3) che eliminano ulteriormente eventuali molecole di solvente. Le lenti elettrostatiche fungono da "cancello" per l'ingresso degli ioni nel multipolo (4): quando il suo potenziale è negativo gli ioni (se positivi) entrano.

Attraverso il multipolo, che ha lo stesso principio di un quadrupolo, gli ioni vengono focalizzati nella "Linear Ion Trap": questa trappola lineare a quadrupolo accumula, isola ed eventualmente frammenta, gli ioni intrappolati. Questo dispositivo permette di ottenere spettri MS e MSⁿ ad alta sensibilità, se inviati alla "C-trap", oppure spettri di massa a bassa risoluzione se si sceglie di rivelare gli ioni mediante i due detector posti lateralmente alla trappola ionica.

Se la scansione non avviene nella Ion Trap, gli ioni proseguono il loro percorso attraverso un sistema di trasmissione ionica a ottopolo (5), privo di gas. Gli ioni vengono convogliati in direzione assiale nella "Curved Linear Trap", un quadrupolo a cui è applicato un potenziale a radio frequenza. Il movimento degli ioni è smorzato da un flusso di azoto e nel mezzo della trappola si arrestano (60).

Nella C-Trap è importante il tempo di permanenza degli ioni al suo interno: se eccessivo, gli ioni riempiono la trappola, collidono e interferiscono tra loro producendo una notevole riduzione nella risoluzione del segnale prodotto.

In essa si creano pacchetti di ioni che vengono accelerati, con un rapido incremento del campo elettrico applicato, e iniettati, mediante un'apertura sull'elettrodo esterno, nell'analizzatore di massa orbitrap in un brevissimo intervallo di tempo, 50-90 microsecondi (54).

Poiché l'elettrodo curvo centrale dell'orbitrap è mantenuto ad alto voltaggio, il raggio della "nuvola" di ioni che entrano diminuisce, il pacchetto di ioni diventa sempre più compatto, tanto da entrare nella trappola orbitale attraverso una piccola fessura. Ciascun pacchetto con diverso rapporto m/z arriva all'entrata dell'orbitrap, situata all'equatore della struttura, come pacchetto di soli alcuni mm³ (56).

In esso, l'opportuno potenziale applicato agli elettrodi permette agli ioni di non andare a collidere con gli elettrodi stessi ma di iniziare ad oscillare, in pacchetti compatti di ioni, a diverso rapporto m/z (ciascun pacchetto ha una propria frequenza di oscillazione), che ne determina anche il tempo necessario alla loro entrata: ioni con m/z piccoli entrano prima, mentre gli ioni più pesanti si attarderanno nel loro ingresso in trappola, come risulta dall'equazione [13].

A questo punto i potenziali applicati vengono stabilizzati e le oscillazioni degli ioni inducono la formazione della corrente immagine nelle due metà dell'elettrodo esterno, che viene rilevata mediante un amplificatore differenziale (57).

Il vantaggio di avere uno strumento ibrido (orbitrap e trappola ionica lineare) permette di eseguire diversi tipi di esperimenti:

- La frammentazione di ioni in MS/MS o MSⁿ. Gli ioni frammento ottenuti, possono essere rilevati mediante i detector posti lateralmente alla trappola ionica o essere inviati all'orbitrap e rilevati in alta risoluzione.
- Nell'ottica ionica si osserva poi la presenza di una cella di collisione HCD (High Collision Dissociation), simile alla cella di collisione presente nei tripli quadrupoli, che produce spettri di frammentazione ad alta energia fornendo informazioni complementari a quelle ottenute dalla trappola ionica. I frammenti ottenuti sono inviati all'orbitrap nel quale si acquisisce uno spettro di massa in alta risoluzione. Gli spettri così ottenuti sono utilissimi per ottenere informazioni strutturali dettagliate sulle molecole incognite.

c) RIVELATORE DI MASSA

Il detector, o rivelatore di massa, converte l'energia cinetica, di cui sono dotate le particelle in arrivo dall'analizzatore di massa, in segnale elettrico. Ciò avviene poiché gli ioni collidono con la superficie del rivelatore, provocando l'emissione di una corrente di elettroni che a loro volta, a causa della differenza di potenziale applicato, colpiscono un secondo elettrodo che emette elettroni e così via.

Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene digitalizzato ed elaborato da un calcolatore, presente nello spettrometro, che misura gli ioni, elettroni o fotoni con rivelatori di luce o carica. Solitamente il sistema di rivelazione negli spettrometri di massa è un moltiplicatore elettronico, costituito quindi da una serie di elettrodi in successione.

Il rivelatore utilizzato nel presente lavoro è un ricevitore di radio frequenza, collegato ad un calcolatore che permette la trasformazione del segnale elettrico mediante trasformata di Fourier.

Dalla misurazione degli ioni così prodotti a cascata, si ottiene infine uno spettro di massa.

3.2.4.3 SPETTRO DI MASSA E FRAMMENTAZIONE

Lo spettro di massa è un grafico a linee verticali rappresentanti l'intensità di segnale o l'abbondanza di ioni a determinato rapporto massa su carica. Lo spettro di un campione sarà rappresentativo degli ioni presenti in esso, presenti con le abbondanze relative al picco base, cioè lo ione più intenso che è stato separato. Un esempio è mostrato in figura 50. Indipendentemente dalla sua intensità, l'intensità del picco base viene normalizzata a 100 e le intensità di tutti gli altri ioni vengono normalizzate ad esso.

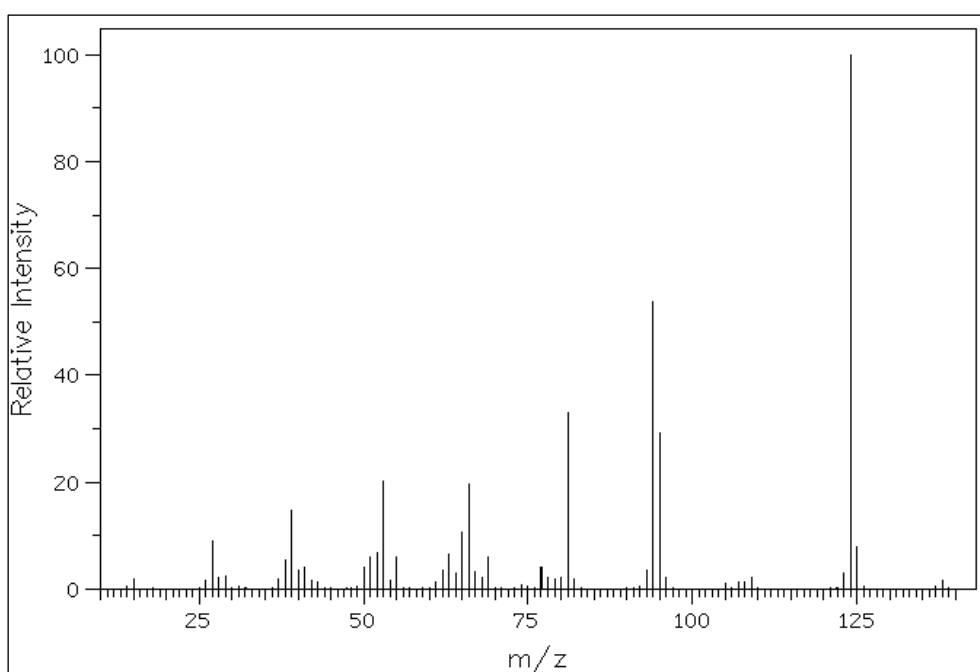


Figura 50 Spettro di massa.

Lo ione molecolare, invece, è il primo che si forma nella ionizzazione del campione, a volte corrispondente a quello più intenso e ricco di energia.

Lo ione molecolare si forma per perdita o somma di un elettrone sulla molecola in esame, creando così un radicale cationico (M^+) o anionico (M^-) sulla base della modalità di ionizzazione applicata, con la stessa massa della molecola di partenza. Specialmente nel caso di molecole complesse, esso può decomporsi in un'ampia varietà di modi ed i frammenti prodotti possono subire un ulteriore processo di scissione.

Le principali frammentazioni delle molecole organiche si distinguono in:

- SCISSIONI PRIMARIE (che avvengono sullo ione molecolare)
- SCISSIONI SECONDARIE (che avvengono sui frammenti)
- SCISSIONI SEMPLICI (con rottura di un legame semplice fra due atomi)
- SCISSIONI MULTIPLE O RIARRANGIAMENTI (reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti) (61).

La scissione di un legame può essere omolitica cioè con attribuzione di un elettrone per ognuno dei due frammenti ottenuti, oppure eterolitica ossia entrambi gli elettroni di legame vengono assegnati ad uno dei frammenti creando così una netta separazione di carica.

La sua intensità però non è sempre 100 in quanto molecole più complesse, ricche di ramificazioni per esempio, poiché facilmente ionizzabili, saranno maggiormente soggette alla perdita di un frammento, tipo un gruppo metilico, piuttosto che perdere o aggiungere un unico elettrone, formando il cosiddetto picco base di tale molecola.

Ne è un esempio la figura 51, in cui lo ione molecolare è assente, mentre il picco base deriva dalla perdita di un frammento della molecola di partenza.

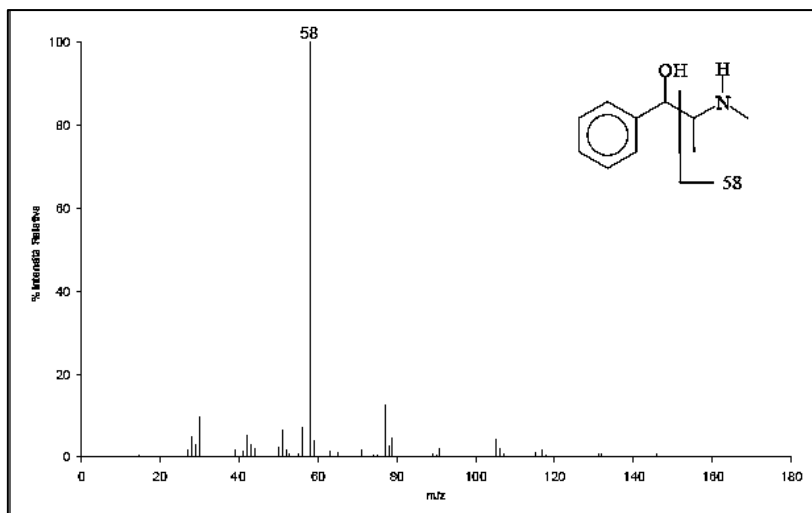


Figura 51 Spettro di massa dell'efedrina (61).

Sui frammenti ottenuti, se vi è energia sufficiente, possono avvenire successive frammentazioni dei frammenti stessi, esempi di analisi MS^n .

Quando non viene iniettata un'unica molecola però, lo spettro di massa prodotto mostra tutti gli ioni presenti, in quel dato punto del cromatogramma, cioè ad un certo tempo di ritenzione.

Le successive frammentazioni avvengono sullo ione più abbondante, oppure potrebbero avvenire scissioni anche su uno degli altri ioni presenti in quel picco cromatografico.

La figura 52 è un esempio della frammentazione multipla dello ione più abbondante a quel tempo di ritenzione.

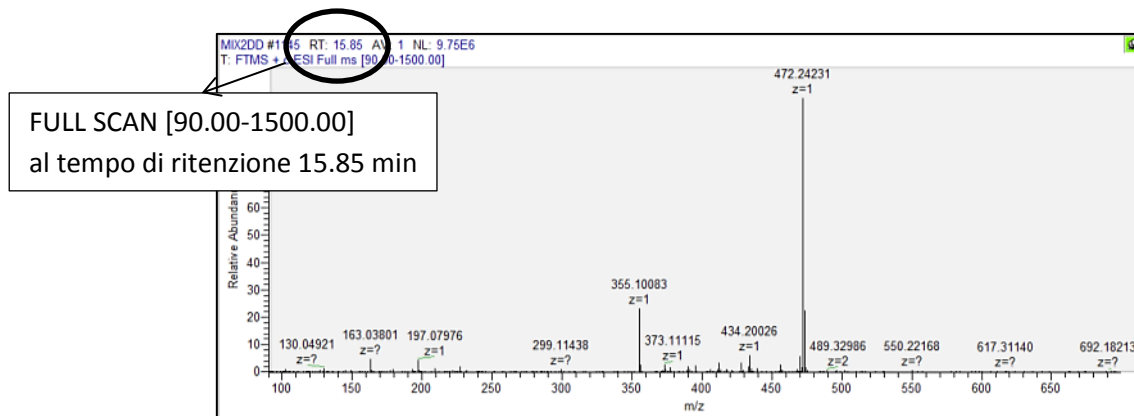


Figura 52 Spettro di massa full scan.

Nella figura 52 si evidenziano tutti gli ioni, eluiti al tempo 15.85 min, presenti nel campione, in un range di massa tra 90 e 1500 m/z.

PRIMA FRAMMENTAZIONE (MS^2): frammentazione dello ione più intenso ossia lo ione con $m/z=472.24$.

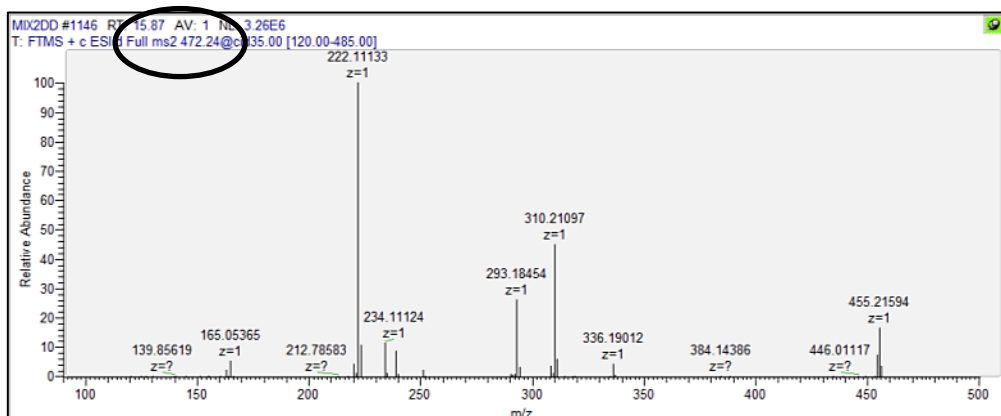


Figura 53 Spettro di massa relativo ad una frammentazione MS^2 .

SECONDA FRAMMENTAZIONE (MS^3): frammentazione dello ione 222.11.

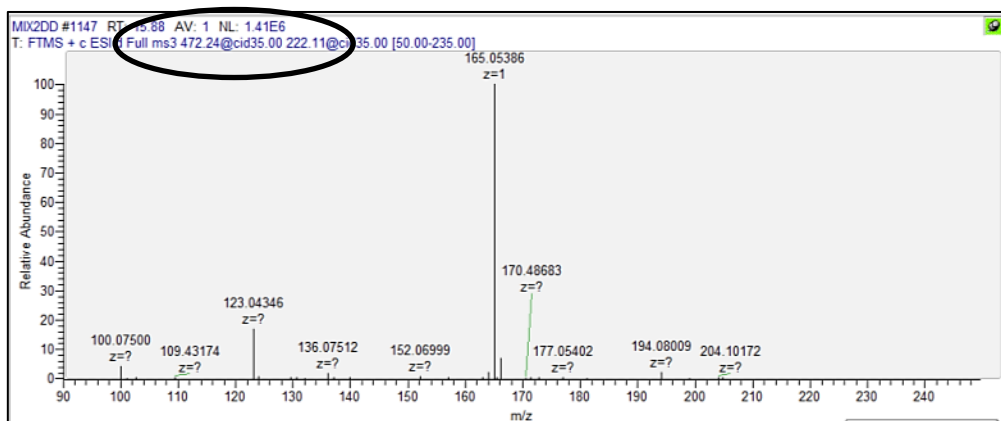


Figura 54 Spettro di massa relativo ad una frammentazione MS^3 .

3.3 Elaborazione dati

3.3.1 XCALIBUR

Xcalibur, software di supporto dello spettrometro di massa, è in grado di mettere in comunicazione il cromatografo, lo spettrometro di massa e l'utente.



Figura 55 Visione applicazioni software Xcalibur.

Questo software presenta nella schermata di avvio, presente in figura 55, tutte le proprie potenzialità: il software, se online (collegato agli strumenti), permette all'operatore di gestire le condizioni operative dello strumento, modificando tutti i parametri strumentali, l'inizio delle analisi o la loro interruzione, di impostare un metodo, avviare una sequenza di analisi, fare analisi sia qualitative che quantitative ed eventualmente anche creare una libreria dei composti identificati.

Una volta acquisiti i dati, Xcalibur restituisce il cromatogramma di ogni campione, i "data dependent" e ad ogni scansione effettuata, il relativo spettro di massa.

In questo lavoro di tesi si sono analizzati 12 campioni e 3 data dependent dei campioni mix per la ionizzazione negativa e altrettanti in positivo.

Il software, per l'analisi qualitativa, permette inoltre di interagire con i dati prodotti: selezionando, per esempio, un determinato rapporto m/z, il software propone una serie di formule brute associabili a quel m/z, a quella polarità e all'errore sulla massa arbitrariamente stabilito, come evidenziato in figura 56.

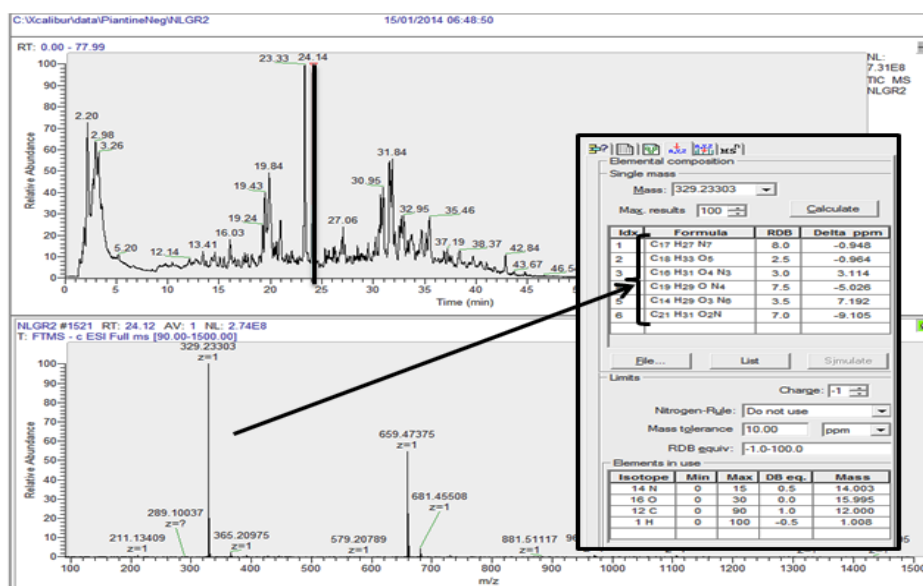


Figura 56 Esempio proposte formule brute sulla base del rapporto massa/carica richiesto.

La formula bruta proposta è accompagnata dall'errore e dal "ring double bond equivalent" relativo alla massa selezionata: l'errore è solitamente espresso in ppm, mentre il cosiddetto RBD indica il grado di insaturazione di un composto organico, dato dalla somma di tutti gli anelli, dei doppi e tripli legami presenti nel composto. Per esempio, un cicloesano, costituito da un unico anello non aromatico avrà RDB=1, il benzene, con formula C₆H₆, ha RDB=4 (un anello e tre doppi legami).

Per molecole più complesse, si utilizza la formula [17]:

$$RBD = x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$$

Equazione 17 Espressione ring double bond equivalent.

con:

x = numero di atomi di carbonio nel composto

y = numero di atomi di idrogeno nel composto

z = numero di atomi di azoto nel composto.

Quest'ultimo dato, da solo, non è sufficiente per la rappresentazione della molecola ipotizzata, ma deve essere supportato da analisi NMR, MS o dalla spettroscopia IR.

Una regola piuttosto utile è la regola dell'azoto: se la massa dello ione selezionato è pari, la molecola conterrà un numero pari di atomi di azoto, compreso lo zero, in numero dispari se la massa è dispari.

Questa regola permette di escludere alcune delle formule brute proposte per quel determinato rapporto m/z, riducendo il lavoro d'identificazione.

La formula bruta proposta è costituita da atomi di C, H, N e O ma anche da altri elementi come P, F, Na, S o K, sulla base degli elementi che arbitrariamente sono selezionati dall'operatore.

Al contrario, è possibile inserire, impostando la formula bruta, la massa esatta della molecola d'interesse e verificarne la presenza nel campione, applicando la funzione allo spettro di massa (57).

Per l'analisi quantitativa, è possibile integrare l'area dei picchi cromatografici e determinare l'intensità di segnale di un dato ione.

Vista la quantità di dati ottenuti, sono stati utilizzati due software, MetAlign e MSClust, per la loro riduzione ed elaborazione al fine di ottenere, al termine dell'operazione, solo i dati ritenuti significativi.

3.3.2 METALIGN

MetAlign è un software utilizzato per la pre-elaborazione e il confronto dei dati ottenuti in cromatografia liquida o gassosa, ideato da Arjen Lommen del gruppo RIKILT Wageningen UR, Plant Research International. MetAlign è in grado di processare l'enorme mole di dati derivante dall'analisi metabolomica per eliminare il rumore di fondo negli spettri (parte A), allineare i tempi di ritenzione e il numero della scansione dei vari ioni a determinato rapporto massa/carica (parte B) e per il calcolo della massa accurata, al fine di ridurre i dati a quelli significativi e correlati.

Il numero teorico massimo di file "data" che questo algoritmo matematico può processare è 1000, ma il numero dei file, il processore del computer e la risoluzione di massa condiziona il tempo necessario per processare i dati, variabile da pochi minuti a qualche giorno (62).

La figura 57, mostra l'interfaccia del programma.

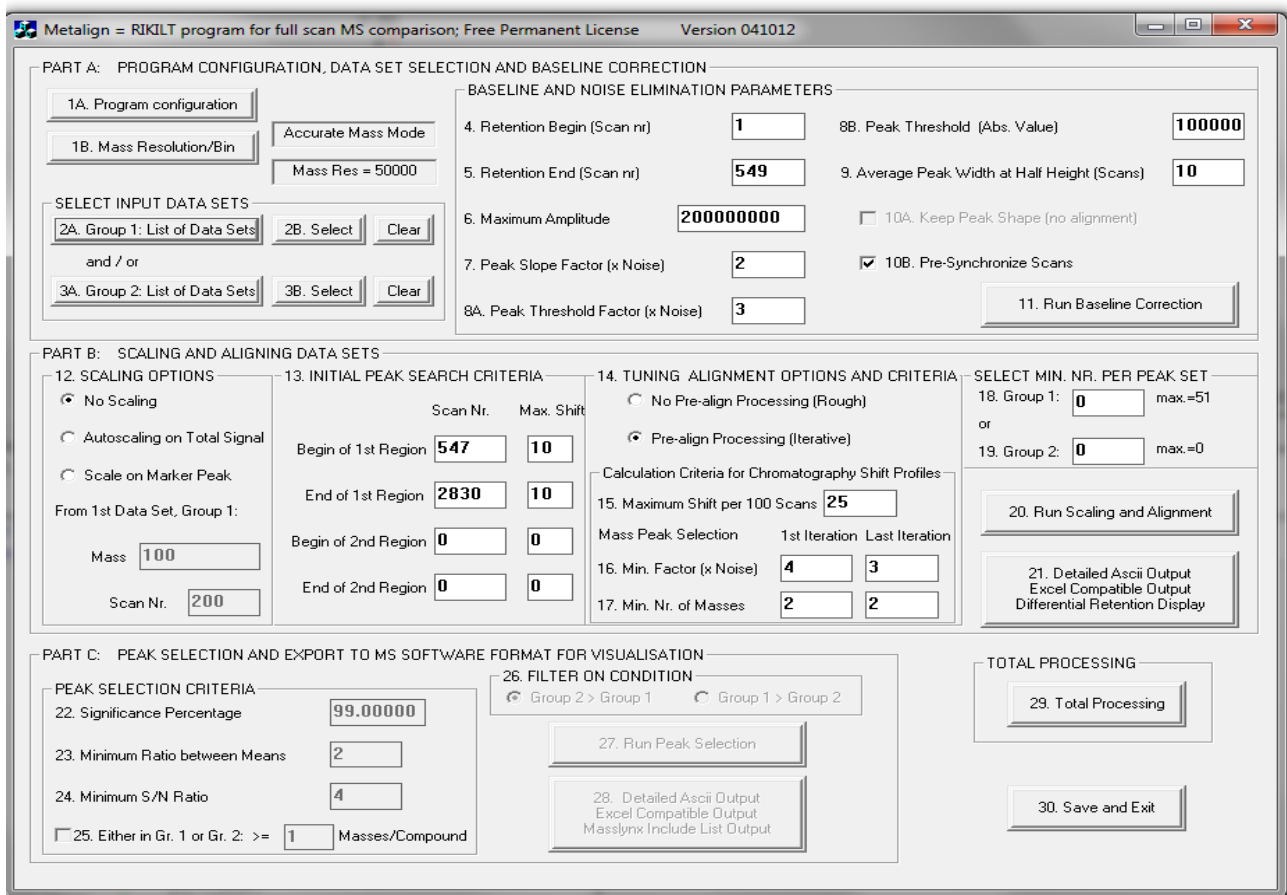


Figura 57 Pannello operativo software MetAlign.

Il programma è diviso in tre parti:

- PARTE A: configurazione del programma, selezione dei dati, estrazione dei picchi e correzione della linea di fondo
- PARTE B: ricopre l'effettivo allineamento dei picchi di massa estratti e l'output dei dati della matrice
- PARTE C: è utilizzato per identificare e visualizzare picchi cromatografici che sono statisticamente differenti tra due gruppi di campioni (fase opzionale, nel caso in cui si utilizzino più gruppi di dati separati) (36).

PARTE A

Nella prima parte, dopo il caricamento dei file originali di interesse, il software esegue dei calcoli in grado di eliminare il rumore di fondo dai dati, ovvero l'informazione strumentale superflua e talvolta fuorviante, che non permette una corretta valutazione degli spettri di massa: per fare ciò l'utente ha la possibilità di variare alcuni parametri tra cui la finestra di scan (numero di scansioni) che si desidera analizzare, l'intensità minima di segnale di ioni da considerare informazione utile. L'esclusione del rumore di fondo avviene attraverso alcuni complessi algoritmi matematici. Uno dei parametri importanti nel calcolo del rumore è la definizione di un fattore di pendenza del picco e un fattore soglia del picco (punti 7 e 8). Tali fattori, moltiplicati per il rumore di fondo, forniscono dei criteri per cui è possibile considerare un picco del cromatogramma come un segnale significativo dell'analisi, distinguendolo dal rumore di fondo. Il valore 2 per esempio, indica che, perché si consideri picco un segnale analitico, è necessario che la sua intensità minima di segnale sia due volte quella del rumore di fondo. Un altro parametro importante è la stima della larghezza del picco a media altezza (media del numero di scan dall'inizio alla fine di un picco molto largo e di uno molto stretto a metà altezza) che permette di non considerare i picchi troppo piccoli rispetto alla

media della larghezza degli stessi nel cromatogramma e di non sdoppiare eventuali picchi particolarmente larghi.

PARTE B

Dopo aver eliminato il rumore di fondo, si procede con l'allineamento dei tempi di ritenzione e delle scansioni. Il software permette l'inserimento di valori di discostamento in termini di scan tra un campione e l'altro, permettendo così un allineamento corretto dei picchi senza eliminare eventuali picchi rilevanti. Lo strumento LTQ Orbitrap non lavora a scansioni costanti nel tempo ma aumenta la frequenza degli scan all'aumentare della concentrazione del campione. Per ottenere un allineamento corretto è quindi necessario processare i cromatogrammi prima di effettuare l'allineamento. Un altro parametro da inserire è il numero di masse necessarie per individuare un picco. Questo numero varia a seconda dello strumento utilizzato, in genere per le analisi LC-MS in cui la frammentazione non è spinta sono sufficienti 3/4 masse. Vi è inoltre la possibilità, alla fine di ciascun passaggio del processo, di verificare il risultato ottenuto ed eventualmente modificare alcuni parametri.

(La **PARTE C** viene avviata solo nel caso in cui si utilizzino due gruppi separati di dati).

Infine, con il tasto 30 si salvano i dati ottenuti, in una cartella apposita, in formato excel (end_result_amplitudes, end_result_mass, end_result_noise e end_result_retentions).

I parametri utilizzati per le serie di file processati sono riassunti nella tabella 3.

Tabella 3 Parametri utilizzati nell'elaborazione dei dati.

	Neginizio	Neg	PosInizio	PosIdrici	PosNOIdrici
Retention begin (scan)	1	560	1	549	549
Retention end (scan)	549	3197	549	2830	2830
Maximum amplitude	200000000	150000000	200000000	200000000	400000000
Peak slope factor (x noise)	2	1	1	1	2
Peak threshold factor (x noise)	3	2	2	2	3
Peak threshold (abs value)	100000	500000	200000	100000	200000
Average peak width at half height (scan)	20	10	8	10	10
Max shift (begin)	5	10	5	10	10
Max shift (end)	5	10	5	10	10
Maximum shift (per 100 scans)	25	35	25	25	25
Min. factor (x noise)	4;3	4;3	4;3	4;3	4;3
Min. n° of masses	2;2	2;2	2;2	2;2	2;2

A partire dal file "end_result_amplitudes" è possibile effettuare varie operazioni di preparazione alla fase successiva di elaborazione dei dati.

In primo luogo il software ha trasformato tutti i valori d'intensità inferiori alla soglia stabilita come uguale alla soglia stessa: è necessario quindi individuare in quanti file l'intensità dello ione osservato è uguale alla soglia per, eventualmente, eliminare l'intero dato se questo non supera la soglia per almeno tre volte (tre è il numero delle repliche di uno stesso campione).

Una volta eliminati tali dati, eliminando così dal numero elevato di dati quelli poco significativi, è necessario "randomizzarli" ossia assegnare loro dei valori casuali in modo tale che nelle elaborazioni successive non ci sia il rischio che il software scambi il rumore di fondo con un dato significativo: tale processo può essere effettuato tramite una funzione excel.

I dati necessari per le fasi di elaborazioni successive sono il numero di scansione, la massa, il tempo di ritenzione e ovviamente le intensità dei campioni.

I dati vengono ordinati per tempo di ritenzione crescente e si ottiene il file MSClust_prepared (in formato .tab delimited) adatto alle operazioni di MSClust.

3.3.3 MSCLUST

MSClust utilizza un algoritmo matematico, utilizzato prevalentemente in metabolomica per l'identificazione del pattern metabolomica di un sistema biologico, che permette di associare ioni o frammenti di ioni dello stesso metabolita in un cluster a partire da due proprietà: somiglianze in cromatografia e somiglianze qualitative in un certo insieme di ioni frammento (1).

MSClust si occupa della riduzione dei dati, attraverso la formazione di cluster, e dell'estrazione di metaboliti a partire dai dati di allineamento cromatografico ottenuti mediante l'uso del software MetAlign.

L'algoritmo individua dei criteri di relazione tra i picchi cromatografici e identifica gli ioni appartenenti allo stesso cluster, senza alcuna conoscenza preliminare ma basandosi solo sulle informazioni presenti nei dati acquisiti.

Il software può essere applicato sia a dati derivanti dalla cromatografia liquida, ma anche dalla GC-MS.

Dopo aver caricato il file MSClust_prepared nel programma, è necessario impostare dei parametri affinché avvenga il corretto raggruppamento delle masse.

In tutte le elaborazioni effettuate in questo lavoro di tesi, si sono utilizzati i valori mostrati in tabella 4:

Tabella 4 Parametri utilizzati per il software MSClust.

efficient peaks	100
peak width	10
peak width margin softness	2
correlation threshold	0.9
correlation threshold margin softness	0.02
PD reduction	0.8
PD reduction softness	0.01
Stop criterion	2

Per "efficient peaks" si considera la finestra di picchi necessari a coprire l'intero spettro di massa. In GC-MS i valori si aggirano tra 200-300, in LC-MS possono essere più bassi.

L'ampiezza del picco (peak width) è la finestra di scansioni o tempo di ritenzione in cui ci si aspetta che si trovino masse allineate e appartenenti alla stessa classe.

“Peak width margin softness” è un parametro utilizzato per tunare la softness dei margini del picco di massa: solitamente è una frazione del peak width: i valori variano tra 1/3 e 1/10.

Il “correlation threshold” è il margine di correlazione tra due picchi vicini, affinché questi si possano considerare come appartenenti allo stesso picco e analogamente al “peak width margin softness”, il “correlation threshold margin softness” indica il margine per cui la correlazione può essere variata (1-3% della correlation threshold).

PD sta per “potential density”: il picco di massa con PD maggiore è da considerarsi come il centrotipo del cluster creato. Perciò il “PD reduction” è il fattore di riduzione applicato alla masse vicine o simili al centrotipo, che varia tra 0.1 e 1, rispetto al centrotipo stesso. La riduzione è applicata finché si arriva ad un segnale di stop, determinato dallo “stop criterion”, che indica il valore più basso di PD per il quale può essere applicata la riduzione.

Il file risultante dall’elaborazione si presenta come una serie di colonne contenenti i parametri relativi a un determinato valore di m/z e le relative intensità di segnale nei campioni (figura 58).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
	centrotipo	fattore del centrotipo	numero del picco	numero della scansione	tempo di ritenzione (µmin)	massa (µD)	Grcc1	Grcc2	Grcc3	Gridr1	Gridr2	Gridr3	Nlgr1	Nlgr2	Nlgr3
1															
2	4939	1	852	1424	22620447	534074036	35121.9	51330.8	36038.7	7.20E+06	7.07E+06	6.47E+06	59639.5	42549.5	331
3	5982	1	1219	1457	23146072	644139465	57812.6	61358.3	36225.5	5.61E+06	5.33E+06	5.36E+06	51052.4	42261.3	3
4	4606	0.991898	745	1404	22302105	638051331	46366.9	59540.2	51329.8	6.03E+06	5.53E+06	5.04E+06	51022.2	64612	69
5	7355	1	1572	1492	23703514	638786438	20761.4	39959.6	25433	8.48E+06	7.31E+06	7.17E+06	60928.9	33362.9	49
6	5464	0.977768	1047	1446	22970831	600113464	28013.5	59643.2	50014	7.99E+06	7.42E+06	7.03E+06	22036.5	40813.8	25
7	6542	0.99197	1239	1477	23464687	585955017	26578.1	22250.4	44110.4	8.32E+06	7.92E+06	7.46E+06	35645.9	65255.5	55
8	8899	1	2067	1520	24149529	635384949	30445.5	56179.8	22550.8	8.75E+06	7.97E+06	8.04E+06	42302.9	28793	27
9	20766	1	7031	1581	25105219	702869507	21810.6	25487.6	33643.4	1.59E+07	1.41E+07	1.35E+07	29070.5	27689.5	48
10	9869	0.978224	2497	1535	24372498	607654419	65825.5	42752.4	64852.4	9.60E+06	9.05E+06	8.16E+06	54911.7	57218.9	30
11	4363	0.942713	538	1396	22174677	608700439	60906.5	44315.8	21364.1	8.37E+06	7.62E+06	7.23E+06	52795.2	38740.5	50
12	8109	0.930121	1757	1508	23958391	591358948	48565.7	28765.7	33708	9.38E+06	8.13E+06	7.39E+06	36576.9	53324.6	42
13	5157	0.854046	937	1435	22795637	567093811	41325.5	48262.7	44180.6	8.36E+06	7.99E+06	7.44E+06	29145.4	30544.8	31
14	14171	1	5916	1565	24850340	697046570	36839.3	21846.9	34895.8	1.36E+07	1.13E+07	1.15E+07	66587.9	53840.8	62
15	3901	1	373	1363	21649057	520647888	54357.3	29155.2	49873.1	9.32E+06	8.80E+06	8.38E+06	56584.8	49042.6	33

Figura 58 Esempio file dati ottenuti.

Tra gli output ottenuti, vi è il file “parameters” in cui sono riassunti i parametri utilizzati in quella determinata elaborazione di dati e il “mass spectra”, utilizzabile con il supporto della libreria online NIST, in cui si riassume, per ogni picco, identificato con il numero del picco, le masse contenute in esso con le relative intensità di segnale. L’utilizzo combinato del programma NIST e del file ottenuto dall’elaborazione dati, permette di ottenere direttamente una serie di molecole che possano soddisfare le caratteristiche ricavate dallo spettro di massa e dal cromatogramma.

In questo lavoro di tesi, quest’ultimo non è stato utilizzato visto che la mole di dati acquisiti non permette un’analisi diretta ma necessita di un’ulteriore elaborazione e sintesi.

3.3.4 EXCEL

Numerose modificazioni possono esser fatte su questo file per estrarre l’informazione utile ossia i dati necessari per l’identificazione dei metaboliti rilevati nei campioni analizzati.

Una prima riduzione può essere fatta ordinando in modo decrescente il fattore del centrotipo: si eliminano i dati con valore inferiore alla soglia (arbitrariamente si è stabilito il valore 0.9), valore di correlazione tra i cluster, variabile tra 0 e 1.

Il centrotipo, caratteristico di ciascun cluster ottenuto, è la massa centrale del cluster, attorno al quale vi sono altre masse ad essa legate.

Successivamente è possibile fare varie suddivisioni, in modo tale da valutare le differenze, in termini d'intensità di analiti presenti, tra i vari campioni e quindi individuare quelli più significativi.

Per fare ciò, si è calcolato il valore medio d'intensità per le repliche dello stesso campione e vengono confrontati, ordinandoli per intensità, masse relative a diverse modificazioni subite dalle piante, per stress subito, per entrambi i fattori o ancora diversità per singola replica.

Un esempio è riportato in figura 59.

	A	B	C	D	E	F	G	T	U	AK	AL	BB	BC
1	eg	cent.facto	peak num	Scan Nr	Ret(umin)	Mass(uD)	Massa	MediaGR	DEVST	MediaRolc	DEVST	MediaWild	DEVST
2	5823	1	28	2032	31578810	555283386	555.28336	117881792	39992059	123312193	33055320	138982400	11777732
3	986	1	48	983	15459964	353087463	353.0875	92420448.3	61783424	119736942	55037264	119610567	55520452
4	5588	1	45	1986	30866425	293211243	293.21124	89863616.7	39268055	78285106.7	30970618	62234673.3	22663891
5	5358	1	41	1939	30164309	577267090	577.26715	80772097.5	46624254	98425753.3	36420914	68148020	30767563
6	5947	1	34	2051	31859245	295227570	295.22757	78405900	42931420	77231453.3	37396133	75336726.7	31940476
7	5166	1	65	1892	29495909	559310547	513.30469+AF	75437540	41412667	93673000	18206318	60687680	28315993
8	6213	1	42	2105	32659378	737357910	737.35791 (691.35138 + AF)	71429374.2	48773964	60451960	35471619	65558900	30239579
9	4556	1	67	1766	27609999	721363281	721.36316 (M- H+FA)	57961535.8	43146244	86235440	36342011	60728377.3	32117628
							723.37891 (677.37201 +						

Figura 59 Foglio di calcolo Excel: suddivisione dei dati in base alle diverse modificazioni genetiche.

Si sono selezionate le 50 masse più abbondanti (numero arbitrario ritenuto sufficiente per avere uno sguardo completo sulla molteplicità dei dati) e dopo loro ordinamento per intensità, si sono cancellati i dati non presenti nei primi 50 per nessuna delle selezioni considerate.

La deviazione standard sulla media è stata calcolata per valutare la variabilità delle intensità di segnale dello stesso tipo di modificazione o stress, da cui si notano deviazioni standard elevate, pressoché dello stesso ordine di grandezza dell'intensità di segnale misurata.

In questo modo si sono ottenute solo masse significative ossia quelle da identificare, con i relativi parametri.

3.3.5 IDENTIFICAZIONE DEI METABOLITI

Dopo aver ottenuto unicamente dati significativi dalle analisi effettuate, ossia i rapporti m/z più significativi, in termini di abbondanza o diversità per il tipo di campione, si passa all'identificazione molecolare.

Un primo criterio è la formula bruta: il software Xcalibur propone, sulla base del numero e tipo di atomi selezionati dall'utente, varie formule brute che concordino con il rapporto m/z selezionato. Gli atomi più comunemente utilizzati sono C,N,H,O o anche S,P e Na.

Il software determina l'errore di massa rispetto alla massa esatta che lui stesso calcola, a partire dalle masse isotopiche degli atomi selezionati: vista l'elevata accuratezza e risoluzione di massa dello spettrometro di massa utilizzato in questo lavoro di tesi, formule con errori molto elevati sono da scartare.

Un secondo importante elemento da considerare è la frammentazione di massa: in letteratura sono presenti numerosi testi e articoli scientifici in cui sono presenti e descritti spettri di massa di molecole

individuate in precedenti lavori. La presenza di ioni frammento nello spettro di massa del campione, comuni a quelli individuati in lavori presenti in letteratura, può essere un buon supporto nell'identificazione del pattern metabolico di una matrice biologica.

Un'ulteriore difficoltà proviene dall'esistenza di eventuali isomeri della stessa molecola: l'acido caffèoilchinico, per esempio, presenta svariati isomeri che possono essere distinti solo grazie ai diversi frammenti o, in molti casi, solo alla diversa intensità di segnale degli ioni frammento.

La sola frammentazione di massa non è però sufficiente per l'identificazione di una molecola con un elevato grado di confidenza nell'assegnazione di un nome (35) (i livelli di identificazione, sulla base dei dati in possesso dell'utente, sono descritti nel paragrafo 2.3.5).

Sono stati perciò utilizzati anche altri supporti online per l'identificazione dei metaboliti.

I programmi utilizzati maggiormente sono:

-Metlin: database molto utilizzato e affidabile per la ricerca metabolica, con la possibilità di stabilire l'errore massimo accettabile (in ppm) e la carica degli ioni considerati. Con l'opzione Advanced si può procedere a partire dalla formula bruta (ipotizzata da Xcalibur) e verificare quali molecole corrispondono ad essa. Si possono individuare anche formule con addotti (acido formico, acido acetico, sodio, potassio, cloro ecc.).

-HMDB database molto ricco, molto simile a Metlin. In numero maggiore, si possono ipotizzare anche ioni multicarica.

-Chem spider in cui vengono ipotizzate formule di struttura da formule brute

-Lipid database, specifico per lipidi in tutte le forme (fosfolipidi, sfingolipidi, acidi grassi semplici ecc.)

-ChemDraw utile per disegnare la molecola e ipotizzare la frammentazione di massa

-Dati di letteratura, articoli relativi all'argomento, in cui vi siano analisi di massa e frammentazioni effettuate da altri gruppi di ricerca, su campioni di *Solanaceae*.

3.4 Analisi statistica

L'analisi statistica, e in particolare la chemiometria, nasce dal presupposto di ricavare informazione utile da un sistema di dati ad alta complessità.

Essa è spesso utilizzata per:

- eliminare rumore sperimentale e/o informazione ridondante, causata per esempio dalla correlazione tra più variabili di cui non si ha completa conoscenza,
- eliminazione di dati, seppur significativi, ma privi di informazione sistematica (per esempio valori medi),
- in presenza di un numero limitato di dati raccolti,
- quando non si hanno conoscenze pregresse sul sistema in analisi,
- quando vi sono effetti sinergici e/o contrastanti tra variabili dello stesso sistema.

La chemiometria nasce proprio dal tentativo di risolvere questi problemi reali, di natura ambientale, farmacologica, geologica, processi industriali, ricerca di risorse e loro sfruttamento, unendo principi matematici, statistici e scientifici semplici.

Dallo studio di dati sperimentali, si possono ricavare informazioni sulle relazioni tra le variabili, similitudini e classificazione, congruenza, rilevanza o ridondanza: anche l'eliminazione di un dato è un'informazione utile nell'esplorazione dei dati (63).

L'analisi statistica, in questo lavoro di tesi, è stata sfruttata per individuare dal punto di vista chimico (composizione molecolare e strutturale) relazioni e correlazioni tra i dati sperimentali, ottenuti da campioni di piantine.

Il dato chimico è costituito da varie componenti:

- composizione chimica, elementi che si combinano in un composto stabile
- sintesi, ossia la possibilità di conoscere, ed eventualmente riprodurre, i passaggi chimici che portano alla formazione di un composto chimico
- struttura molecolare, scheletro della molecola che ne definisce caratteristiche e proprietà chimico-fisiche.

La combinazione di questi tre concetti rende complesso un problema reale, e restrittivo un approccio unicamente chimico del problema.

I metodi statistici si basano su un concetto di similitudine o almeno di diversità limitata tra i sistemi, gli oggetti o i dati su i quali sono state misurate le medesime variabili (63).

Un primo gruppo di metodi statistici si basa, come criterio di similarità, sulla distanza euclidea: due campioni saranno tanto più simili quanto più vicini saranno nello spazio p-dimensionale dove per p si intende il numero di variabili misurate. Più gli oggetti sono simili, più la distanza d tende a zero.

Di questo gruppo appartengono i metodi di classificazione LDA (analisi discriminante lineare), K-NN e Cluster Analysis.

Nel secondo gruppo vi sono metodi di classificazione che interpretano il concetto di similarità tramite un modello matematico: oggetti diversi sono simili se possono essere descritti dallo stesso modello matematico.

Per poter applicare un modello matematico è necessario che le variabili siano continue ed esatte, che vi sia un campione rappresentativo della popolazione e che vengano escluse quelle variabili che non contengono informazione sistematica.

L'analisi delle componenti principali (PCA) appartiene a questo gruppo.

Le tecniche chemiometriche si basano sull'osservazione di p variabili in n campioni: dall'acquisizione dei dati si ricava una matrice di numeri.

Un campione può essere descritto da un'unica misura sperimentale o da numerose misure: in quest'ultimo caso si parla di un insieme di dati multivariato e analisi multivariata.

Le variabili sono le grandezze, sperimentali o calcolate per via teorica, con cui si studia un fenomeno, le quali vengono trasformate in grandezza numerica con le opportune scale di misura, al fine di facilitare il calcolo e interpretare il dato raccolto.

Si definisce inoltre il concetto di classe ossia un raggruppamento di dati e dei corrispondenti oggetti che si distinguono da altri campioni analizzati appartenenti a categorie differenti: in questo lavoro, per esempio, è stato possibile distinguere la classe delle piante di *Nicotiana* modificate per il gene GR o per quello ROL C rispetto a quelle geneticamente non modificate.

Prima di procedere con l'analisi statistica è necessario fare un controllo dei dati: verificare se vi sono dati mancanti (si elimina il dato, la singola variabile o lo si sostituisce con il valor medio), se vi sono solo dati costanti per tutte le variabili di un dato o se uno o più valori delle variabili è minore della soglia limite imposta.

Dopo quest'operazione, in questo lavoro di tesi, i dati sono stati trascritti nell'apposito software di elaborazione statistica StatSoft e standardizzati, processo di scalatura o normalizzazione dei dati, necessaria prima dell'utilizzo di qualsiasi metodo chemiometrico, in presenza di un numero elevato di dati (64).

Esso consiste nel rendere più "simili", mediante opportuni coefficienti, i dati di una serie, in modo tale che questi siano confrontabili. La standardizzazione si ha dividendo ogni variabile per la propria deviazione standard (64):

$$snt_{x_{ij}} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{\sqrt{\sum_{i=1}^I \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{I}}}$$

Equazione 18 Modello per la standardizzazione di un numero elevato di dati (64).

dove i è il numero dei campioni e j il numero di misure fatte su un campione.

In questo lavoro di tesi i è pari a 12 per ciascuna modalità di ionizzazione e j=3 (repliche).

I metodi di analisi statistica utilizzati sono la Cluster Analysis e PCA. In questi metodi di analisi statistica non è necessario avere delle conoscenze pregresse sui dati da analizzare.

3.4.1 CLUSTER ANALYSIS

Il termine cluster prende forma da una rappresentazione piuttosto pittoresca del processo, che in francese è indicato con il termine "nuages" corrispondente al nostro "nuvole", per indicare oggetti ravvicinati e formanti una classe di composti (65).

Il principio base della cluster analysis (analisi dei gruppi) è quello di individuare la presenza di *strutture non casuali* nei dati ossia la presenza di raggruppamenti omogenei di punti nello spazio p-dimensionale al fine di definire delle classi di composti all'interno di una popolazione di dati.

In un cluster si possono definire alcune caratteristiche:

- centroide: vettore delle medie delle variabili calcolate per gli oggetti assegnati al cluster
- centrotipo: oggetto di riferimento fra tutti gli oggetti facenti parte del cluster, di norma il più vicino al centroide
- dimensionalità: numero di oggetti nel cluster
- compattezza: vicinanza degli oggetti al centroide, definita dalla deviazione standard rispetto allo stesso (63).

Il concetto di analogia/similarità è definito dal concetto inverso di metrica, che nel caso più semplice è la distanza euclidea: tanto più due oggetti sono vicini, tanto più questi sono simili.

La distanza euclidea è la distanza tra due campioni (campione s e t per esempio) dove vi sono j misure e i campioni (64):

$$d_{st} = \sqrt{\sum_{j=1}^J (x_{sj} - x_{tj})^2}$$

Equazione 19 Calcolo della distanza tra due oggetti in analisi (64).

La misura di similarità si definisce pertanto come:

$$s_{st} = 1 - \frac{d_{st}}{d_{\max}} \quad \text{con } 0 \leq s_{st} \leq 1$$

Equazione 20 Determinazione della misura di similarità (64).

dove:

s_{st} = misura di similarità

d_{st} = distanza tra gli oggetti s e t, misurata sulla base delle p variabili

d_{\max} = distanza massima tra gli oggetti considerati.

Nell’algoritmo di calcolo dei numerosi metodi di cluster analysis si utilizza la matrice delle distanze: se n è il numero di oggetti, la matrice delle distanze è una matrice nxn in cui in ogni riga vi sono tutte le distanze tra l’oggetto considerato e tutti gli altri oggetti. Questa matrice è simmetrica e unitaria (tutti gli elementi sulla diagonale principale sono uguali a zero). In alternativa si può usare una matrice di similarità, quadrata e simmetrica, con gli elementi sulla diagonale principale uguali a uno (65).

I metodi di analisi dei gruppi possono essere suddivisi in metodi gerarchici e metodi non gerarchici: i primi includono metodi come Legame singolo, Legame medio o Legame completo, nei secondi metodi più complessi come k-means.

Tra i metodi gerarchici si distinguono metodi divisivi e metodi agglomerativi (utilizzati in questo lavoro di tesi).

Con il metodo gerarchico divisivo, l’insieme degli oggetti è suddiviso in due sottoinsiemi, che a loro volta vengono suddivisi in altri due sottoinsiemi, e così via finché ciascun sottoinsieme contiene solo un oggetto: si elimina perciò ad ogni passaggio l’oggetto più dissimile dal gruppo superiore.

Ma più utilizzati sono i metodi gerarchici agglomerativi, per i quali è necessario:

- a) definire la metrica in uso
- b) calcolare la matrice delle distanze fra gli oggetti
- c) calcolare la corrispondente matrice di similarità
- d) applicare l’algoritmo di clustering alla matrice di similarità: vengono individuati i due cluster più simili e unificati in un nuovo cluster per il quale si ridetermina il livello di similitudine con gli altri cluster, e così via, riducendo ad ogni passaggio la dimensione della matrice di similarità di uno. La diversità dei metodi agglomerativi sta nella determinazione della similarità del cluster “fusione” f (cluster unione di s e t) con un cluster generico k (tabella 5).

Tabella 5 Calcolo della similarità con i diversi metodi chemiometrici (65).

METODO	DETERMINAZIONE DELLA SIMILARITÀ
LEGAME MEDIO PESATO	$s_{kf} = 0.5 * (s_{ks} + s_{kt})$

LEGAME MEDIO NON PESATO	$s_{kf} = \frac{(n_s s_{ks} + n_t s_{kt})}{n_f}$
LEGAME SINGOLO	$s_{kf} = \max(s_{ks}, s_{kt})$
LEGAME COMPLETO	$s_{kf} = \min(s_{ks}, s_{kt})$
LEGAME TRA CENTROIDI	$s_{kf} = \frac{n_s s_{ks}}{n_f} + \frac{n_t s_{kt}}{n_f} + \frac{n_s n_t s_{st}}{n_f^2}$
LEGAME MEDIATO	$s_{kf} = 0.5 * (s_{ks} + s_{kt}) - 0.25 s_{st}$
METODO DI WARD	$s_{kf} = \frac{(n_s + n_k) s_{ks}}{n_f + n_k} + \frac{(n_t + n_k) s_{kt}}{n_f + n_k} - \frac{n_k s_{st}}{n_f + n_k}$

Nel metodo del legame singolo la distanza tra due cluster è uguale alla distanza più piccola tra due elementi, uno per ciascun cluster; in quello a legame completo è invece uguale alla distanza maggiore tra due elementi di ciascun cluster. Nei metodi con legame mediato, la distanza tra due cluster uniti e un cluster diverso è calcolata sulla base della distanza media del cluster da ciascuno dei due cluster già unificati. Questo metodo si diversifica in pesato e non pesato: nel legame medio pesato si dà pesi uguali a due cluster uniti nel calcolo della distanza da un terzo cluster (detto anche legame medio tra i gruppi), per quello non pesato si dà uguale peso agli elementi di un cluster quando si calcola la distanza tra due cluster (detto anche della media dentro i gruppi).

Il metodo dei centroidi, prevede il calcolo della distanza tra cluster come la distanza tra i centroidi di due cluster diversi, quelli con distanza inter-centroide minima vengono unificati, mentre nel metodo della mediana, una volta calcolata la mediana all'interno del gruppo, la distanza fra due gruppi è pari alla distanza fra le rispettive mediane.

Infine, il metodo di Ward si basa sulla perdita d'informazione, mediante l'uso di una misura simile alla varianza: la somma degli errori degli scarti quadratici E_T , o eterogeneità, corrisponde alla perdita di informazione, per cui ad ogni step si unificano cluster che hanno via via E_T sempre più piccola (65).

$$E_T = \sum_{k=1}^K E_k = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^{m_k} (x_{ijk} - \bar{x}_{jk})^2$$

Equazione 21 Espressione per il calcolo della somma degli errori degli scarti quadratici (65).

Il risultato dei vari metodi è un grafico, denominato dendrogramma (diagramma ad albero), che permette a livello visivo un'analisi gerarchica di similarità tra gli oggetti in esame. Ne è un esempio la figura 60.

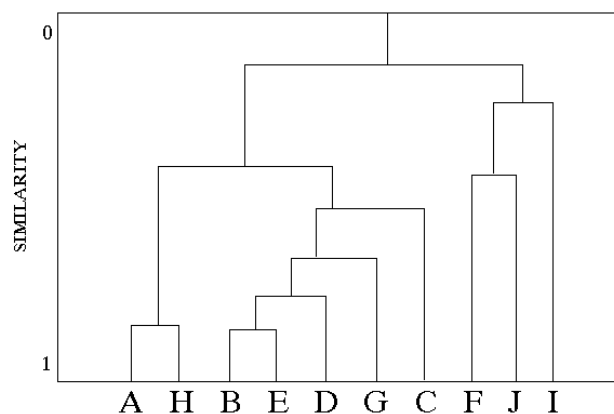


Figura 60 Dendrogramma in dipendenza della similarità (66).

In figura 60 si può facilmente individuare un primo cluster costituito dagli oggetti A e H, un secondo cluster, più abbondante, da B, E, D, G e C e, più dissimile dai precedenti, il cluster formato da F, J e I.

In ordinata vi è la similarità, variabile tra 0 e 1: la scelta del livello di similarità, del tutto soggettivo, permette l'individuazione di cluster differenti.

Se si considera un livello di similarità molto alto, gli oggetti B e E sono quelli più simili in assoluto in quanto nel dendrogramma (ma si può verificare anche matematicamente) si uniscono per primi.

Con dati sperimentali, è possibile confrontare metodi diversi e verificare, o meno, differenze nei risultati (si veda la figura 61).

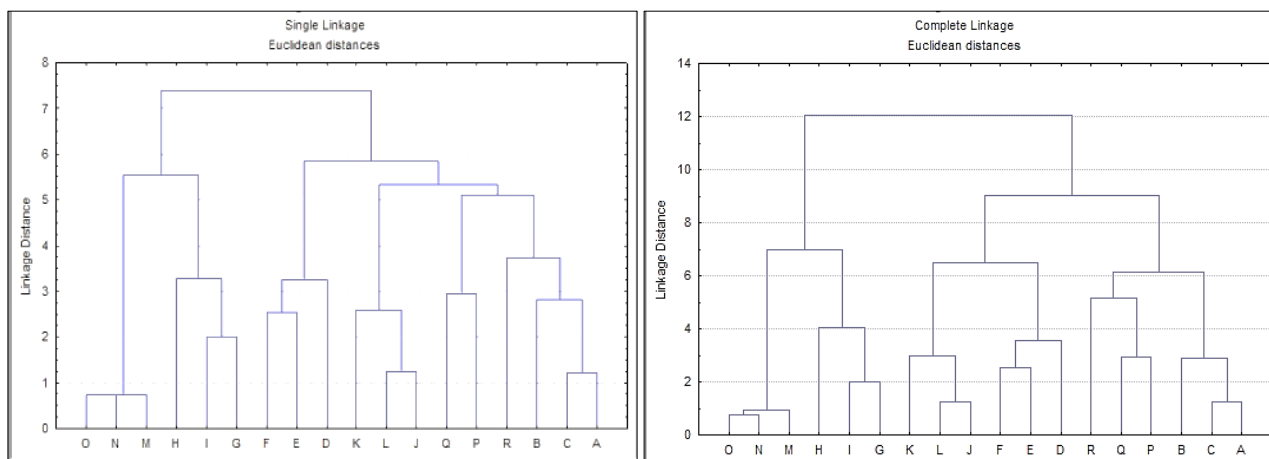


Figura 61 Esempi di cluster analysis.

Dall'esempio in figura 61 si possono trarre alcune considerazioni: in entrambe le elaborazioni i campioni G, H, I, M, N e O sono nettamente distinti dagli altri campioni; i campioni M, N e O sono i più simili tra loro mentre i due metodi si differenziano nella parte destra in cui, nel caso del metodo "complete linkage" A, B, C, P, Q e R si distinguono nettamente da D, F, E, K, J e L mentre con il metodo "single linkage" questa suddivisione non compare.

3.4.2 ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI (PCA)

L'analisi delle componenti principali è una tecnica di analisi multivariata proposta da Karl Pearson nel 1901 e migliorata fino alla forma attuale da Harold Hotelling nel 1933 (63) ed è probabilmente la più largamente utilizzata tra i metodi chemiometrici (66).

Attraverso l'uso di un modello matematico, una serie di variabili correlate, che descrivono il sistema in esame, vengono trasformate in nuove variabili, non correlate, dette componenti principali, o alternativamente, fattori o variabili latenti in base al metodo utilizzato (66).

Le componenti principali sono delle combinazioni lineari delle variabili originali e sono caratterizzate dal fatto di essere ortogonali tra loro.

La PCA fa parte di una famiglia di metodi che sfruttano la decomposizione della matrice di dati in fattori, variabili latenti, autovalori o componenti principali.

Anche per questo tipo di analisi statistica non è necessario conoscere a priori classi di composti presenti nei campioni, poiché è proprio questo uno degli obiettivi dell'analisi. È necessario però, che le variabili, o meglio i sistemi su cui esse vengono misurate, siano, anche in questo caso, quantomeno simili o di limitata diversità.

Con la PCA è possibile inoltre:

- valutare le correlazioni tra le variabili e la loro rilevanza

- visualizzare gli oggetti (oltre all'individuazione di classi è possibile individuare outliers)
- sintetizzare la descrizione dei dati (eliminazione del rumore o informazione spuria)
- ridurre la dimensionalità dei dati
- ricercare proprietà principali
- rappresentare dati in uno spazio ortogonale (63).

La PCA procede per step successivi: a partire dal baricentro dei punti di uno spazio multidimensionale, descritto dalle variabili originali normalizzate, si individua la direzione lungo la quale i dati sono maggiormente dispersi, dove vi è maggior informazione, e la si definisce come prima componente principale. Successivamente, tra le direzioni ortogonali ad essa, viene estratta una seconda componente principale, con maggior informazione rispetto alle altre. Si forma così un modello planare delle rette (componenti principali) rappresentative della matrice dei dati originali. Il processo potrebbe ancora procedere fino all'ottenimento di iperpiani, arrestandosi quando un criterio scelto sia soddisfatto, per esempio in questo lavoro di tesi si è considerato la frazione di varianza spiegata.

La varianza è la misura della dispersione dei dati attorno al valore atteso (66), che rappresenta la correlazione tra i dati raccolti; matematicamente è pari alla sommatoria dei quadrati degli scarti rispetto al valor vero μ , ciascuno pesato con la probabilità dell'evento.

$$\sigma_x^2 = \sum_i (x_i - \mu)^2 * p_x$$

Equazione 22 Espressione della varianza tra più variabili (66).

Il numero di componenti principali che si possono estrarre è uguale al numero di variabili originali e in ciascuna di essa viene raccolta la maggior informazione possibile da quelle originali. Di conseguenza, più le variabili originali sono correlate, più sarà elevato il loro grado di associazione e il peso su una o più componenti principali. Ad ogni componente è associata una varianza, riportata in valore relativo percentuale.

In questo caso perciò la prima componente principale corrisponde alla componente che spiega la massima varianza, mentre le successive rappresentano via via la frazione di varianza spiegata residua.

La somma di tutte le frazioni di varianza spiegata è uguale a 100%.

Solitamente, le componenti principali che contengono la quasi totalità dell'informazione utile sono le prime e in numero limitato: vi sono dei criteri che permettono di stabilire il livello ritenuto sufficiente perché l'analisi sia rappresentativa dei dati del sistema.

Un primo approccio, abbastanza arbitrario, potrebbe essere quello di fermarsi quando la varianza spiegata cumulativa (somma delle varianze relative delle prime componenti principali) supera una percentuale del 75-80%. In figura 62, sono rappresentati in tabella gli autovalori (eigenvalue), la corrispondente varianza e quella cumulativa, dimostrando che l'80% si raggiunge e supera considerando come significative le prime 4 componenti principali.

Eigenvalues of correlation matrix, and related statistics (Active variables only)				
Value number	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	111.3080	43.65021	111.3080	43.6502
2	53.1105	20.82764	164.4185	64.4779
3	31.5516	12.37319	195.9702	76.8510
4	20.5231	8.04828	216.4933	84.8993
5	11.8599	4.65096	228.3532	89.5503
6	8.2597	3.23910	236.6129	92.7894
7	5.9638	2.33873	242.5767	95.1281
8	2.5371	0.99494	245.1138	96.1231
9	2.2592	0.88597	247.3730	97.0090
10	1.5478	0.60699	248.9208	97.6160
11	1.1895	0.46647	250.1103	98.0825
12	0.9928	0.38935	251.1032	98.4718
13	0.8757	0.34342	251.9789	98.8153
14	0.5917	0.23204	252.5706	99.0473
15	0.5159	0.20233	253.0865	99.2496
16	0.3860	0.15136	253.4725	99.4010
17	0.3567	0.13989	253.8292	99.5409

Figura 62 Tabella degli autovalori delle componenti principali.

Un metodo meno arbitrario è costituito dai diagrammi a pendio (screen plot) come in figura 63.

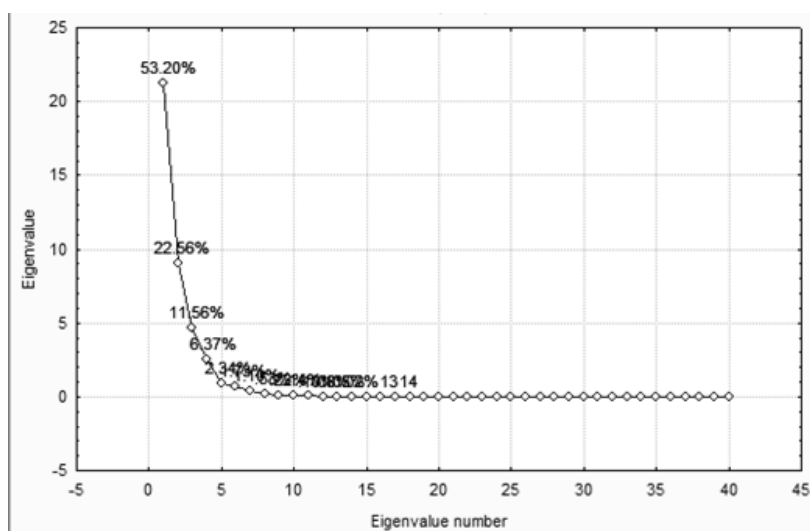


Figura 63 Diagramma a pendio delle componenti principali.

In questo grafico sono rappresentate, in ogni punto, le componenti principali, con la relativa varianza spiegata percentuale: in ascissa sono rappresentati i numeri delle componenti principali e in ordinata gli autovalori ossia la varianza spiegata associata a ciascun autovettore (componente principale). All'inizio si ha un lento declino della pendenza della tangente ai punti, per poi variare rapidamente fino ad un plateau, giustificato con il rumore di fondo sperimentale: si considera come ultima componente significativa, quella rappresentata dal punto in cui la tangente non cambia più drasticamente la sua pendenza.

Per eliminare il disturbo di fondo è possibile visualizzare lo stesso diagramma con il logaritmo degli autovalori, dove la tangente e il punto in cui la sua pendenza non varia più in modo significativo è di più facile visualizzazione.

Dopo le opportune scelte, il risultato, mostrato in figura 64, è il plot tra la prima e la seconda componente e nel secondo grafico, la prima componente contro la terza, degli stessi dati: si riescono a distinguere classi diverse di composti.

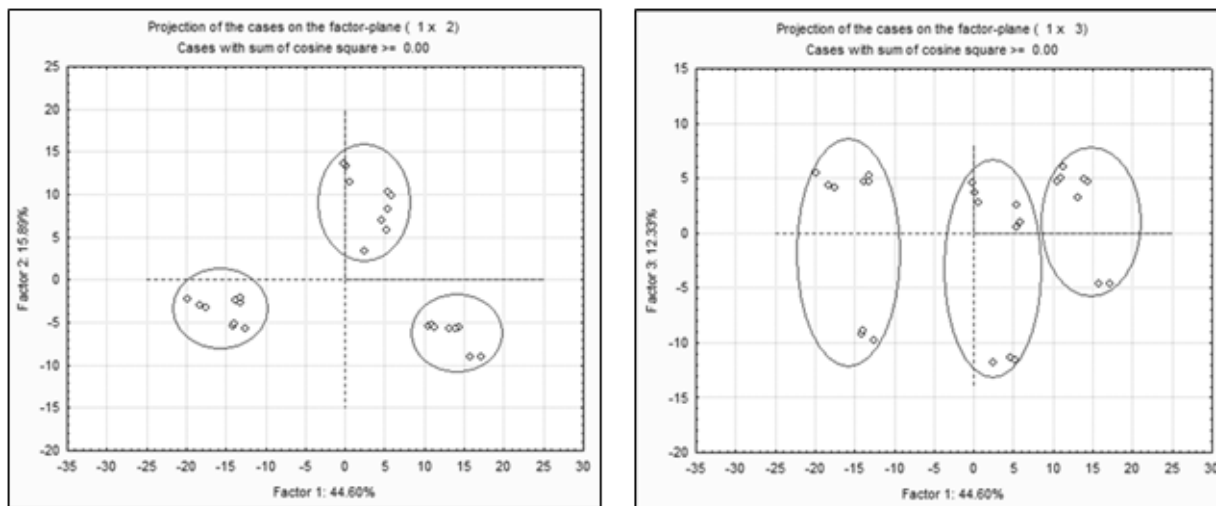


Figura 64 Esempi di PCA con le prime tre componenti principali.

I diagrammi ottenibili dal software sono numerosi: si possono introdurre i concetti di loadings e di scores. La matrice dei loadings è la matrice le cui colonne rappresentano gli autovettori della matrice di covarianza o correlazione: poiché le righe rappresentano le variabili originali, selezionando un autovettore, in ciascuna riga vi è il coefficiente numerico che rappresenta l'importanza di quella variabile in quell'autovettore. Se il valore numerico si avvicina a 1, in valore assoluto, significa che quella componente principale sarà maggiormente rappresentata da quella variabile; se 0, avrà scarso significato per quella componente: la tabella ottenuta è mostrata in figura 65.

Mentre in figura 66 si mostra un esempio di loading plot (diagramma di dispersione delle variabili sulle componenti principali): si tratta di un grafico bidimensionale in cui le componenti presenti sono scelte arbitrariamente e che, in base al software utilizzato, assumono nomi diversi, in questo caso fattori.

Le variabili poste vicino all'origine degli assi, cioè quelle con poco significato per entrambe le componenti, sono in numero molto ridotto; molte invece sono le variabili poste agli estremi dell'asse delle ascisse (valore, in modulo, vicino a 1), che avranno molto peso per la prima componente .

Variable	Factor coordinates of the variables, based on correlations (dati neg)											
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9	Factor 10	Factor 11	Factor 12
105	-0.649031	-0.590352	0.141442	-0.237989	0.327179	0.004889	-0.071729	0.052695	-0.025187	-0.035023	-0.057949	0.064192
131	0.108066	0.238175	-0.265415	0.292590	-0.560387	-0.179956	0.496128	-0.028525	0.228006	0.032751	-0.039568	-0.048625
140	0.663299	0.494682	0.242202	0.474348	0.137823	0.020803	-0.021125	0.079095	-0.015963	0.026271	0.017120	0.018465
183	-0.906735	-0.191018	0.088579	0.245334	-0.195488	0.005019	-0.061790	0.103122	-0.065368	-0.063981	-0.020450	0.020708
202	-0.902963	0.020565	-0.099675	0.162410	-0.216127	0.086519	-0.066176	-0.050055	-0.133717	-0.021777	-0.045193	-0.101081
235	-0.707040	0.410509	-0.440822	0.226458	0.047466	0.146758	-0.139814	-0.057392	0.066035	-0.016302	0.046296	0.044186
272	0.801546	-0.496088	-0.270523	0.165270	-0.002023	0.020702	0.005250	-0.006968	0.034213	0.058666	0.032259	-0.051145
315	-0.805857	0.512002	-0.103429	-0.101396	-0.188430	-0.012976	-0.155760	-0.028881	0.004893	-0.054709	-0.036231	0.019044
329	-0.874420	-0.416002	0.144231	-0.077168	0.133930	0.036009	-0.098705	-0.043621	0.030614	-0.009445	-0.032128	-0.008204
341	-0.301425	0.851322	-0.116945	0.084605	-0.071246	0.095921	-0.364722	-0.118576	-0.003462	-0.016207	0.002371	-0.014424
415	-0.757059	0.112240	-0.505063	0.166555	-0.268049	-0.032887	0.167646	0.126323	0.007427	-0.054263	-0.012414	0.079881
422	-0.077925	0.785816	0.369143	0.340073	0.170094	0.258006	-0.139222	-0.011409	-0.005601	0.022807	0.032120	0.028140
436	0.808219	-0.497917	-0.270965	0.076495	-0.020336	0.109827	0.027611	-0.041698	0.041689	0.025646	0.015926	-0.026730
450	-0.838939	-0.142127	-0.222879	0.241135	-0.257245	0.259576	-0.077367	0.079240	-0.062405	-0.077308	-0.006140	0.047954
492	-0.383249	-0.519510	-0.385140	0.387908	-0.336319	0.224472	0.276111	0.146646	-0.015522	-0.023409	-0.027192	0.103494
514	-0.745985	0.592815	-0.250381	-0.108706	-0.039530	-0.033575	-0.070075	0.029735	0.030447	-0.071893	-0.024009	0.011256
549	0.807641	-0.428628	-0.326748	0.201693	0.028453	-0.018209	0.070769	0.057435	0.026399	0.056757	0.028140	-0.020811
545	-0.849774	-0.199239	0.258014	-0.065228	-0.375469	-0.016981	-0.085744	0.054771	-0.073736	-0.017663	-0.053104	0.056753
565	-0.299267	0.604494	-0.625234	-0.156714	-0.241272	-0.183128	0.014455	-0.092232	0.033900	-0.003493	0.105750	-0.080574

Figura 65 Importanza dei loadings per una determinata componente.

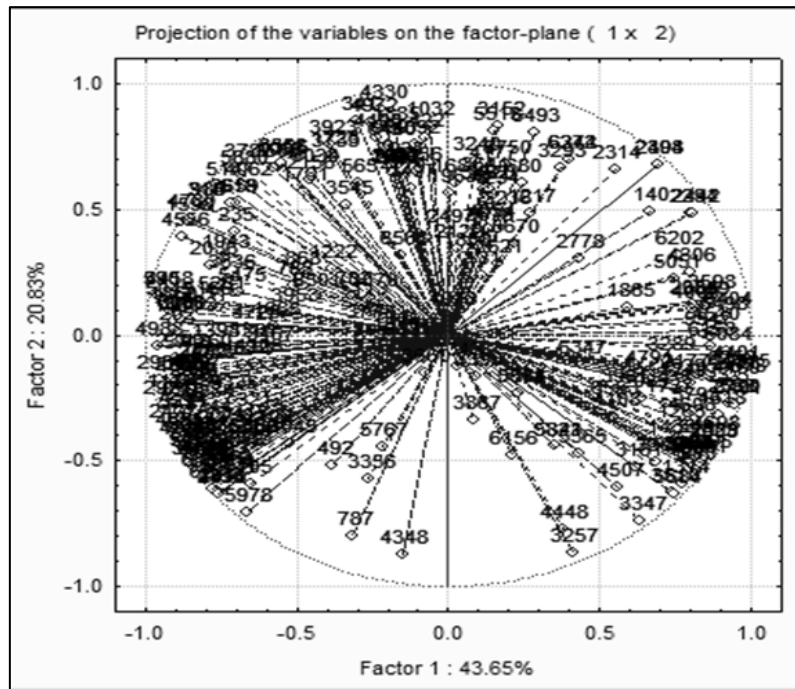


Figura 66 Diagramma di dispersione delle variabili sulle componenti principali.

Gli scores invece sono il risultato di una combinazione lineare tra le variabili originali e, come coefficienti di combinazione, i loadings di quella componente.

Gli scores assumono valori numerici qualsiasi ma con valor medio pari a 0 e rappresentano le nuove coordinate degli oggetti di studio nello spazio delle componenti principali, solitamente due, ottenendo un grafico bidimensionale.

Lo score plot (diagramma di dispersione dei campioni) ottenuto, permette di analizzare il comportamento degli oggetti lungo le componenti principali e le loro eventuali similarità.

Allo stesso modo del loading plot (variabili nello spazio), si possono individuare gruppi, outliers, regolarità, distribuzioni degli oggetti nello spazio e peso relativo degli stessi su una determinata componente (figura 67).

Case	Factor coordinates of cases, based on correlations (dati neg)												
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9	Factor 10	Factor 11	Factor 12	Factor 13
Rolc1	12.6738	-7.13670	-2.65031	5.43210	0.68214	-3.34420	-1.79978	2.07894	2.04511	0.09837	1.60652	-0.51509	0.72762
Rolc2	13.0352	-6.44540	-3.19828	5.96314	0.60748	-3.83147	-0.87488	1.33672	-1.25537	2.30404	0.01105	-0.39770	0.81337
Rolc3	14.0178	-6.97226	-3.11320	7.36937	1.06983	-4.12227	0.23569	-1.59427	-1.37122	-2.42687	-1.69325	0.71538	-1.53626
Rolccr1	0.1892	7.47181	3.83267	4.30182	4.14757	2.57249	1.70509	2.01815	2.35908	-0.02548	0.02749	1.77551	-0.93583
Rolccr2	-0.5032	7.77986	4.60292	5.28451	4.10743	2.07106	2.69024	0.99667	1.35196	1.33383	-0.08461	0.52266	-0.32512
Rolccr3	-0.4561	7.26271	4.38167	5.50732	4.56618	2.50352	4.29777	-1.43961	-3.44957	-0.69031	0.17396	-1.67729	1.24054
Rolcldr1	-4.4836	8.49561	-5.52941	2.19274	0.32164	1.34539	-4.04004	-1.12906	-0.53775	-0.94962	1.20784	0.04623	-0.27468
Rolcldr2	-4.5162	8.83370	-5.62082	2.92484	0.02586	0.96053	-3.89272	-3.00666	2.37997	0.60415	-1.52828	-0.25536	1.77130
Rolcldr3	-3.7684	8.09096	-6.46236	0.34026	-0.17422	2.91178	-4.81852	0.97210	-1.58606	0.07265	0.60245	-0.45586	-1.68560
Rolcter1	-18.0586	-8.59560	1.67119	5.39265	-5.68704	0.17598	2.47217	-2.31937	0.92580	1.05542	1.97555	-1.09663	-1.45014
Rolcter2	-14.6178	-7.79107	-0.58381	1.38073	-3.29924	3.25157	-1.08515	3.11610	-2.61267	-0.68721	-0.34771	1.32687	1.41144
Rolcter3	-16.6102	-8.36695	0.44215	3.47459	-5.07251	1.52362	0.98025	0.52499	1.25564	-0.63498	-1.83822	0.17932	0.35107
Wtcr1	5.8426	4.78384	12.38616	-2.31516	-2.96688	-1.28983	-1.51050	1.47905	1.70927	-2.91559	0.02808	-1.96656	0.43156
Wtcr2	5.0726	4.12098	11.57728	-1.86327	-3.71850	-2.84353	-1.40020	-2.22674	-1.00631	1.76516	0.33791	1.75439	0.76289
Wtcr3	5.1984	4.41194	9.88741	-3.10002	-3.05159	-0.75281	-2.19730	0.60738	-1.51399	0.98377	-0.68645	0.09177	-1.29334
Wtidr1	-2.1897	7.59440	-6.63835	-4.68067	-1.99378	-2.73568	2.82052	0.95962	-0.38025	0.11462	-0.19029	0.00337	-0.39877
Wtidr2	-2.4131	7.49187	-6.64060	-4.60990	-1.90587	-3.04257	2.82603	0.87604	-0.14941	0.02923	0.87047	0.13566	0.71922
Wtidr3	-2.3389	7.89899	-6.39191	-4.04623	-2.32922	-3.60720	3.28135	0.05656	0.44734	-0.43918	-0.64189	0.15089	-0.12636
Wttermico	-11.1677	-7.33834	1.64571	-5.01794	5.23036	-2.03886	-0.58661	-0.44389	0.10663	0.76108	-0.22386	-0.70727	-0.20136

Figura 67 Importanza degli score per una determinata componente.

4. Risultati e discussioni

4.1 Verifica intensità di segnale standard interno

Prima di cominciare l'analisi metabolomica, è stata verificata l'intensità di segnale dello standard interno nei campioni, con l'obiettivo di verificare la ripetibilità e la confrontabilità dei campioni. Il mantenimento di una intensità di segnale confrontabile nei diversi campioni e delle repliche effettuate, è una garanzia della ripetibilità del processo di trattamento del campione effettuato; pur non essendo lo standard interno rappresentativo per ogni classe di campioni analizzata, si è scelto di aggiungere una sola sostanza per non introdurre ulteriore complessità negli spettri di massa, con il rischio di coeluizione con altri metaboliti presenti nelle piante. L'utilizzo di un solo standard interno, come consigliato da De Vos et al., (2007) (36) viene considerato comunque una garanzia di un corretto svolgimento della procedura di trattamento del campione. Dalle verifiche sperimentali risulta che l'acido salicilico ionizza molto bene in negativo, perciò si sono misurate le intensità di segnale del fitormone con massa 143.0445 che eluisce a un tempo di ritenzione di circa 17.5 minuti.

Nella tabella in appendice III sono presenti i dati ottenuti nei campioni analizzati e nei bianchi in modalità di ionizzazione negativa, con i tempi di ritenzione e le masse esatte sperimentali dei singoli campioni.

Dall'analisi dei dati si nota la presenza di un campione non omogeneo con i restanti dati: il campione NIGR1 che, sulla base di questa rilevazione e di altre considerazioni spiegate successivamente, è stato escluso dall'elaborazione dei dati.

Nella figura 68, invece, si presenta un grafico che visivamente permette di valutare l'andamento dell'intensità di segnale dell'acido salicilico marcato nei campioni medi delle varie modificazioni e stress e nei bianchi.

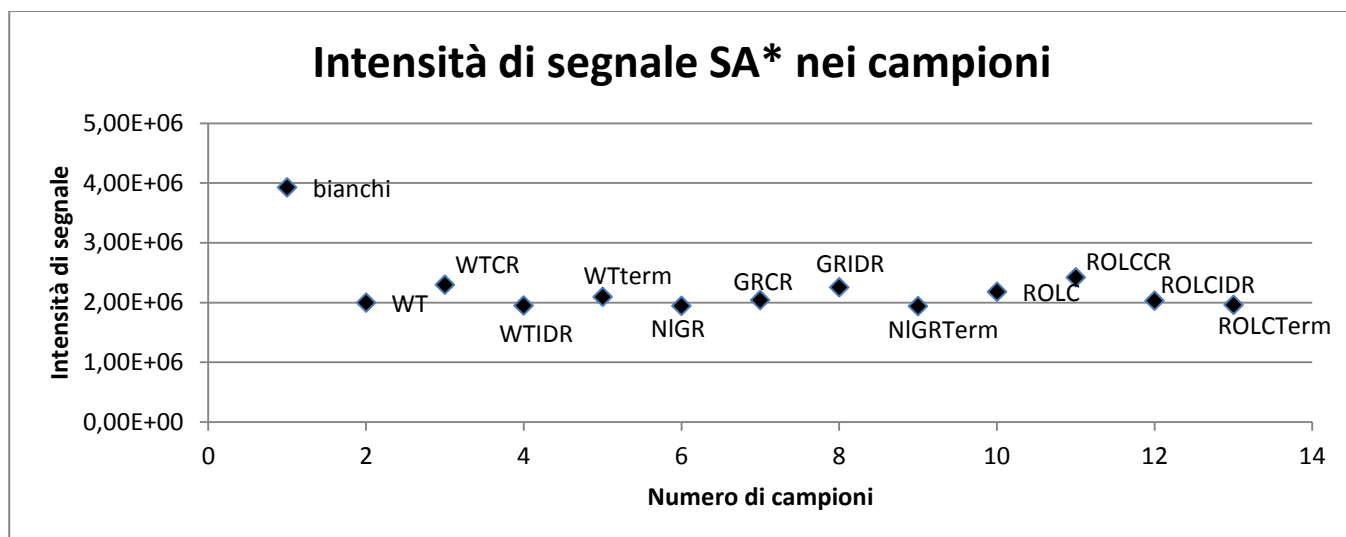


Figura 68 Controllo intensità di segnale standard interno nei campioni analizzati in modalità negativa.

In figura 68 si può notare come l'intensità di segnale di acido salicilico marcato nei campioni sia pressoché stabile attorno ad un livello di $2 \cdot 10^6$.

La concentrazione media di acido salicilico nei bianchi è $4 \cdot 10^6$, il doppio di quella nei campioni: il dato può essere giustificato dalla soppressione del segnale dovuta alla complessa matrice biologica dei campioni di *Nicotiana L.* che manca nei bianchi. In matrice solitamente sono presenti specie ioniche (elettroliti inorganici e sali), composti molto polari come fenoli o pigmenti, molecole organiche come carboidrati, ammine, urea, lipidi e peptidi in alte concentrazioni.

La soppressione del segnale è legata strettamente alla soppressione della ionizzazione in sorgente: la causa è l'alta concentrazione di composti non volatili presenti nello spray prodotto, che intrappolando gli analiti sotto forma di sali come fosfati o solfati, riducono la loro ionizzazione. Da dati di letteratura si ipotizza che il meccanismo di soppressione della ionizzazione sia legato all'aumento di viscosità e tensione superficiale delle gocce prodotte nell'elettrospray, fattori che riducono la capacità degli analiti di ridursi a fase gassosa (67).

In linea generale si può vedere come l'intensità di segnale dell'acido salicilico marcato, in media, sia meno soppresso in campioni modificati per rol C, probabilmente a causa del minor effetto che la modificazione genetica apporta in piante di *Nicotiana*. Inoltre è possibile notare come in campioni sottoposti a stress chimico, il livello sia maggiore rispetto alle altre condizioni.

4.2 Considerazioni generali

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati 12 campioni di *Nicotiana Langsdorffii*, le cui misure sono state replicate tre volte, tre campioni di controllo (mix) e tre bianchi.

Dalla fase di elaborazione dei dati sono state ottenute complessivamente 335 molecole rilevate attraverso l'analisi in modalità di ionizzazione negativa e 361 dall'analisi in polarità positiva, per un totale di 696 molecole.

Nonostante non sia stato possibile identificarle tutte, per mancanza di informazioni sullo spettro di frammentazione o per assenza di sufficiente letteratura, tutti i metaboliti sono stati utilizzati per l'analisi statistica; per ridurre la dimensionalità dei dati, estrarre l'informazione più significativa e meglio visualizzare i risultati, sono state effettuate l'analisi delle componenti principali e la cluster analysis, sia per la polarità positiva che negativa; i dati sono stati poi raggruppati per ottenere un'analisi complessiva. Per quanto riguarda le PCA effettuate, sono state valutate le prime tre componenti principali ossia quelle con maggior varianza spiegata, che sono risultate sufficienti a evidenziare le correlazioni tra i dati.

Dai loading plot e dalla verifica manuale dei costituenti più abbondanti nelle diverse tipologie di campioni, sono stati ricavati i metaboliti più caratterizzanti per ciascun tipo di stress applicato e per ciascuna modificazione genetica.

Il processamento dei cromatogrammi è stato effettuato in due fasi separate: in prima battuta si è proceduto all'identificazione dei metaboliti a media/bassa polarità, presenti nella parte centrale e finale del cromatogramma. Successivamente si è deciso di identificare anche i metaboliti presenti nei primi minuti dell'analisi cromatografica, per la maggior parte metaboliti primari o molecole a basso peso molecolare.

Le tabelle riassuntive, comprendenti le masse identificate, il tempo di ritenzione, la formula molecolare, la frammentazione della molecola e il livello di identificazione sono riportate in appendice I.

In questo capitolo, invece, i risultati ottenuti sono presentati sotto forma di istogrammi in cui è possibile verificare le variazioni di intensità dei diversi composti, identificati a seconda degli stress o delle modificazioni subite.

È necessario ricordare inoltre che, dall'analisi dei dati estratti mediante PCA per lo stress idrico, per la ionizzazione positiva, non si è potuto ottenere alcun dato significativo: la presenza di polietilen glicole (PEG6000), utilizzato per simulare lo stress idrico nella pianta, non ha permesso l'identificazione di nessun altro analita durante la separazione cromatografica in un ampio intervallo di tempo.

È stata inoltre effettuata una ricerca di fitormoni e molecole considerate di rilievo in risposta agli stress subiti dalle piante. Anche in questo caso, grafici e discussioni sono presentati nei capitoli seguenti, mentre i dati di intensità di segnale raccolti in ciascun campione, sono raggruppati in appendice II.

Dall'analisi fatta si evidenzia la presenza di un outlier: il campione NIGR1 si scosta nettamente dalle repliche dello stesso campione. Tale conclusione non era evidente dall'analisi delle componenti principali sopra descritte.

Se si analizzano i dati con ionizzazione negativa separatamente da quella positiva, si possono effettuare ulteriori osservazioni.

Analizzando i dati ricavati in modalità di ionizzazione negativa (figura 72) si possono distinguere nettamente diversi gruppi di campioni.

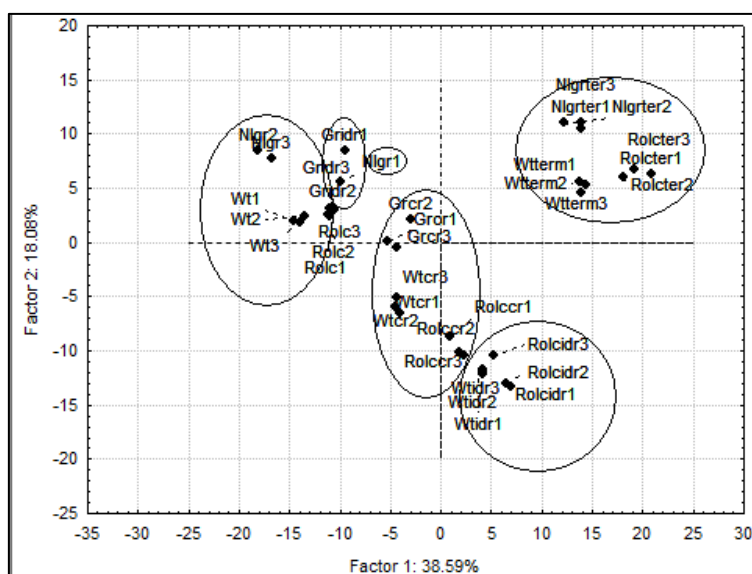


Figura 72 PCA dati negativi, prima e seconda componente (score plot).

Come visto nei dati precedentemente analizzati, i campioni stressati termicamente sono nettamente distanziati dal resto dei campioni: in questo caso è stato possibile estrarre i loading delle variabili (> 0.5 in prima e seconda componente) e identificare i metaboliti maggiormente significativi per lo stress termico, operazione descritta nel paragrafo 3.4.2.

Anche in questa analisi, come per la ionizzazione negativa e positiva insieme, i campioni non stressati risultano molto simili e ben raggruppati (si riveda la figura 69), come pure quelli stressati chimicamente. In questa PCA si mostra in maniera evidente la presenza del campione NIGR1 come estraneo alle repliche dello stesso campione e i campioni GRidr raggruppati ma separati dai restanti campioni sottoposti a stress idrico.

Inoltre è possibile ottenere una varianza spiegata maggiore rispetto ai dati insieme e in questo caso si raggiunge una percentuale di 56.7%.

Anche per quest'analisi dati, osservando la PCA ottenuta tra la prima e la terza componente principale si verifica una netta separazione dei campioni di *Nicotiana L.* modificati per il gene GR.

Le altre componenti principali non aggiungono informazione utile agli scopi di questo lavoro di tesi.

In tutte le analisi e discussioni successive per la ionizzazione negativa, per i motivi già enunciati, il campione NIGR1 non è presente.

Segue il grafico dell'analisi dei cluster ottenuta dai dati negativi, in cui è escluso il campione NIGR1, con il metodo di clustering Complete linkage.

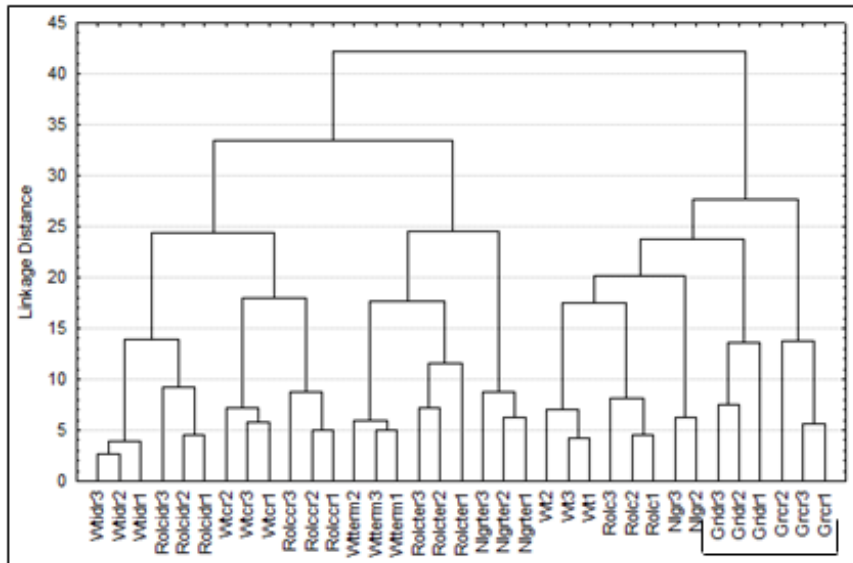


Figura 73 Cluster analysis, dati negativi (senza NIGR1), metodo Complete Linkage.

Con entrambi i metodi, risulta evidente la separazione dei campioni GRCR e GRIdrico rispetto ai corrispondenti gruppi formati dalle suddivisioni per stress: stress idrico e chimico formano cluster ben distinti. Tutti i campioni sottoposti a stress termico si raggruppano e si scostano nettamente dagli altri campioni (anche per la modificazione per il gene GR).

Le medesime analisi statistiche sono state realizzate per i dati ottenuti da ionizzazione positiva, ottenendo risultati simili e comparabili: con la prima e seconda componente principale si distinguono in modo netto gli stress subiti dalle piante wild e geneticamente modificate (figura 74), mentre con la prima e terza, come evidenziato dai colori, si possono isolare i tratti tipici delle piante modificate per il gene GR (figura 75).

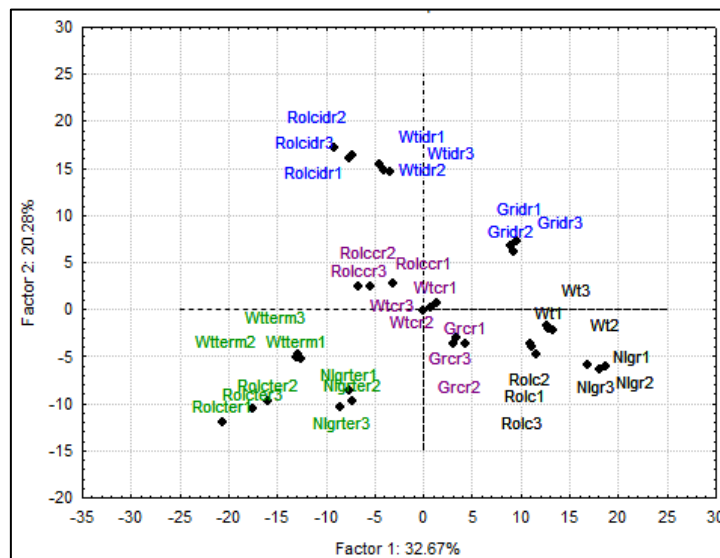


Figura 74 PCA, dati positivi, prima e seconda componente principale.

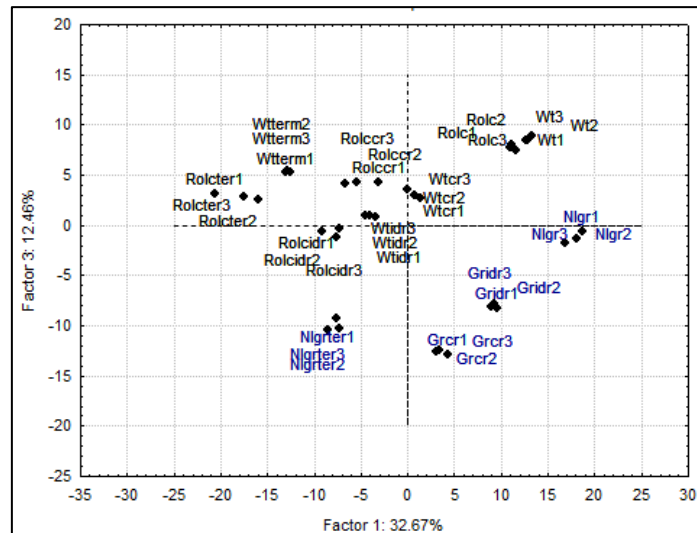


Figura 75 PCA dati positivi, prima e terza componente.

La varianza totale spiegata con le prime due componenti è 52.95%, minore rispetto è quella spiegata con l'analisi dei dati in ionizzazione negativa.

Nelle figure 76 e 77, sono rappresentate le analisi dei cluster ottenuti con due metodi statistici differenti. Con il metodo Complete linkage (figura 76), vi sono nette suddivisioni per stress, senza alcuna eccezione e non si evidenzia la distanza tra i campioni NLGR e NLGR1, escluso dalle elaborazioni in ionizzazione negativa.

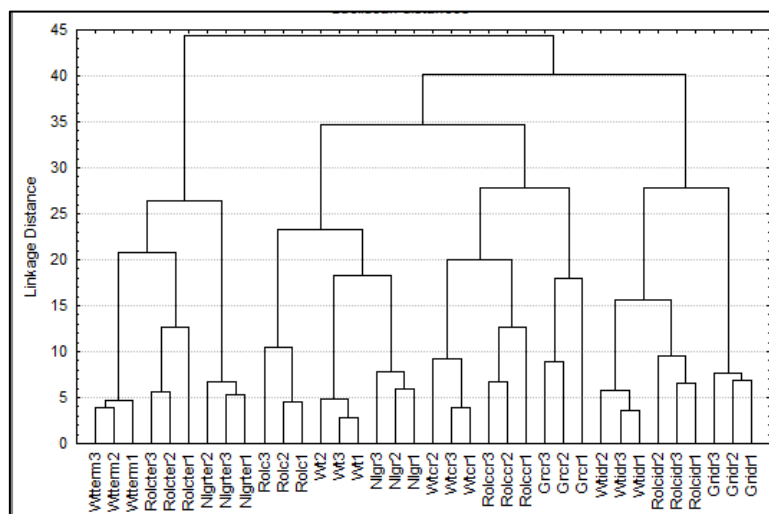


Figura 76 Cluster analysis, dati positivi, metodo Complete Linkage.

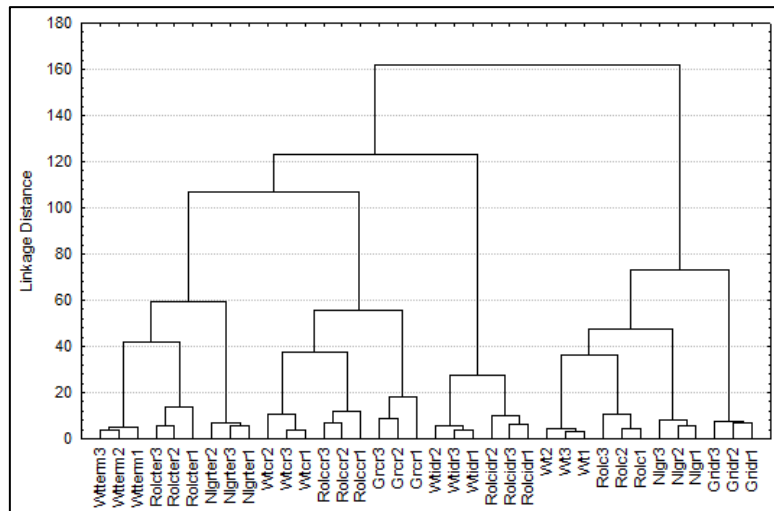


Figura 77 Cluster analysis, dati positivi, metodo di Ward.

L'analisi con il metodo di Ward, invece, mostra come campioni di piante naturali e modificate rol C siano molto più simili rispetto ai campioni modificati per il gene GR, in particolare quello stressato idricamente che si allontana molto dai campioni sottoposti al medesimo stress.

In quest'ultima analisi si nota anche come la distanza di legame sia lievemente maggiore rispetto a quella registrata nelle analisi precedenti con lo stesso metodo. Ricorrendo alle basi teoriche, la distanza è un parametro inverso rispetto alla similarità e per questo, i campioni analizzati con ionizzazione positiva dovrebbero essere maggiormente differenti tra loro rispetto a quella negativa.

4.4 Identificazione dei metaboliti

Il lavoro di identificazione dei metaboliti presenti nei campioni analizzati è sicuramente complesso e lungo. I criteri di identificazione sono legati al protocollo citato per l'analisi metabolomica e riguardano vari ambiti: si devono considerare i parametri chimico-fisici della matrice e dei possibili analiti di quel campione, l'analisi di formule brute, errori di massa e cariche per gli ioni creati, la frammentazione di massa che gli analiti mostrano quando vi è energia sufficiente perché essa avvenga, il confronto con testi di letteratura.

I risultati ottenuti, mediante le tecniche di suddivisione, ricerca e selezione descritte nel capitolo 3, sono presentati nelle pagine seguenti. In essi vi sono le molecole identificate, con il corrispondente nome IUPAC, raccolte in istogrammi che rappresentano le diverse intensità di ogni analita nei differenti campioni.

In questo modo è stato possibile contribuire alla caratterizzazione dei campioni di *Nicotiana L. wild*, geneticamente modificati e/o stressati.

L'intensità di segnale dei diversi tipi di pianta sono rappresentati da colori differenti, presenti nella legenda a destra in ogni figura. In ordinata vi è l'intensità di segnale ricavata per ogni massa dalle analisi precedenti e in ascissa i nomi delle molecole identificate. Con il termine "non identificato" sono indicate in ascissa le molecole a cui non è stato possibile associare una molecola o una formula bruta plausibile.

Molte delle molecole identificate, sulla base delle frammentazioni di massa presenti nei data dependent effettuati sui campioni mix, si presentano sotto forma di addotti: acido formico e sodio sono elementi che formano facilmente addotti rispettivamente in ionizzazione negativa e positiva.

Inoltre si ricorda che la prima parte dei dati del cromatogramma è stata analizzata separatamente dai restanti dati in quanto, per il solvente e il tipo di corsa e colonna cromatografica utilizzati, presenta molecole molto polari e quindi con caratteristiche di eluizione differenti dagli altri analiti.

In figura 78 sono presenti gli analiti individuati, con ionizzazione negativa, nei primi minuti della corsa cromatografica, in figura 79 la suddivisione per modificazione genetica, 80 per stress su diverse modificazioni genetiche, nella figura 81 una suddivisione che riguarda lo stress termico in ciascuna modificazione genetica e in figura 82 gli analiti ricavati dall'analisi dei loadings significativi dell'analisi delle componenti principali prima visualizzate. L'attenzione rivolta allo stress termico è dovuta alle notevoli differenze rispetto agli altri campioni.

Per la ionizzazione positiva, la figura 83 si mostrano gli analiti individuati nella prima parte del cromatogramma, in figura 84 la suddivisione per stress, 85 per modificazione genetica e la figura 86 mostra gli analiti che differiscono nelle diverse repliche di tutti i tipi di campione.

In appendice I sono riassunti i metaboliti identificati, ordinati per valore di massa crescente, accompagnati dai valori di massa, formula, errore di massa e frammenti.

Sulla base dei criteri di identificazione citati nel paragrafo 2.3.5, è presente in tabella anche una colonna relativa al livello di identificazione (l.i.): in assenza di standard interni, il livello di maggior confidenza nell'assegnazione di un nome alla molecola è il l.i.=2.

IONIZZAZIONE NEGATIVA

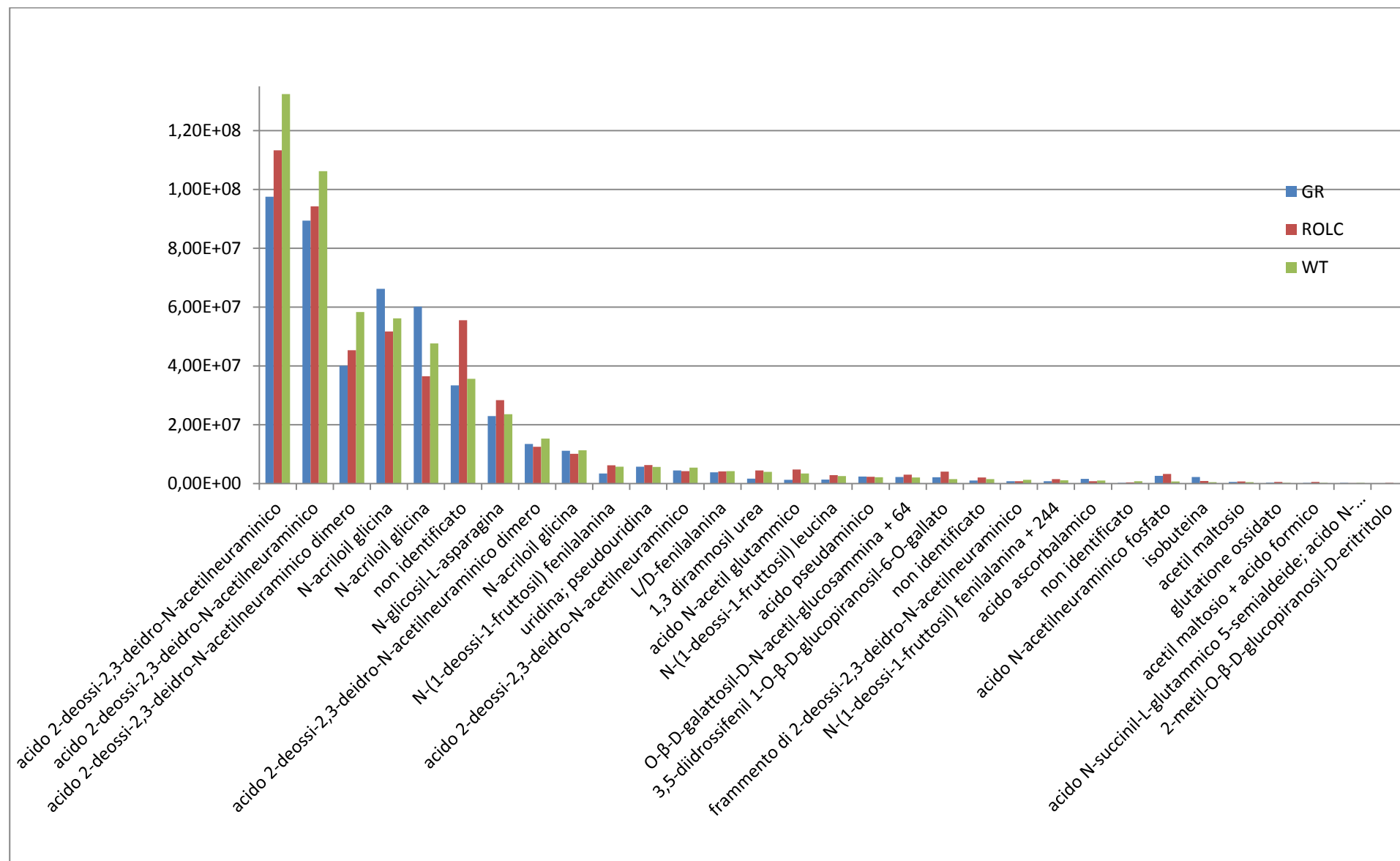


Figura 78 Metaboliti identificati in ionizzazione negativa, frazione iniziale del cromatogramma.

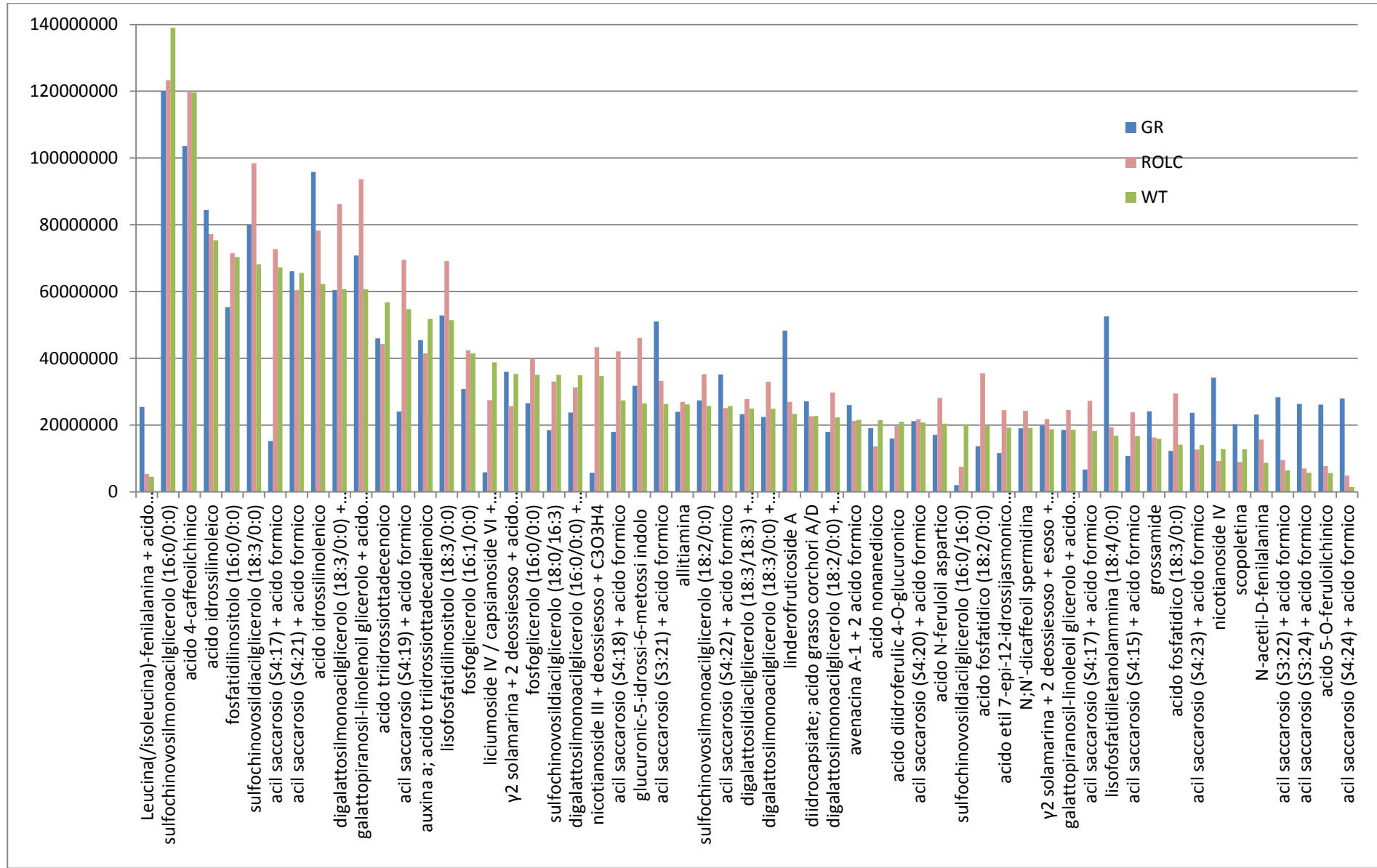


Figura 79 Metaboliti identificati in ionizzazione negativa, suddivisione per modificazioni genetiche.

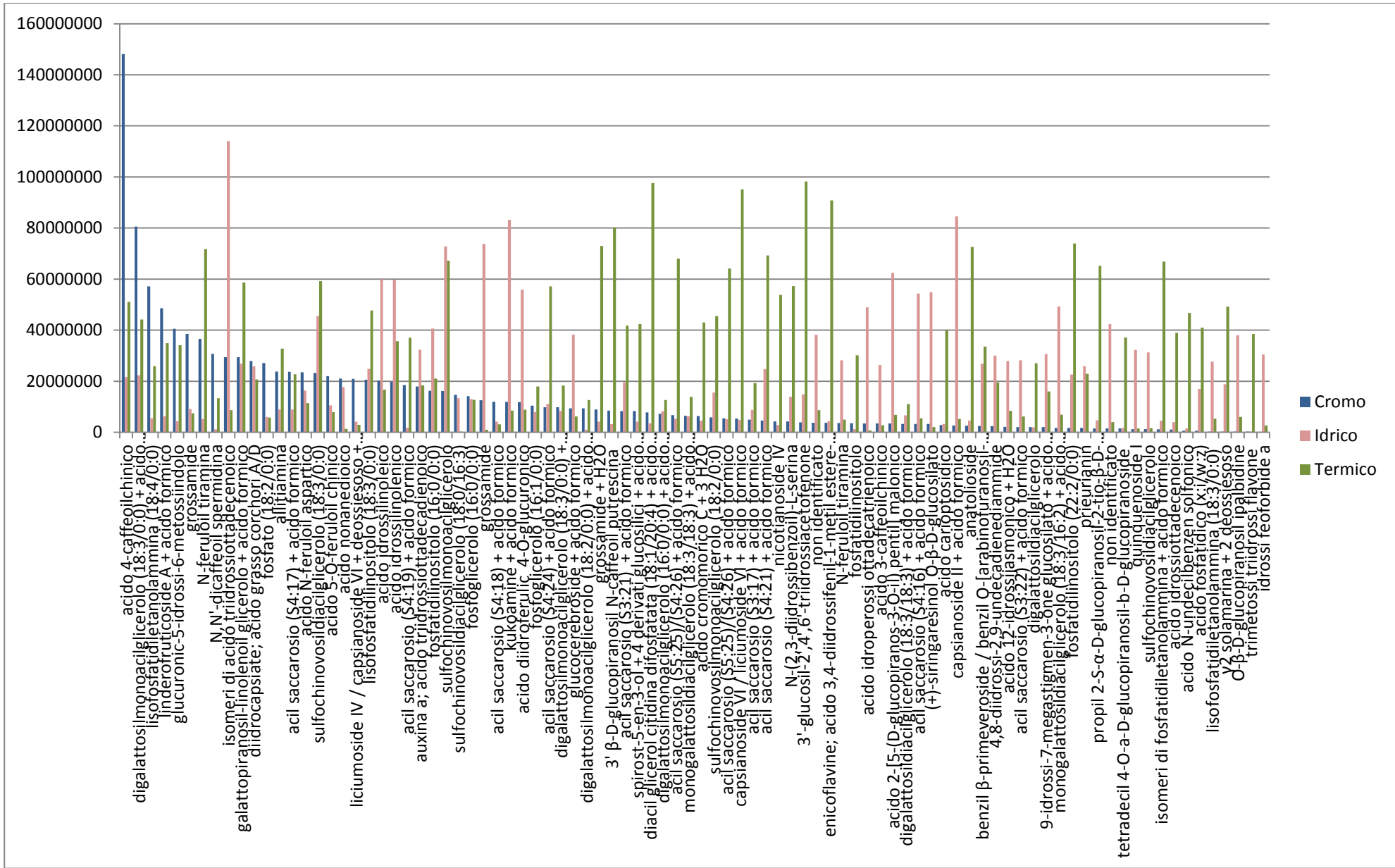


Figura 80 Metaboliti identificati in ionizzazione negativa, suddivisione per stress.

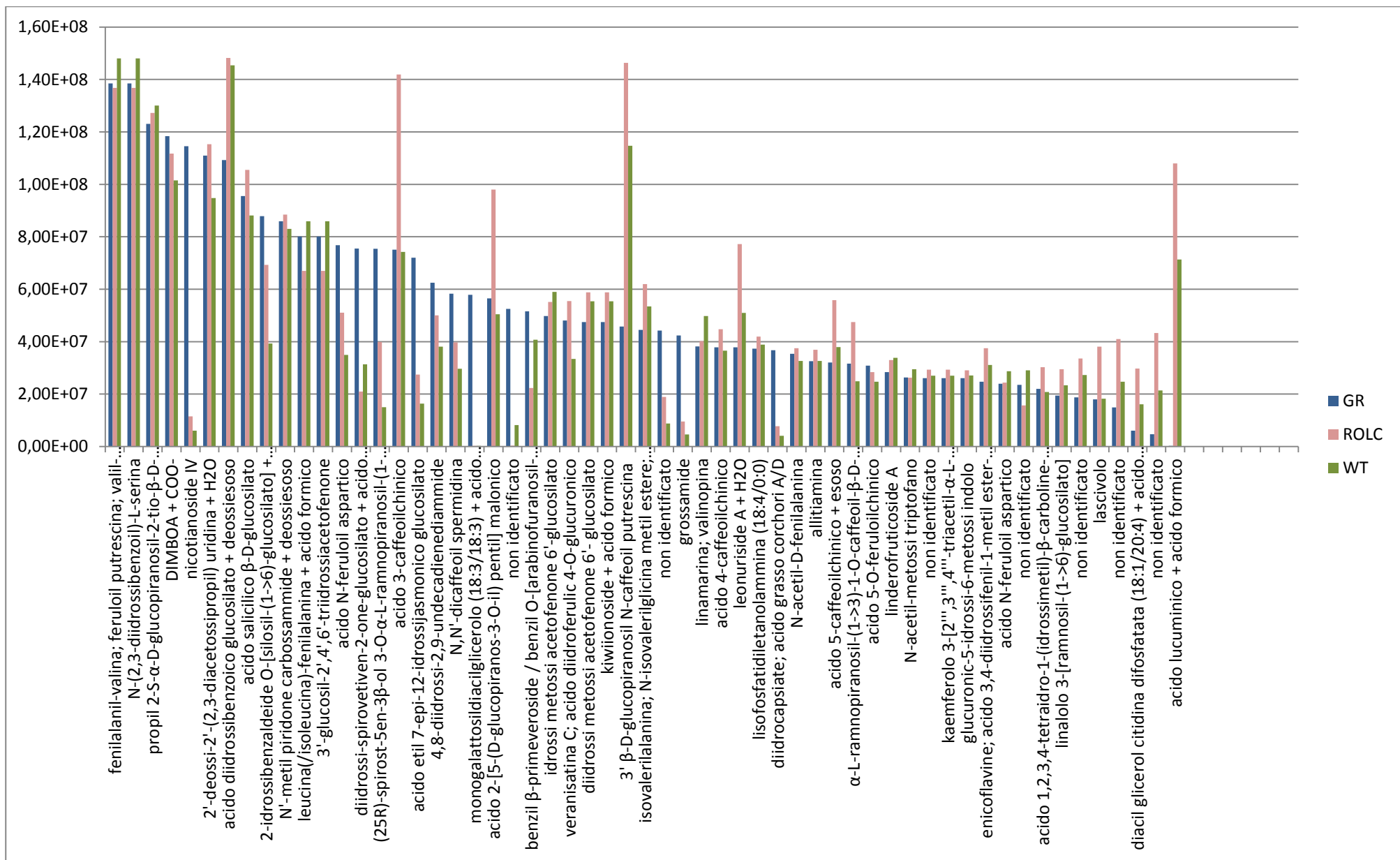


Figura 81 Metaboliti identificati in ionizzazione negativa, suddivisione per stress termico in ciascuna modificazione genetica.

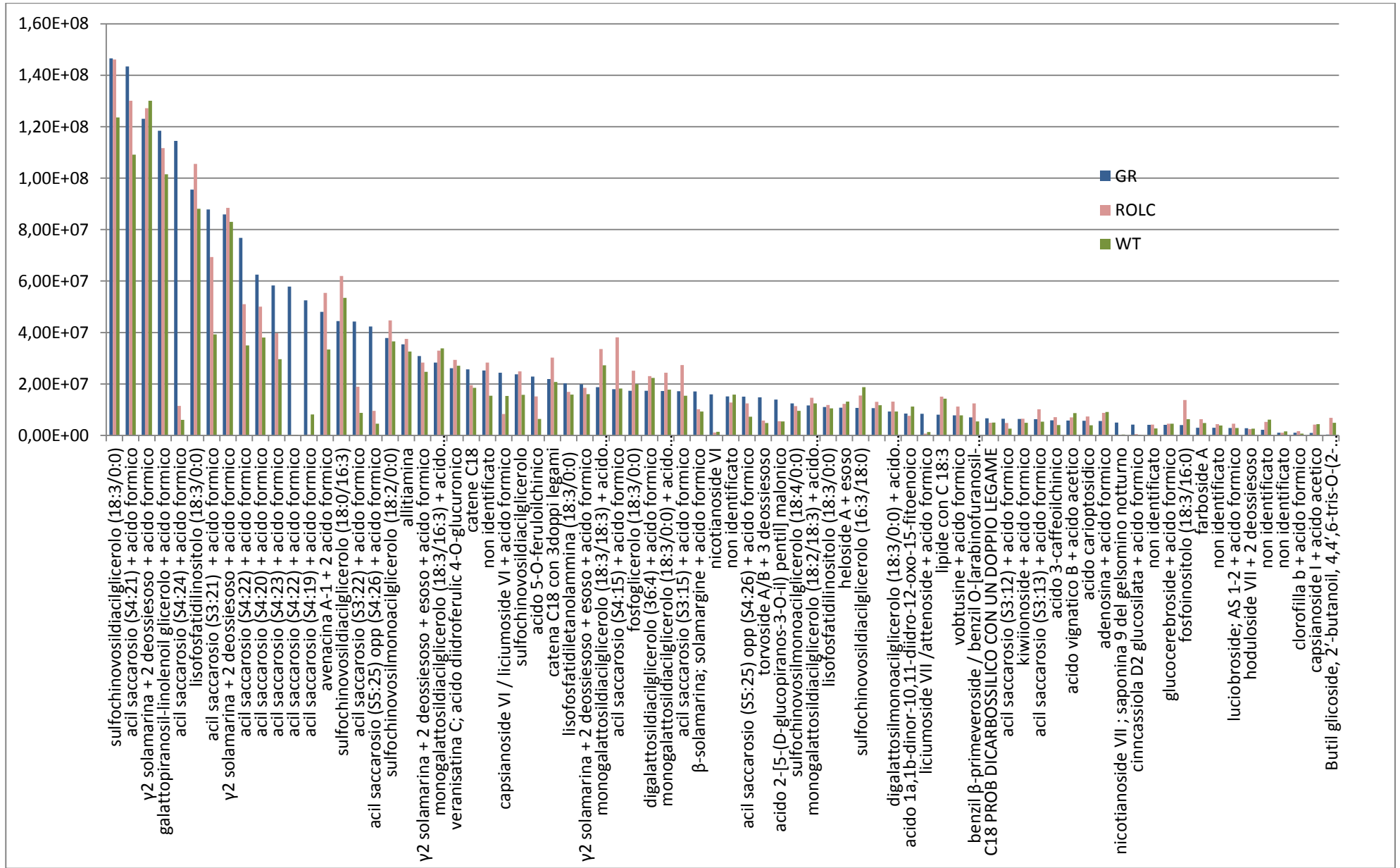


Figura 82 Metaboliti identificati in ionizzazione negativa, dati estratti da PCA stress termico.

IONIZZAZIONE POSITIVA

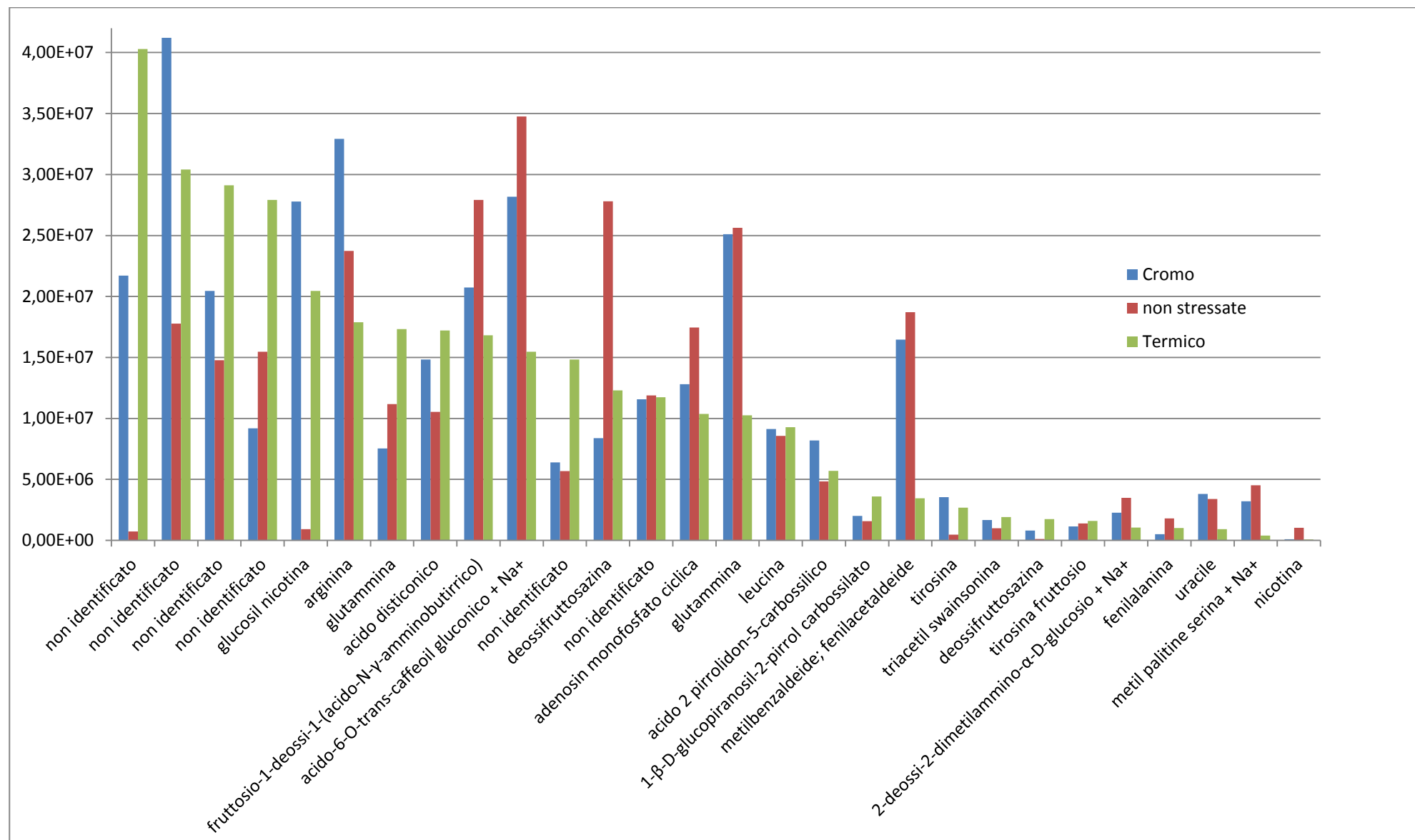


Figura 83 Metaboliti identificati in ionizzazione positiva, frazione iniziale del cromatogramma.

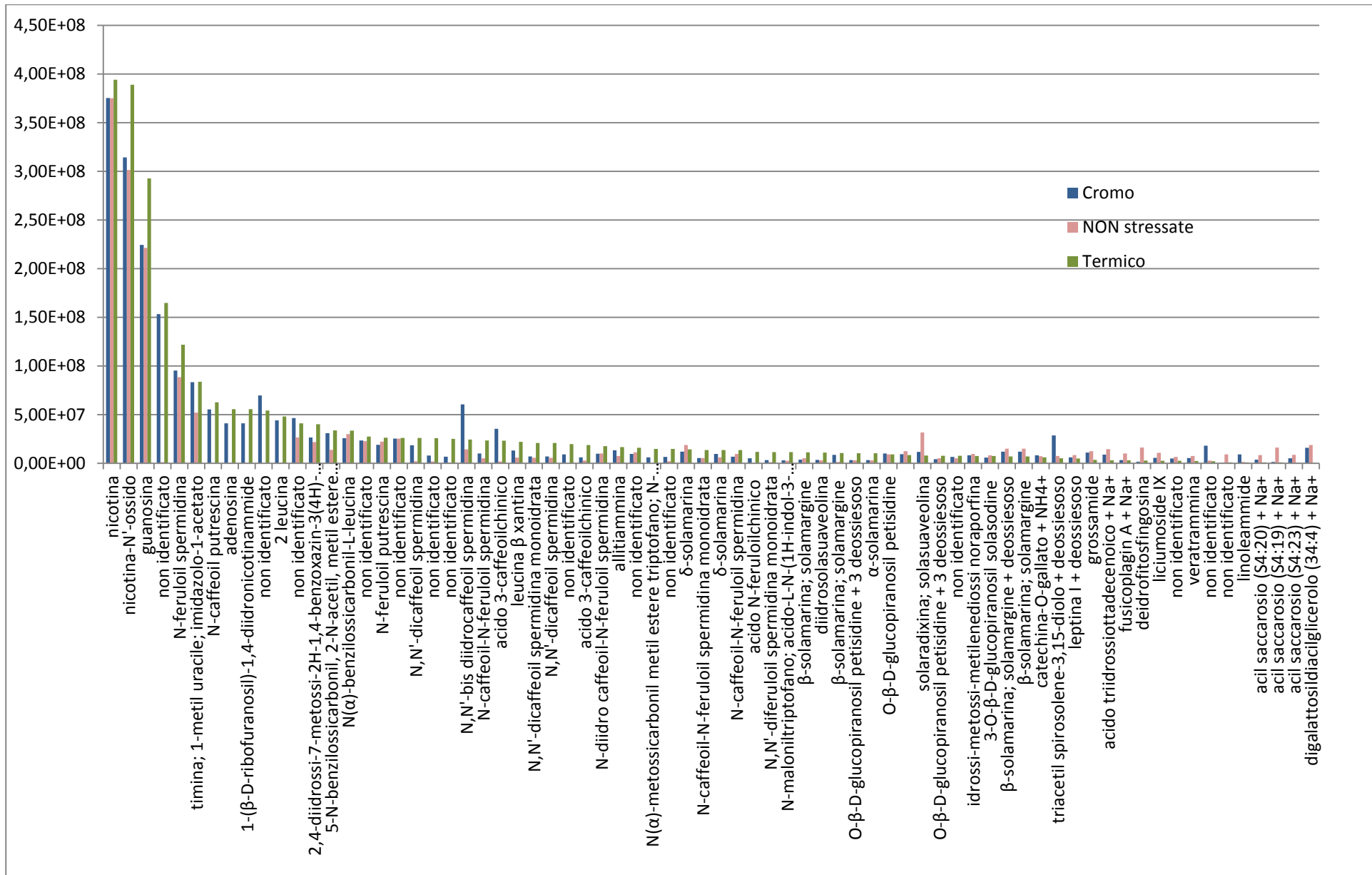


Figura 84 Metaboliti identificati in ionizzazione positiva, suddivisione per stress differenti.

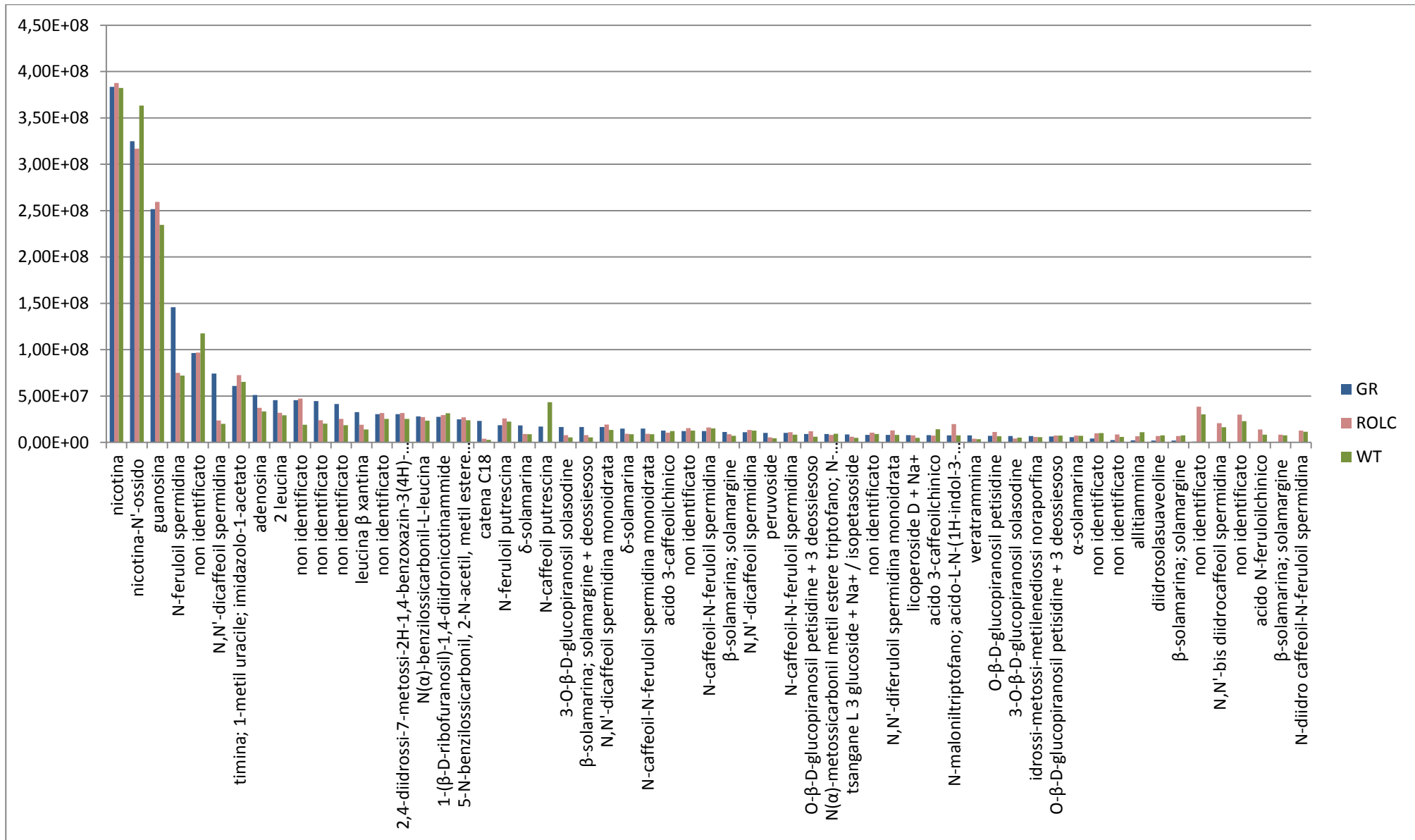


Figura 85 Metaboliti identificati in ionizzazione positiva, suddivisione per diverse modificazioni.

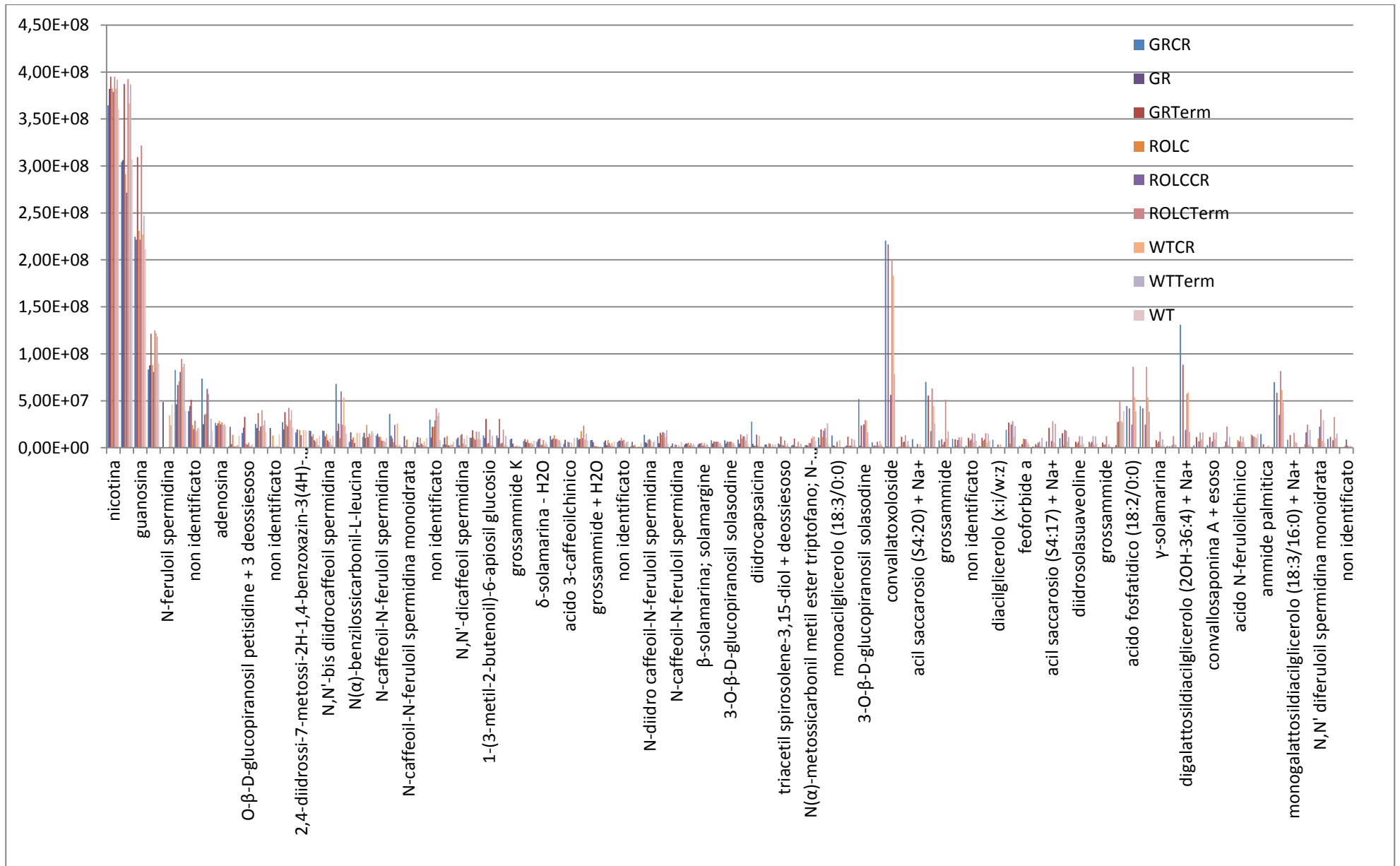


Figura 86 Metaboliti identificati in ionizzazione positiva, suddivisione per repliche.

L'analisi della prima parte della corsa cromatografica, i cui dati sono stati elaborati separatamente dal resto del cromatogramma, rivela un'elevata presenza di amminoacidi: questi composti, a causa della presenza di una funzionalità amminica (basica) e una carbossilica (acida), sono fortemente polari e perciò vengono eluiti nella prima parte dell'analisi.

Dai risultati ottenuti in ionizzazione negativa si ipotizza la presenza nei campioni analizzati di glicina, asparagina, fenilalanina, leucina e acido glutammico. Essi si presentano in forma libera o come composti glucosilati, associazione favorita dalla polarità dei gruppi funzionali presenti. Inoltre si nota come si tratti di amminoacidi complessivamente neutri ad eccezione dell'acido glutammico, solitamente presente come glutammato (-).

Come si può notare in figura 78, tutti questi amminoacidi sono presenti in concentrazione maggiore nei campioni di *Nicotiana L. wild*, non geneticamente modificati: ciò potrebbe essere giustificato dal fatto che gli amminoacidi sono componenti essenziali (metaboliti primari) per la pianta e che, perciò, modificazioni genetiche non comportino una sintesi maggiore degli stessi ma piuttosto una loro riduzione in intensità di segnale.

Con la ionizzazione positiva dei campioni, si trovano amminoacidi neutri come glutammina, tirosina, serina oltre a leucina e fenilalanina. In questo caso è stato identificato un amminoacido carico positivamente ossia l'arginina.

In quest'ultima analisi si devono evidenziare delle diversità rispetto all'analisi in negativo: gli amminoacidi identificati si presentano quasi unicamente in forma non complessata e inoltre non mostrano l'andamento prima descritto.

In entrambe le analisi, gli amminoacidi non sono gli unici composti presenti: un gruppo significativo nei campioni analizzati in modalità negativa è quello derivato dall'acido sialico o N-acetilneuraminico, zucchero complesso e azoto sostituito.

Diversi studi hanno verificato la presenza nelle piante dell'acido sialico in concentrazioni molto ridotte rispetto ai tessuti dei mammiferi (68).

Nello stesso studio si conclude che, vista la ridotta concentrazione dell'acido, non sia possibile definire se esso derivi da fonti inevitabili di contaminazione esterna o se sia presente naturalmente nella pianta. Basse concentrazioni sono state rilevate in cellule di tabacco, mela e banana (68).

Nelle analisi di questo lavoro di tesi, l'acido si presenta come acido 2-deossi-2,3-deidro-N-acetilneuraminico, come dimero e nella forma fosfata. I frammenti di massa sono coerenti con la struttura e si ripetono nelle strutture derivate.

In modalità positiva invece ionizza facilmente la nicotina, l'alcaloide maggiormente presente nei campioni di *Nicotiana*. Tale alcaloide, tossico, è sintetizzato nelle radici della pianta e poi viene trasportato nelle foglie dove si accumula (43). La nicotina crea dipendenza, per le sue proprietà psico-attive, ansia e irritabilità (69).

Mediante le suddivisioni dei dati effettuate per modificazione genetica e/o stress, tra la modalità di ionizzazione negativa e quella positiva, si sono identificati composti chimici differenti, ad eccezione di una decina di metaboliti comuni ad entrambe. Le molecole identificate si possono però raggruppare in poche e significative classi di composti.

In questa fase, si vogliono descrivere i tratti significativi delle classi di composti identificati, mostrando e giustificando la presenza di tali composti nella pianta e la variazione in intensità di segnale nei differenti campioni: in alcuni casi è stato possibile ripercorrerne la via metabolica.

I composti identificati, con diverso livello di confidenza nell'identificazione, possono essere considerati appartenenti alle seguenti classi: acidi grassi liberi e complessi, disaccaridi come saccarosio acilato,

composti specifici della specie *Nicotiana Langsdorffii* o della famiglia delle *Solanaceae* come nicotianoside o solamarine e composti azotati legati a stress o modificazioni genetiche come la spermidina.

4.4.1 ACIL SACCAROSIO

Gli zuccheri esterificati sono un gruppo di composti molto abbondante in tutte le suddivisioni effettuate: lo zucchero è quasi esclusivamente il saccarosio. Tali composti sono stati identificati in molte piante della famiglia delle *Solanaceae* e non al di fuori di essa. Gli acil saccarosio sono la seconda maggiore classe di composti chimici non volatili presenti nelle foglie. I tricomi sono ghiandole secretorie epidermiche aventi un ruolo centrale nei meccanismi di difesa delle piante poiché responsabili della sintesi di acil saccarosio a partire da una unità di saccarosio e da acidi attivi provenienti dal metabolismo degli amminoacidi. Alcuni acil saccarosio, prodotti nei tricomi, possiedono attività antibiotica, di regolazione della crescita della pianta, proprietà organolettiche (70) e attività di difesa contro gli insetti (71).

In studi precedenti si è verificata la capacità dei tricomi delle foglie di tabacco di produrre, oltre agli acil saccarosio, anche dei terpenoidi, a partire dalla CO₂ dell'atmosfera. Inoltre la prevalenza dello zucchero saccarosio, rispetto al glucosio, è giustificata dalla maggior velocità con cui tale zucchero viene trasportato fino ai tricomi (71).

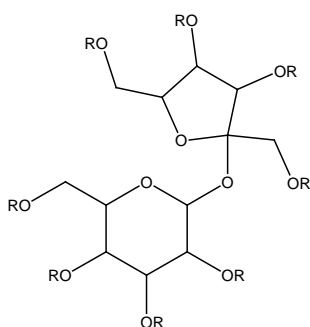


Figura 87 Schema generale acil saccarosio.

Il saccarosio è formato da una unità di glucosio e una di fruttosio: i gruppi ossidrilici di ciascuna unità possono essere esterificati determinando due tipi di acil saccarosio differenti.

In figura 87, infatti, sono indicati con il generico gruppo R tutti gli ossidrili del saccarosio che potrebbero essere esterificati. Il gruppo R è un atomo di idrogeno, se il gruppo ossidrilico corrispondente non è esterificato, oppure una catena acilica o acetilica con lunghezza variabile (72).

Si differenziano inoltre nel numero e nella lunghezza delle catene esteree.

Tale gruppo di composti viene indicato con la lettera S (se lo zucchero è il saccarosio), due numeri separati da ":" i quali indicano il numero di catene aciliche e il numero totale di atomi di carbonio presenti nelle catene laterali. In alcuni studi questa simbologia è completata da una parentesi tonda con i numeri degli atomi di carbonio contenuti in ciascuna catena acilica. Inoltre sono presenti il tempo di ritenzione dello ione, lo ione principale e i frammenti di massa. In alcuni casi, la molecola differisce per il numero di atomi di carbonio delle catene aciliche, mantenendo però costante il numero totale: il tempo di ritenzione e i frammenti sono informazioni essenziali per l'identificazione e la loro distinzione.

Con la ionizzazione negativa si nota innanzitutto la formazione, per tutte le molecole selezionate, confermato da studi presenti in letteratura, di addotti con l'acido formico, presente come soluzione acidificante della fase mobile: lo ione identificato nello spettro di massa per gli acil saccarosio non è mai lo ione della massa base priva di un protone ma lo ione $[M + CHO_2]^-$. Con la ionizzazione positiva, invece, l'addotto più comune è con il sodio $[M + Na]^+$.

Nello spettro di frammentazione di massa, invece, sono presenti per la ionizzazione negativa, gli ioni $[M]^-$ con intensità relativa del 30-40% circa e $[M + Na - X]^-$ come picco base: X è un termine generale con cui si indicano per esempio l'acido butirrico, l'acido pentanoico o quello esanoico a cui corrisponde la perdita dalla porzione glucosidica di 88, 102 o 116 Da (70). Tali frammenti differiscono per un frammento metilenico (14 Da) e possono costituire anche catene più lunghe, come si verifica in questo lavoro di tesi con la perdita di 172 Da ($116 + 4 * (-CH_2)$).

Per quanto riguarda gli addotti, la presenza di quello sodiato in modalità positiva si giustifica, oltre che con la grande quantità di sodio rilevata nelle foglie di tabacco, anche con il sodio presente nella vetreria di laboratorio utilizzata durante la preparazione dei campioni (70).

L'addotto si forma con la parte glucosidica del saccarosio e non con il fruttosio: tra le due parti, il glucosio sembra avere maggiore affinità chimica (72). La forza di tale legame conferma la presenza del sodio anche dopo la frammentazione dello ione e la corrispondente perdita del frammento fruttosio: la perdita del frammento 162 per la ionizzazione positiva corrisponde all'identificazione di un acil saccarosio del primo tipo (acile sul glucosio e quattro gruppi ossidrilici liberi per il fruttosio). La rottura del legame avviene tra l'atomo di ossigeno e il residuo fruttosidico. La perdita di un frammento 204, invece, indica che il fruttosio è esterificato e perciò si tratta di un acil saccarosio del tipo II (72).

Il restante spettro di frammentazione è privo di ioni con intensità di segnale significativa: questo rappresenta una caratteristica identificativa, unicamente per questi composti. La seconda frammentazione di massa riguarda, in tutti i casi, il picco base.

Anche per quanto riguarda la ionizzazione positiva, si ottiene uno spettro pulito, in cui l'unico frammento presente nella prima frammentazione è rappresentato dalla perdita di un'unità di fruttosio non esterificato (162 Da) o con un unico gruppo acetato (204 Da). In entrambi i casi, l'addotto Na^+ permane nello ione prodotto (72).

Per mettere in evidenza alcune caratteristiche ripetute di questo abbondante gruppo di composti chimici, presenti sia in campioni analizzati in positivo che in negativo, si riassumono in tabella gli acil saccarosio identificati. Per la ionizzazione negativa non sono riportati i valori di m/z della molecola $[\text{M}-\text{H}]^-$ ma lo ione più significativo e abbondante. I dati, suddivisi per modificazioni genetiche e/o stress come presentati in appendice I, sono stati ordinati in modo crescente per il valore di m/z dello ione ricercato e sono stati riportati solo i dati relativi ad acil saccarosio non ripetuti.

In tabella 6, si riportano inoltre i tempi di ritenzione della frammentazione e la differenza, in termini di massa, tra lo ione ricercato e il picco base.

Tabella 6 Identificazione acil saccarosio in ionizzazione negativa.

IONIZZAZIONE NEGATIVA				
ione (m/z)	identificazione	picco base (m/z)	t_R picco base	differenza (Da)
597.27478	S3:12	425.16455	25.45	172.11023
611.25403	S3:13	523.23822	24.79	88.01581
639.28528	S3:15	551.26825	27.98	88.01703
653.30066	S4:15	565.28387	28.02	88.30066
667.27978	S4:16	579.263	27.48	88.01678
667.31647	S3:17	537.25269	29.09	130.06378
681.29541	S4:17	593.2785	28.12	88.01691
709.3266	S4:19	621.30094	30.65	88.02566
723.34375	S4:20	635.32489	31.34	88.01886
723.37891	S3:21	635.1358	32.88	88.37891
737.35791	S4:21	649.35138	32.47	88.00653
737.39441	S3:22	565.2832	33.57	172.11121
751.37347	S4:22	663.35663	33.34	88.01684
765.38928	S4:23	677.3718	34.66	88.01748

765.42596	S3:24	593.31561	35.34	172.11035
779.4046	S4:24	691.38855	35.48	88.01605
807.43579	S5:25	719.45449	36.78	87.9813
807.43604	S4:26	719.41907	37.15	88.01697

Tabella 7 Identificazione acil saccarosio in ionizzazione positiva.

IONIZZAZIONE POSITIVA				
ione (m/z)	identificazione	picco base (m/z)	t _R picco base	differenza (Da)
617.27466	S4:14	455.22573	26.85	162.04893
631.29028	S4:15	469.24084	27.75	162.04944
659.28491	S4:17	455.22427	28.08	204.06064
659.32104	S4:17	497.27191	30.01	162.04913
673.30084	S4:18	469.24173	29.15	204.05911
687.35229	S4:19	525.30493	31.94	162.04736
701.33185	S4:20	497.271	31.68	204.06085
715.3479	S4:21	511.28723	32.47	204.06067
729.36304	S4:22	525.30438	33.67	204.05866
743.37872	S4:23	539.31879	34.69	204.05993
757.39429	S4:24	553.4349	35.44	203.95939
771.40912	S4:25	567.35004	36.96	204.05908
785.42456	S4:26	581.36505	37.21	204.05951

Dai dati mostrati nelle tabelle 6 e 7, si conferma la corretta identificazione dei composti indicati: con l'aumento del valore di m/z ricercato, si nota l'aumento del numero di atomi di carbonio totali presenti nelle catene aciliche. Inoltre, ordinando i dati per il valore di massa, tranne alcune eccezioni, si verifica la corrispondenza tra aumento di massa e tempo di eluizione maggiore: l'aumento della lunghezza delle catene aciliche, ossia l'aggiunta di gruppi idrocarburici apolari nella stessa, comporta l'eluizione del composto formato in una regione del cromatogramma via via sempre meno polare.

Studi di letteratura affermano che con la modalità di ionizzazione positiva sia possibile ottenere un numero maggiore di risultati e con maggior sensibilità nella misura rispetto ai dati in ionizzazione negativa (70).

In questo lavoro di tesi, sono stati identificati 18 diversi acil saccarosio per la ionizzazione negativa e 12 per quella positiva: con quest'ultima sono stati identificati solo tetracil saccarosio (4 catene aciliche), mentre in negativo vi sono anche tri- e penta acil saccarosio. Tutti i tetra acil saccarosio identificati in negativo, sono presenti anche nei dati analizzati in positivo.

In negativo, i frammenti persi sono 88, 130 o 172: l'unica razionalizzazione possibile per questi dati è la perdita del frammento 172 per i triacil saccarosio con numero totale di atomi di carbonio pari.

Per i dati ottenuti dalla ionizzazione positiva, si può dedurre che la perdita del frammento maggiore (204) si abbia nel caso di tetracil saccarosio con numero complessivo di atomi di carbonio superiore a 20, salvo due eccezioni.

In ultima analisi, si possono considerare le variazioni in intensità di segnale di ciascuna molecola nelle suddivisioni per stress o modificazioni genetiche. Nonostante il numero limitato di acil saccarosio identificati in ciascuna suddivisione, escludendo i composti già identificati, si possono dedurre alcune considerazioni importanti su tali confronti, dei quali in letteratura non vi è alcun riferimento.

Confrontando le intensità di segnale degl'acil saccarosio identificati nei diversi campioni, si verifica una risposta differente tra la ionizzazione negativa e quella positiva: per quanto riguarda i differenti stress subiti

da piante di *Nicotiana L.* naturali o geneticamente modificate, in negativo lo stress termico e quello idrico mostrano livelli elevati di acil saccarosio, dei quali non si riesce però a fare ulteriori razionalizzazioni per numero o lunghezza di catene aciliche. Per la ionizzazione positiva, invece, gli acil saccarosio identificati nella suddivisione per stress manifestano una notevole riduzione in termine di intensità di segnale per i campioni stressati termicamente rispetto ai campioni non stressati. Lo stress chimico, che riduce notevolmente il segnale in ionizzazione negativa, determina livelli di concentrazione maggiori rispetto ai campioni sottoposti a stress termico in modalità positiva.

Con la suddivisione per modificazione genetica, in positivo, non emergono acil saccarosio diversi da quelli evidenziati con la suddivisione per stress. Mentre con la ionizzazione negativa, per tale suddivisione, sono presenti molti e differenti composti per i quali è possibile delineare un certo andamento: tra i tipi differenti di campione (wild, GR e rolC), i tri acil saccarosio hanno intensità di segnale maggiore per i campioni geneticamente modificati per il gene GR come i tetra acil saccarosio con numero totale di atomi di carbonio nelle catene aciliche superiore a 21. Per i tetra acil saccarosio con numero di atomi di carbonio pari o inferiore a 20, il segnale ha intensità maggiore nei campioni modificati rolC.

Tali considerazioni sono ricavabili dalla figura sottostante.

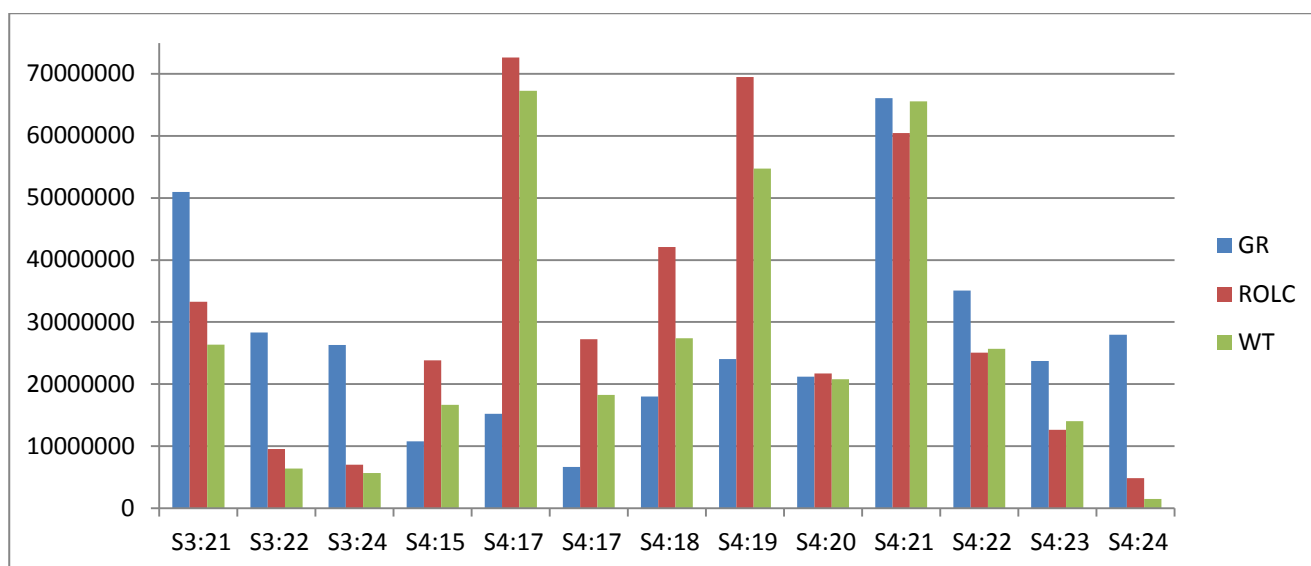


Figura 88 Acil saccarosio identificati nella suddivisione per modificazioni genetiche in modalità negativa.

Inoltre, verificando gli analiti estratti dall'analisi dei loadings sia in ionizzazione negativa che positiva, i campioni di *Nicotiana L.* stressati termicamente presentano intensità di segnale maggiori rispetto ai campioni non stressati. In particolare, con la ionizzazione positiva, si conferma l'andamento verificato e descritto in figura 88: con i tetra acil saccarosio con un numero di atomi di carbonio minore di 20, i campioni rolC (termico) hanno intensità maggiore, e per quelli con numero maggiore di carbonio, i campioni modificati per il gene GR (termico) hanno un livello di concentrazione maggiore.

La presenza di frammenti tipici e ripetuti, i tempi di ritenzione contenuti in un range di analiti poco polari, la corrispondenza di composti in entrambe le modalità di ionizzazione e la conferma ottenuta mediante il confronto con studi presenti in letteratura sono caratteristiche estremamente utili in fase di identificazione degli analiti selezionati.

4.4.2 ACIDI GRASSI E DERIVATI

I lipidi sono costituenti fondamentali per la pianta. Le membrane cellulari contengono composti chimici come fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerolo oltre ad acidi grassi liberi come l'acido linolenico e linoleico, acilgliceroli o ancora glico-glicerolipidi (presenti nelle membrane fotosintetiche) come monogalattosildiacilglicerolo e sue varianti. Essi sono principalmente sintetizzati nei plastidi.

L'energia in essi contenuta è rappresentata dall'ossigeno presente nella struttura (73).

Inoltre, la presenza di composti ossigenati è segnale di risposta a condizioni diverse rispetto a quelle naturali a cui la pianta è stata sottoposta: in particolare alti livelli di acidi grassi liberi (da cui si ricavano i corrispondenti composti ossigenati) si osservano solamente in campioni soggetti ad attacco da parte di agenti patogeni (25).

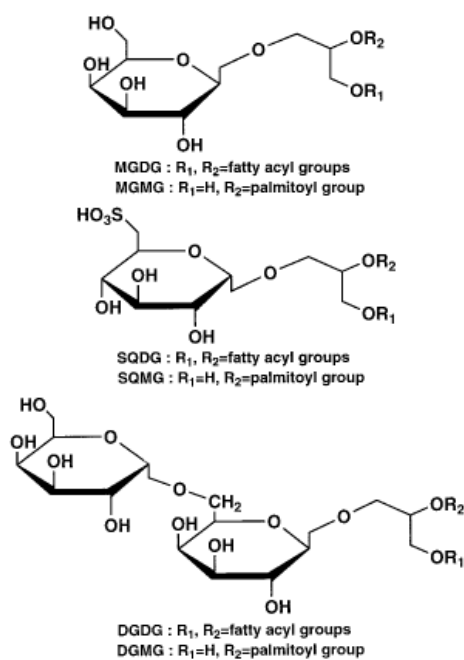


Figura 89 Schema generale glicoglicerolipidi (75).

Oltre ai triacilgliceroli descritti nel paragrafo 2.3.3.3, il glicerolo è base fondamentale per i glicoglicerolipidi, classificati come lipidi ossidati, composti molto abbondanti che costituiscono l'80% delle membrane tilacoidali delle piante superiori e il 60% dei lipidi delle foglie (74). Come rappresentato in figura 89, i tre atomi di ossigeno del glicerolo (parte destra di ogni molecola) possono essere esterificati: uno sarà esterificato da uno zucchero, galattosio semplice o solfonato (gruppi polari), mentre gli altri due possono essere sostituiti da una catena lipidica (code non polari) di lunghezza variabile.

A partire da tali esterificazioni si compone il nome del composto e la sigla: le prime due lettere indicano se si tratta di una, due unità semplici o solfonate di galattosio (MG, DG o SQ); le ultime due lettere indicano invece se entrambe le catene sono esterificate con un acido grasso o meno (DG o MG). Solitamente tali sigle sono accompagnate dal numero di atomi di carbonio presenti nelle singole catene e dal numero

di insaturazioni presenti separati da due punti. In casi più complessi, per esempio quando vi sono gruppi -OH nella catena laterale o essa è ramificata, non è sempre possibile, dai dati di analisi, definire le caratteristiche delle singole catene: si usa pertanto specificare il numero complessivo di atomi di carbonio e quello dei doppi legami (per esempio (OH-36:4)). Gli acidi grassi solitamente presenti nelle catene apolari sono l'acido palmitico (C16:0), l'acido linoleico (C18:2) o quello linolenico (C18:3).

Dopo la ionizzazione degli analiti, gli addotti formati sono con lo ione Na⁺ in positivo, mentre con ionizzazione negativa si registra principalmente lo ione molecolare [M-H]⁻ (75). In questo lavoro di tesi, per la ionizzazione negativa, si sono registrati e identificati, inoltre, molti ioni sotto forma di addotto dell'acido formico presente nella fase mobile della cromatografia.

La frammentazione di massa, con questo gruppo di composti, è estremamente importante per la loro identificazione: la prima rottura, causata dall'energia di frammentazione, determina la perdita proprio del gruppo acile. Quando invece l'addotto è lo ione ammonio, la prima rottura comporta la perdita di un'unità galattosidica e di una molecola di acqua (74): tale evento non è stato verificato in questo lavoro di tesi.

A partire dal peso del frammento ottenuto, si risale all'acido grasso presente nel glicoglicerolipide e quindi all'assegnazione del nome corretto. Esperimenti di MS/MS permettono inoltre di ottenere maggiori informazioni sulla composizione e posizione dei doppi legami nella catena acilica come sulla tipologia di gruppo di testa polare, sulla quale solitamente si lega l'addotto sodio (75).

Un altro gruppo di composti, abbondantemente presente nei campioni di *Nicotiana L.* analizzati, è rappresentato dai fosfolipidi: la carica del gruppo fosforico PO_4H^{2-} centrale è neutralizzata da una molecola di glicerolo (PG), più o meno esterificato, di etanolamina (PE), di inositolo (PI) (uno zucchero a sei atomi di carbonio) o da una o più catene di acidi grassi.

La sigla, che rappresenta questo gruppo di composti, è costituita dalle lettere maiuscole PG, PE, PI o LPG seguite dal numero di atomi di carbonio e dal numero di doppi legami degli acidi grassi legati.

I glicerolipidi, sia glico- che fosfo-, sono sintetizzati a partire dall'acido fosfatidico che, se prodotto nei plastidi, ha una catena 18:1 in posizione *sn*-1 e 16:0 in *sn*-2, mentre se sintetizzato nell'ER contiene diverse catene C18 in posizione *sn*-1.

Per tali composti la via eucariotica è la via di sintesi principale nelle piante superiori: in particolare, a partire dal fosfatidato, si avviano due processi, la via del CDP-diacilglicerolo e quella del diacilglicerolo. Nelle piante quest'ultima via è utilizzata per la sintesi di fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, ma in alcuni tessuti vegetali possono essere interconvertite (6).

Ma il diacilglicerolo (DAG) è alla base anche della sintesi di galattolipidi e solfolipidi: l'UDP-galattoside (uridina difosfato) e UDP-solfochinovosio trasferiscono il gruppo polare galattosio e quello solfochinovosile al DAG per la sintesi dei corrispondenti composti. Da una molecola omologa al prodotto, si ha eventualmente il trasferimento di un secondo gruppo galattosilico (6).

Per quanto riguarda gli sfingolipidi, sono poche le informazioni relative alla loro sintesi. La ceramide è la sua componente base e composto di partenza nella sintesi, molto diffusa nelle piante come la corrispondente glucosilceramide.

Attraverso uno studio su piante geneticamente modificate, è stato possibile dimostrare che, vista la limitante disponibilità di fosfato in molti ecosistemi, molte piante utilizzano il MGDG, il DGDG e il SQDG come sostituto dei fosfolipidi nelle membrane dei cloroplasti, minimizzando il fabbisogno di fosfato necessario per la loro sintesi (6).

Osservando i dati ottenuti dalle analisi di questo lavoro di tesi risulta che mentre i composti glucosolfochinovosili e mono- e digalattosilici siano più soggetti a variazioni a seconda del tipo di modificazione genetica, gli acidi grassi non glucosilati, i composti fosforilati, tra cui PE, PA, PI e PG, risultano invece sempre presenti indipendentemente dalle modificazioni genetiche e dagli stress, quali costituenti della pianta.

Riportando in grafico i lipidi identificati in modalità di ionizzazione negativa per la suddivisione per modificazione genetica, si possono ricavare ulteriori considerazioni.

Come si nota in figura 90, la modificazione apportata dal gene GR non comporta alcun aumento significativo in termini di intensità di segnale se non per tre casi isolati.

Inoltre si verifica una maggiore intensità di segnale in campioni wild-type per composti glucosolfochinovosili e digalattosilici con catene di acidi grassi con numero di atomi di carbonio pari a 16. La modificazione genetica per il gene rol C determina un aumento in intensità per tutti gli altri composti tra cui prevalgono fosfolipidi e composti digalattosilici.

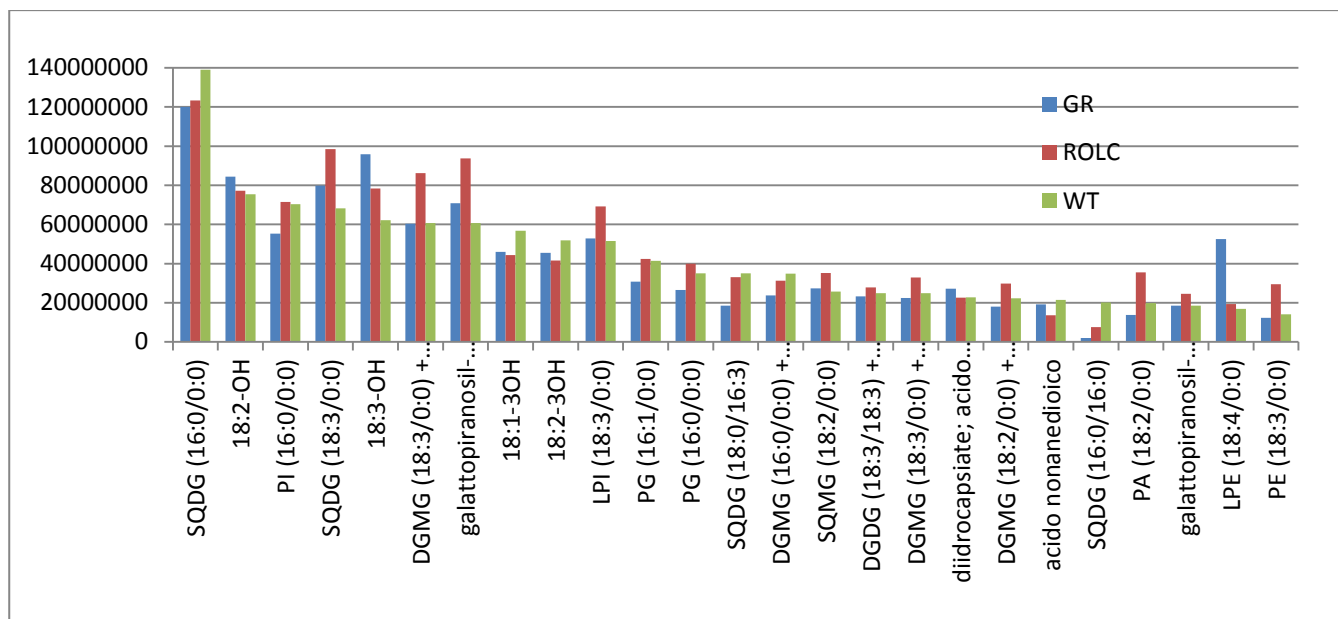


Figura 90 Lipidi selezionati per modificazione genetica in ionizzazione negativa.

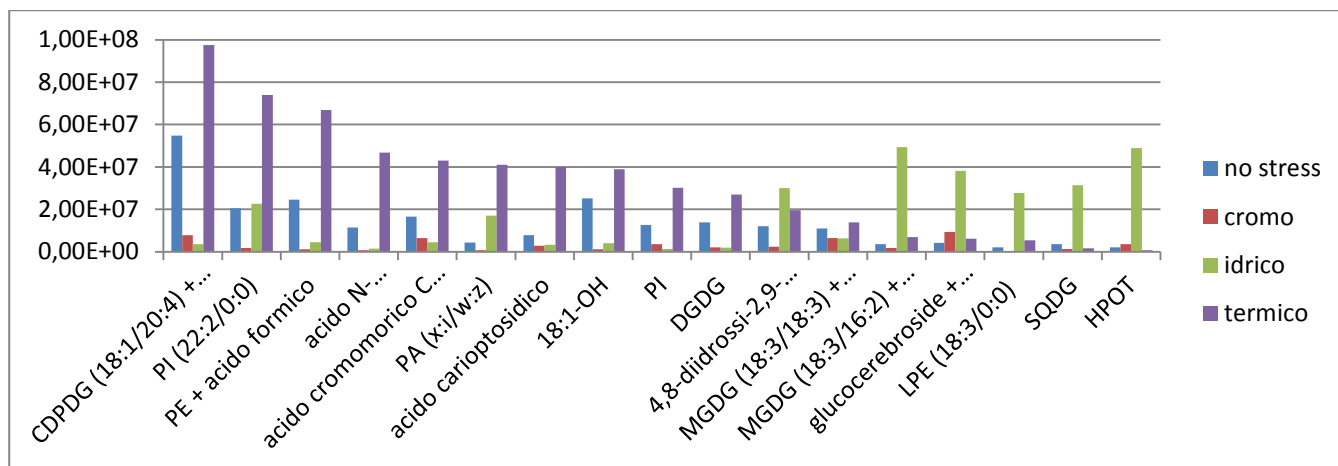


Figura 91 Lipidi selezionati per differenti stress subiti, in ionizzazione negativa.

In figura 91, invece, viene rappresentato l'andamento dell'intensità di segnale dei composti lipidici identificati a seconda della tipologia di stress, trascurando quelli già evidenziati nell'analisi precedente in ionizzazione negativa. Dalla figura sovrastante, si evidenzia una netta differenziazione tra i composti presenti con maggior intensità nei campioni di *Nicotiana L.* stressati termicamente da quelli sottoposti a stress idrico e che l'aggiunta di Cr^{VI} al terreno di coltura, invece, non provoca variazioni significative nell'intensità di segnale dei lipidi identificati. I composti selezionati appartengono a sottoclassi lipidiche differenti: non è perciò possibile giustificare la loro diversa intensità di segnale nei diversi campioni.

Ciò che si può evidenziare, invece, è il fatto che i composti presenti in concentrazione maggiore nei campioni sottoposti a stress termico sono presenti, con intensità di segnale notevole, anche nelle piante non stressate, mentre le molecole che emergono dallo stress idrico sono quasi assenti in tutti gli altri campioni. Studi di letteratura evidenziano la variazione dei lipidi di membrana in campioni sottoposti a carenza di acqua: si riporta l'accumulo di lipidi con un numero di atomi di carbonio inferiore a 16, la diminuzione di composti DGDG, acidi 18:3 e l'aumento di acidi 18:2 e 18:1 (76). Tali variazioni sembrano correlate alla diminuzione del potenziale dell'acqua che determina il danneggiamento delle membrane tilacoidali dei cloroplasti e perciò ne danneggia l'attività fotosintetica (76).

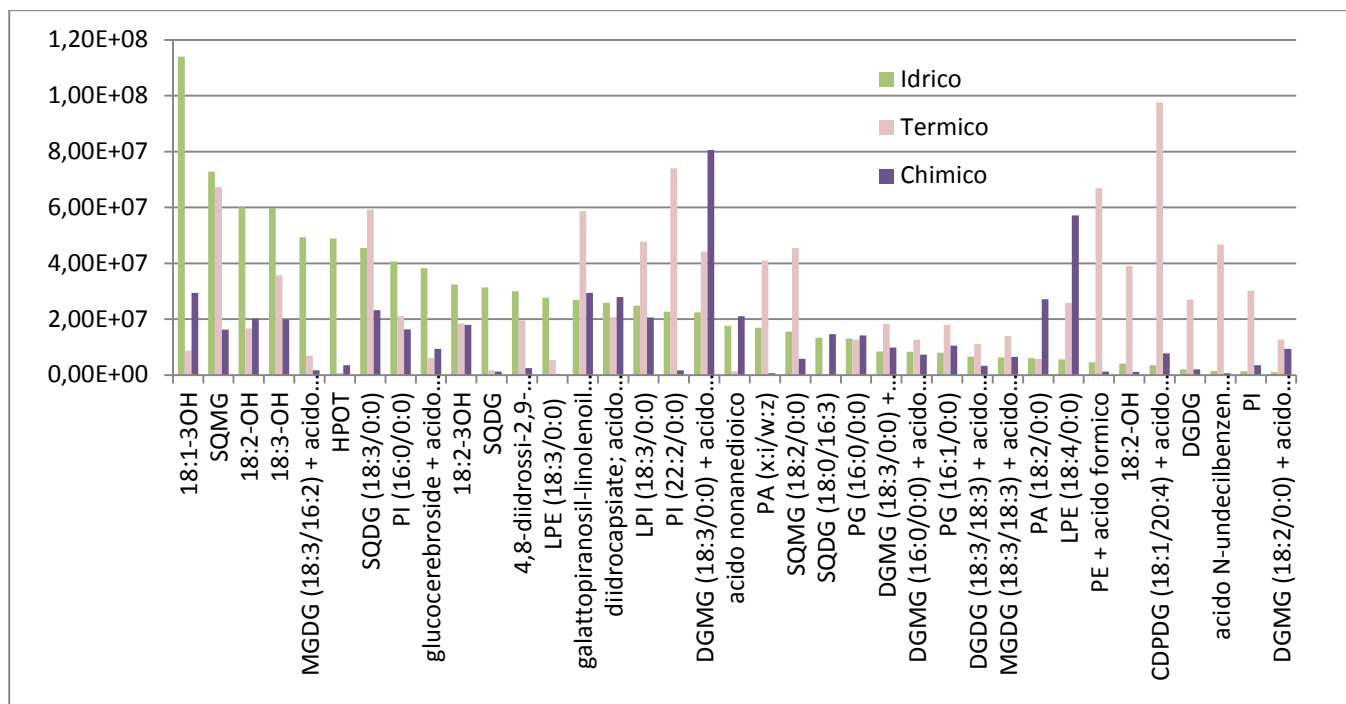


Figura 92 Lipidi raccolti sia dalla suddivisione per modificazione genetica che per stress in modalità di ionizzazione negativa.

Riportando in grafico (figura 92) i dati raccolti sia dalla suddivisione per modificazione genetica che per stress in modalità di ionizzazione negativa, si nota, a sinistra dell'istogramma, nella regione in cui sono evidenziati i lipidi più abbondanti per lo stress idrico, l'assenza di DGDG (abbondanti invece per lo stress termico) e la presenza di acido linoleico e oleico (18:1). Studi recenti affermano che la risposta della piante allo stress idrico sia la diminuzione del contenuto totale di lipidi nelle foglie. Studi effettuati sulle membrane delle foglie di *Arabidopsis* dimostrano la capacità della pianta di adattarsi allo stress subito mostrando una notevole resistenza e il mantenimento del contenuto di lipidi polari: ciò che viene modificato è il rapporto MGDG:DGDG e il grado di insaturazione degli acidi grassi presenti (77).

Con la ionizzazione positiva si ottiene un numero nettamente inferiore di composti lipidici. Oltre ai composti identificati in ionizzazione negativa, con quest'analisi si sono identificate sfingosine (composti a elevata polarità) e ammidi legate a catene di acidi grassi (poco polari). Dalla selezione dei centrotipi significativi per lo stress termico mediante analisi PCA, emerge che i composti maggiormente presenti sono i glucoglicerolipidi: in particolare, ad eccezione di un solo composto, vi sono solamente composti mono e digalattosilici con due acidi grassi legati al glicerolo centrale (composti poco polari). I composti MGDG prevalgono su quelli digalattosilici, come si evidenzia in figura 93.

Inoltre, si nota anche la presenza di molecole di glicerolo con una o due catene di acidi grassi, prive di glucosidi, molecole che non ionizzano in negativo (MG, DG) e la completa assenza di composti glucosolfochinovosili.

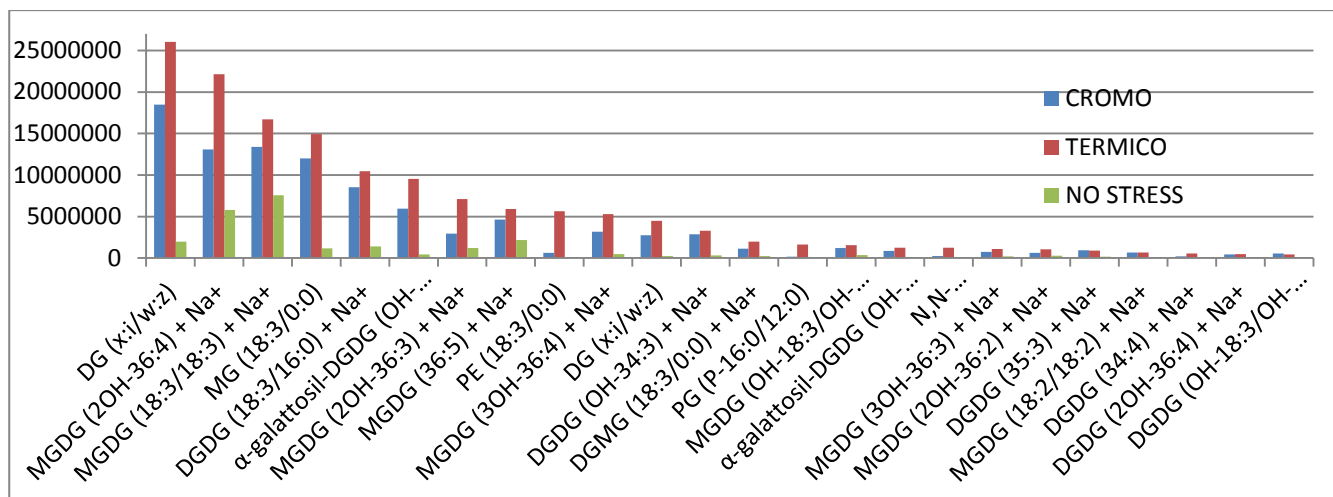


Figura 93 Lipidi identificati in modalità di ionizzazione positiva, selezionati mediante PCA stress termico.

In quest'analisi si nota inoltre l'andamento simile tra livelli per lo stress termico e quello chimico. Per quanto riguarda i metalli pesanti, essi sono responsabili dell'attivazione di enzimi come α -diossigenasi, perossidasi o lipossigenasi, solitamente attivati da stress biotici. Come conseguenza si ha la perossidazione degli acidi grassi polinsaturi che comporta la perdita di fluidità e integrità delle membrane lipidiche della pianta (78). La risposta cellulare della pianta varia da metallo a metallo: le variazioni maggiori riguardano il grado di insaturazione degli acidi grassi contenuti nei composti analizzati, l'accumulo di fosfo- e glucoglicerolipidi (78).

Analizzando i tempi di ritenzione dei composti citati, sia in ionizzazione negativa che positiva, si verifica l'eluizione di composti polari a tempi più bassi, come acidi grassi insaturi o con uno o più gruppi ossidrilici posizionati sulla catena, composti solfonati, fosfatidil-derivati con una sola catena acilica o glicerolipidi monoacil-sostituiti. L'aumento del numero di catene apolari lipidiche presenti nel composto o l'assenza di gruppi ossidrilici laterali sono causa della diminuzione di polarità del composto che perciò sarà eluito a tempi di ritenzione maggiori. Tali considerazioni, basate sui dati raccolti, confermano la buona identificazione di tali composti.

L'identificazione è stata supportata dai numerosi studi presenti in letteratura, che presentano frammentazioni di massa o i valori di m/z più importanti. Per i composti DGDG, dal primo frammento derivano un altro unico segnale a -162 Da e i valori di m/z più comuni e presenti anche nelle singole frammentazioni sono per esempio 697, 681, 659, 535, 497.

4.4.3 LE POLIAMMINE

Tra i composti azotati è necessario ricordare le poliammine coniugate: la variazione del loro contenuto nel tabacco, strettamente legato alla crescita e all'alterazione dei processi fisiologici della pianta, è dovuta alla risposta delle stesse a stress o modificazioni genetiche, in particolare da parte dell'*Agrobacterium Rhizogenes*.

Composti come putrescina, spermina o spermidina sono ammine coniugate con acidi idrossicinnamici, identificate soprattutto nelle radici delle piante superiori, con livelli di concentrazione elevati (79). Le poliammine solitamente non sono presenti in forma libera a causa della loro natura cationica: condizioni ioniche e di pH favoriscono la forma coniugata con acidi o composti solubili in acidi (80). Si dimostra inoltre

come, a differenza del contenuto di ammine alifatiche semplici dopo modificazione genetica, le ammine coniugate mostrino un aumento in concentrazione con il passare del tempo dopo la modificazione (79). Tali poliammine ricoprono un ruolo importante nello sviluppo, nell'invecchiamento e nella risposta a stress subiti. L'effetto causato è un visibile aumento in concentrazione (81).

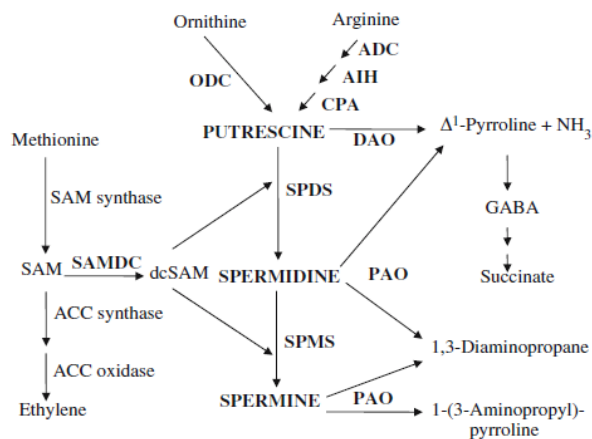


Figura 94 Meccanismo biosintetico poliammine (81).

In figura 94 si mostra il meccanismo biosintetico delle poliammine considerate. Nelle piante il primo step in tale sintesi è la decarbossilazione dell'amminoacido ornitina o arginina (attraverso la sintesi di due intermedi): il prodotto di reazione è la diammina putrescina. L'aggiunta di un gruppo ammino-propilico (derivato dalla S-adenosilmetionina (SAM), precursore nella sintesi dell'etilene) alla putrescina porta alla formazione della spermidina. La sintesi della spermina è data da una seconda aggiunta del gruppo ammino-propilico (81).

Questo gruppo di composti, nel presente lavoro, è costituito da un numero limitato di molecole rispetto ai gruppi precedenti. In particolare, è stato identificato un solo derivato della putrescina e uno di spermidina in modalità di ionizzazione negativa, mentre in quella positiva altri 10 composti. Nei campioni di *Nicotiana L.* analizzati, wild, geneticamente modificati e/o stressati, le poliammine coniugate ad acidi idrossicinnamici sono quelle elencate in figura 95. Gli acidi coniugati sono l'acido caffeico e quello ferulico.

NEGATIVO		POSITIVO	
C25H31N3O6	N,N'-dicaffeoil spermidina	C13H18N2O3	N-caffeoil putrescina
C19H28N2O8	3' β-D-glucopiranosil N-caffeoil putrescina	C14H20N2O3	N-feruloil putrescina
		C17H27N3O3	N-feruloil spermidina
		C25H31N3O6	N,N'-dicaffeoil spermidina
		C25H33N3O6	N,N'-dicaffeoil spermidina monoidrata
		C25H35N3O6	N,N'-bis diidrocaffeoil spermidina
		C26H33N3O6	N-caffeoil-N-feruloil spermidina
		C26H35N3O6	N-caffeoil-N-feruloil spermidina monoidrata
		C26H37N3O6	N-diidro caffeoil-N-feruloil spermidina
		C27H37N3O6	N,N'-diferuloil spermidina monoidrata

Figura 95 Rappresentazione putrescine e spermidine identificate in modalità di ionizzazione positiva e negativa.

Dai dati ottenuti in ionizzazione positiva mediante suddivisione per modificazione genetica, si può affermare che i livelli di concentrazione dei composti non subiscano grosse variazioni rispetto ai campioni di *Nicotiana wild-type*, ad eccezione di due casi isolati. Analizzando i composti così identificati, a seconda della tipologia di stress, si ricava l'istogramma che segue (figura 96).

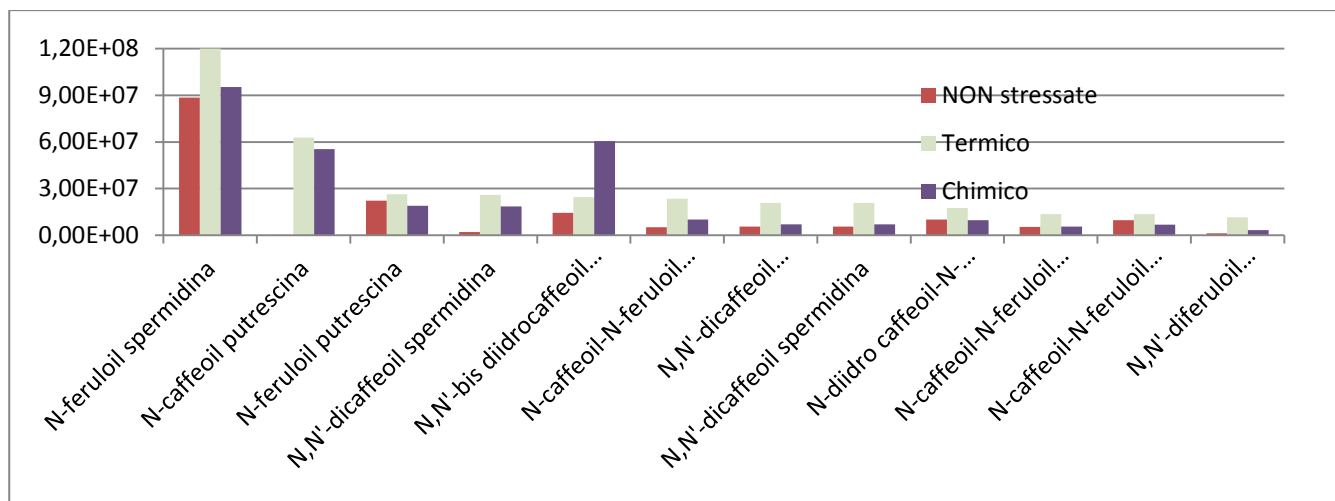


Figura 96 Poliammine identificate nella suddivisione per stress subiti in ionizzazione positiva.

Da questa selezione si può osservare un andamento pressoché simile per i campioni non stressati e quelli sottoposti a stress chimico. I campioni sottoposti a stress termico, seppur in modo lieve, mostrano un'intensità di segnale maggiore rispetto ai campioni non stressati o stressati chimicamente. I composti con un unico acido coniugato (3 in ionizzazione positiva e 1 in quella negativa) hanno intensità di segnale maggiore rispetto a quelli con due acidi, uguali o diversi. Le motivazioni potrebbero essere sia la maggior facilità di ionizzazione sia la presenza nei campioni in concentrazione notevolmente superiore.

4.4.4 SOLANIDINE

Il vasto gruppo delle solanidine, dal punto di vista chimico, è costituito da una serie di glicoalcaloidi steroidei estratti da piante e tuberi appartenenti alla famiglia delle *Solanaceae*.

α -solanina e α -caconina, α - e β -solamarina, identificate nei tuberi, sono presenti con concentrazioni maggiori sotto condizioni di stress. In particolare, si ritiene che questa classe di composti presenti un incremento di concentrazione quando la pianta è soggetta ad attacco da parte di insetti o funghi. (82). Tale azione è confermata anche dalla tossicità verificata nei confronti dell'uomo (83). Studi registrano concentrazioni maggiori di glicoalcaloidi steroidei in piante più vecchie: un loro incremento, in piante sottoposte ad alta o bassa temperatura o carenza di acqua, sembra essere dovuto proprio all'invecchiamento che tali stress provocano nelle membrane cellulari e nelle loro strutture vitali (84).

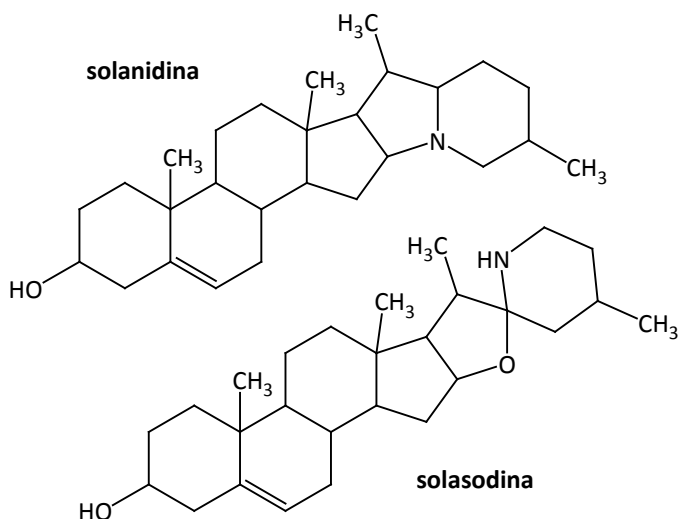


Figura 97 Formula di struttura di solanidina e solasodina.

La struttura base di questo gruppo di composti è la solanidina (C27), in alto nella figura 97, costituita da una base steroidea (tre anelli a sei atomi di carbonio e uno a cinque) e da altri due anelli condensati ed eterosostituiti. Quattro atomi di carbonio presentano un gruppo metilico, mentre uno un gruppo ossidrilico. Dalla solanidina deriva anche una seconda base per i composti di questo gruppo: solasodina o solanidina S, che differisce per la parte non steroidea dalla solanidina. Vi è infatti un anello a cinque O-sostituito ed uno a sei atomi N-sostituito, che condividono un solo atomo di

carbonio.

Tali composti vengono sintetizzati attraverso la via dell'acido mevalonico: dall'acido acetico (C2), con vari intermedi, viene sintetizzato l'acido mevalonico (C6). Dopo varie fosforilazioni, il farnesil difosfato porta alla formazione dello squalene, da cui si sintetizzano ciclo- e sesquiterpeni tra cui cicloartenolo e colesterolo. Il colesterolo sembra essere il substrato di partenza per la sintesi della solanidina: l'azoto richiesto in tale sintesi è generato dall'intermedio verazina (85).

L'ampia varietà di composti possibili è dovuta alle innumerevoli sostituzioni possibili nei sistemi ciclici che costituiscono la struttura base e al numero e al tipo di zuccheri che possono condensare con il gruppo ossidrilico di base. Per esempio α -solanina è costituita da un'unità β -galattosilica legata alla solanidina e a essa, un'unità β -glucosidica e una α -ramnosidica oppure, la β -2-solanina è costituita da un'unità β -galattosilica e una α -ramnosidica. Il numero di composti che si possono formare è elevato, e ad essi si assegna a volte il nome comune, altre il lungo nome IUPAC.

Tra i derivati più comuni della solanidina si ricordano α -, β - e γ -solanina, α -, β - e γ -caconina, demissina, commersonina, stenantina e hyacintoside. Alla seconda classe di composti appartengono invece α -, β -, γ - e δ -solamarina, solaradixina, solasuaveolina e iso-anguinina (86).

Analizzando i dati ottenuti si nota innanzitutto la presenza in modalità di ionizzazione positiva di un numero maggiore di composti: in negativo i composti solanidinici sono prevalentemente presenti come addotti dell'acido formico, mentre con la ionizzazione positiva gli addotti, anche se in numero minore, sono unicamente degli zuccheri che si staccano dalla molecola base nelle prime frammentazioni di massa.

Nella ionizzazione negativa, i composti identificati sono tutti derivati dalla solasodina: β - e γ -solamarina e un derivato complesso dello spirostenolo (solanidina S). Tali composti differiscono per il numero e il tipo di zucchero legato alla solasodina. In modalità di ionizzazione positiva invece i composti isolati sono α -, β - e δ -solamarina, solaradixina, petisidina e derivati, leptina, solasodine glucosilate e solasuaveolina.

Dai dati ottenuti in ionizzazione negativa, visto il loro numero limitato, non è possibile trarre significativi risultati: si può solo affermare che non sembrano esserci notevoli cambiamenti rispetto alla modificazione genetica mentre lo stress termico comporta l'aumento del contenuto dei composti identificati.

Con la ionizzazione positiva, ordinando i dati della suddivisione per modificazione genetica per intensità di segnale, si individuano dei composti maggiormente presenti in campioni modificati per il gene GR (β - e δ -solamarina e solasodina glucosilata), mentre i restanti composti non variano in modo significativo (fig. 98).

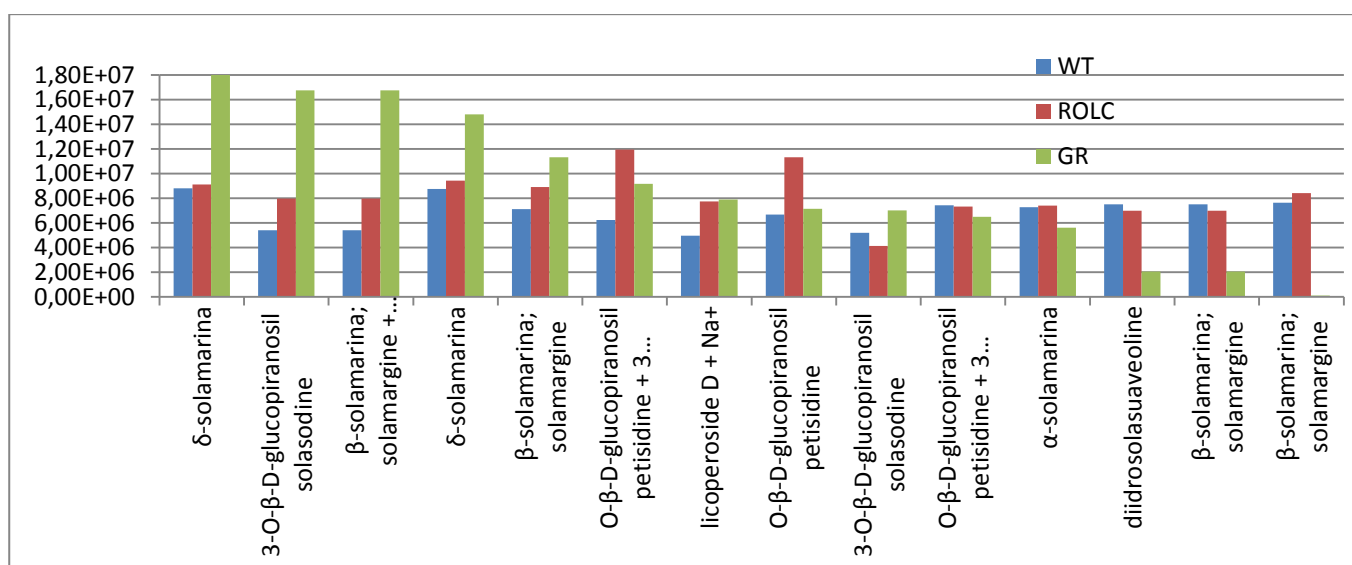


Figura 98 Dati suddivisione per modificazione genetica con ionizzazione positiva.

In figura 99 vi sono i metaboliti identificati selezionando i dati più significativi per i differenti stress.

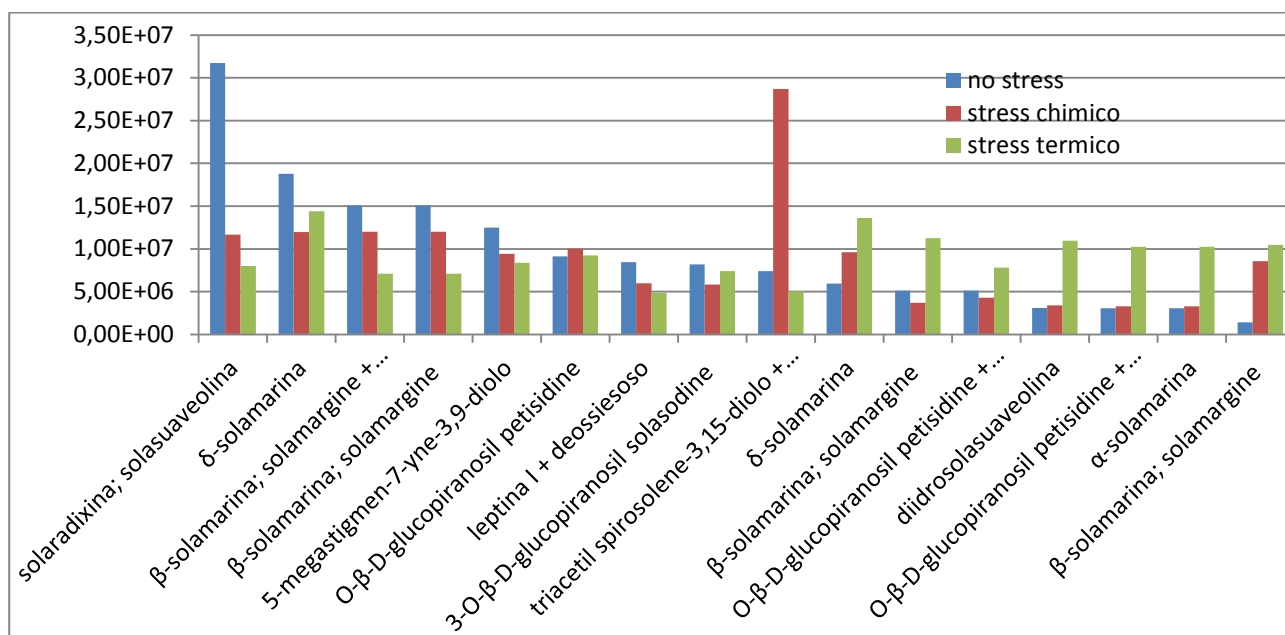


Figura 99 Dati suddivisione per stress con ionizzazione positiva.

In modo molto netto, in questo caso, si verifica il contenuto elevato di alcuni composti nella pianta non stressata: dopo lo stress risultano presenti in concentrazioni minori. Altri composti, invece, come previsto da studi di letteratura e dai dati ottenuti in ionizzazione negativa, sono presenti in concentrazione maggiore nei campioni sottoposti a stress termico. L'aumento in intensità di segnale dei metaboliti identificati è confermato anche nel foglio di lavoro dei dati estratti da PCA per lo stress termico: ogni molecola ha concentrazione maggiore rispetto al corrispondente campione, naturale e non, non stressato termicamente.

Anche per questo tipo di composti lo stress chimico non comporta una significativa diversità rispetto ai campioni non stressati.

Osservando i tempi di ritenzione, si nota come i composti maggiormente presenti in campioni stressati termicamente eluiscano per primi e perciò abbiano caratteristiche più polari rispetto agli altri identificati.

4.4.5 COMPOSTI DITERPENICI

Tra i composti maggiormente significativi identificati in questo lavoro di tesi vi è un gruppo di composti diterpenici glucosilati come nicotianoside, capsianoside o liciumoside.

I diterpeni glucosilati sono dei composti costituiti da una base diterpenica C₂₇ ciclica o aciclica a cui sono legati una o più unità di zucchero (glucosio o ramnosio) e in alcuni casi da uno o più gruppi malonici, solitamente connessi al gruppo ossidrilico C'6 del glucosio (figura 100).

I diterpeni glucosilici sono stati isolati in molte piante della famiglia delle *Solanaceae* tra cui *Nicotiana* e *Capsicum*. Tali composti sono riconosciuti per le loro applicazioni in campo medico (87).

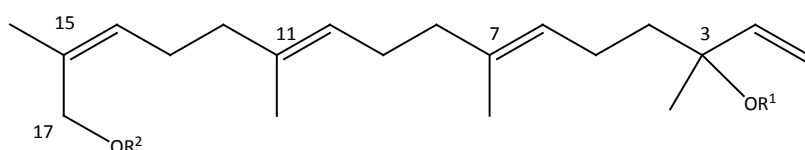


Figura 100 Struttura di un generico diterpene glucosilico.

Per i composti identificati lo scheletro di base è il 17-idrossigeranillinalolo (HGL), in cui i carboni interessati al legame con gli zuccheri sono C3 e C17.

I composti diterpenici sono composti di difesa in risposta all'attacco di erbivori, la cui produzione è regolata ancora una volta dal meccanismo biosintetico dell'acido jasmonico, responsabile della sintesi di molti metaboliti-segnale in seguito a stress biotici o abiotici a cui la pianta può essere esposta (87).

I principali derivati del 17-idrossigeranylinalool sono i composti liciumoside e nicotianoside. La via metabolica è rappresentata in figura 101.

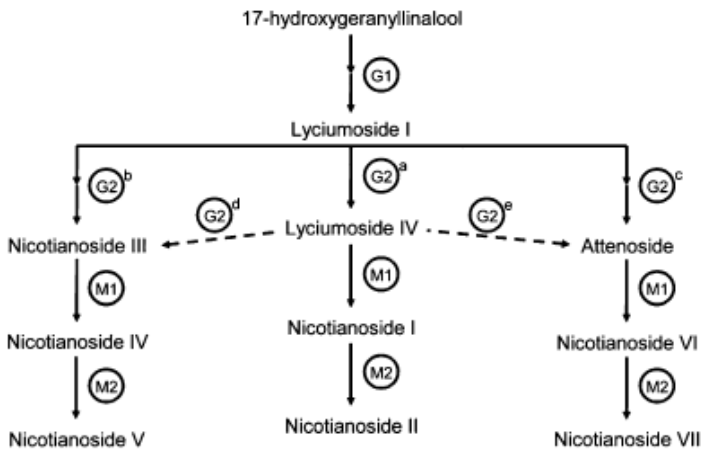


Figura 101 Meccanismo biosintetico diterpeni glucosilici (87).

La via metabolica è rappresentata in figura 101.

Dalla glicosilazione di HGL si ottiene il primo composto del gruppo, liciumoside I, privo di gruppi malonici, a differenza di nicotianoside III, liciumoside IV, e attenoside che ne possiedono uno. Con una reazione di malonilazione si ottengono rispettivamente nicotianoside IV, nicotianoside I e nicotianoside VI. Un'ulteriore malonilazione, infine, porta alla sintesi di nicotianoside V, nicotianoside II e nicotianoside VII (87).

Negli studi presenti in letteratura, i composti diterpenici sono stati identificati in modalità di ionizzazione positiva, solitamente con l'addotto ammonio: nel presente lavoro la maggior parte dei metaboliti è stata rilevata come $[M-H]^-$ o $[M+AF]^-$.

In assenza di dati relativi alle modificazioni genetiche, si può valutare l'andamento dell'intensità di segnale dei vari composti in campioni differenti per stress subito.

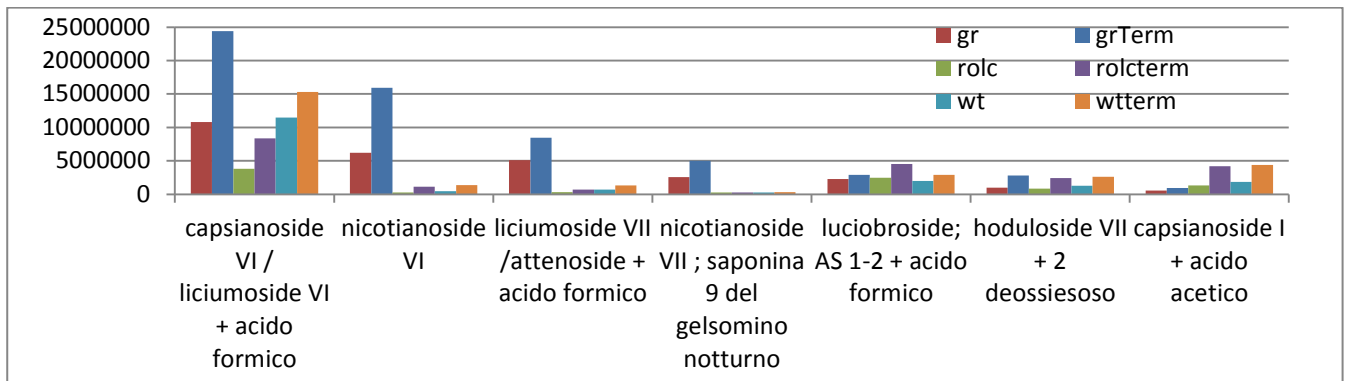


Figura 102 Metaboliti identificati in modalità di ionizzazione negativa mediante PCA stress termico.

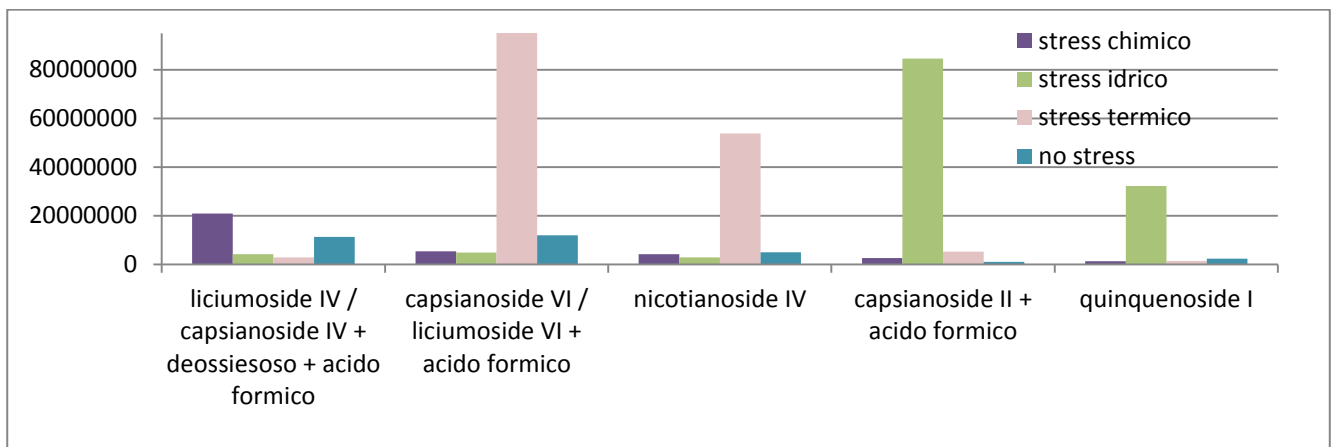


Figura 103 Metaboliti identificati in modalità di ionizzazione negativa mediante suddivisione per stress.

Analizzando i dati estratti dall'analisi PCA per lo stress termico (figura 102), si osserva un aumento più o meno marcato del contenuto per tutti i metaboliti presenti in campioni di *Nicotiana* stressati termicamente rispetto al corrispondente campione non stressato. Dai dati della suddivisione per differenti stress (figura 103), si evidenziano composti nettamente prevalenti per un unico stress: liciumoside VI e nicotianoside IV sono metaboliti segnale dello stress termico, mentre capsianoside II e quinquenoside I per lo stress idrico. In letteratura mancano riferimenti a questo particolare andamento.

4.4.6 COMPOSTI VARI

Oltre ai gruppi analizzati nei paragrafi precedenti ci sono molti altri composti singoli, con una propria funzione ma presenti in numero limitato. Tra questi si ricorda la grossamide, la clorofilla b e i derivati feoforbide a e b.

Grossamide è un'ammide fenolica, isolata in campioni di peperoni, appartenenti anch'essi alla famiglia delle *Solanaceae*, sintetizzata dalle reazioni di coupling ossidativo tra due unità di N-feruloil tiramina (88). Tale molecola è presente sotto forma di vari isomeri a diversi tempi di ritenzione, sia in modalità di ionizzazione negativa che positiva. I frammenti di massa confermano la struttura simmetrica, e perciò l'identificazione, della molecola.

La clorofilla b, fotorecettore indispensabile per le piante, ionizza in modalità negativa, mentre i precursori feoforbide, presenti tal quali o metilati, ionizzano più facilmente in positivo e in particolare in campioni stressati termicamente.

In letteratura vi sono molti studi legati alla presenza di clorofilla (a e b) in campioni stressati idricamente. In condizioni di mancanza di acqua, la pianta risponde con l'aumento della sintesi di clorofilla, considerata uno dei composti solubili in grado di evitare l'alterazione del metabolismo, crescita e sviluppo della pianta stessa (46).

4.5 Identificazione mirata di metaboliti

Dopo aver effettuato l'analisi metabolomica dei campioni di *Nicotiana*, si è deciso di ricercare in maniera mirata la presenza di composti particolarmente significativi, non emersi dalla precedente analisi: in letteratura si trovano numerosi articoli legati alla modificazione genetica rol C e agli stress subiti da sistemi vegetali e sulla base dei quali derivano composti di risposta al danno subito. La ricerca è stata effettuata sulla base della massa esatta del composto di interesse, sui tempi di ritenzione e sulle eventuali frammentazioni che confermano la presenza di tale analita nel campione.

Gli analiti considerati sono: acido caffeico, acido 3-caffeoilchinico (clorogenico), acido 4-caffeoilchinico (criptogenico), acido 5-caffeoilchinico (neoclorogenico), acido ferulico, saccarosio, acido salicilico, esculetina, scopoletina e prolina.

Tra i composti fenolici, i più largamente diffusi in piante, fiori, vegetali, erbe e spezie, vi sono gli acidi idrossicinnamici e i loro derivati. È dimostrato che questi composti aromatici possiedono svariate attività biologiche tra cui le proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie, possiedono caratteristiche anti-epatotossiche, inibiscono la mutagenesi e la carcinogenesi e rallentano il processo di invecchiamento (89).

L'acido idrossicinnamico più comune è l'acido caffeico e i derivati sono soprattutto prodotti di combinazione con l'acido chinico, zuccheri o con ammine.

Tra i composti studiati l'acido caffeico, i tre isomeri dell'acido caffeoilchinico e acido ferulico sono i più diffusi e abbondanti.

La discriminazione dei tre isomeri dell'acido caffeoilchinico avviene sulla base delle intensità relative di segnale dei diversi ioni frammento: nella tabella che segue, si evidenziano le intensità di segnale dei frammenti principali dei tre isomeri in valore percentuale. Questi dati sono ricavati da studi di letteratura (90) e rispettano, nell'ordine di grandezza, le intensità di segnale ricavate dai dati reali.

In questo lavoro di tesi, la distinzione dei tre isomeri è possibile grazie all'elevata accuratezza di massa e risoluzione dello spettrometro di massa utilizzato e alle frammentazioni degli ioni genitori effettuate in fase di analisi strumentale.

Tabella 8 Intensità relative percentuali ioni frammenti isomeri acido caffeoilchinico (90).

	m/z	Intensità (%)		m/z	Intensità (%)		m/z	Intensità (%)
acido 3-caffeoilchinico	135	1	acido 4-caffeoilchinico	135	8	acido 5-caffeoilchinico	135	0
	173	0		173	100		173	0
	179	6		179	46		179	34
	191	100		191	14		191	100

In grassetto, in tabella 8, è evidenziato il picco base di ogni isomero.

In modalità di ionizzazione positiva la distinzione non è stata possibile: l'unico ione frammento prodotto dallo ione molecolare protonato è a $m/z=163$ per tutti e tre gli ioni, che sono stati perciò distinti unicamente dal differente tempo di eluizione dello ione genitore $m/z=355$.

Nessun dato di letteratura riporta altri frammenti oltre allo ione a $m/z=163$ per la ionizzazione positiva (90).

Generalmente lo stress chimico, come l'esposizione a Cr^{VI} , indotto nella pianta, produce un aumento di concentrazione di questi composti rispetto alle piante non stressate: questo andamento si verifica anche in piante geneticamente modificate rispetto alle corrispondenti piante non stressate (91).

La presenza di metalli come Cd o Cr nelle piante, a basse concentrazioni determina la riduzione della sua crescita, ad alte concentrazioni porta la pianta anche alla morte, precedentemente annunciata dalla presenza di aree di necrosi sulla superficie delle foglie (45).

Nello studio presentato da M. del Bubba (91), si dimostra che la concentrazione relativa dei vari composti fenolici in esame nel germoglio è maggiore di quella nelle radici a causa delle reazioni di fotosintesi che avvengono nella parte della pianta esposta alla radiazione luminosa. Inoltre in linea di massima le concentrazioni di composti idrossicinnamici in piante soggette a inserimento del gene GR sono maggiori rispetto alle piante wild-type: la cosa è maggiormente evidenziata nei germogli. Nelle piante rol C è evidente, nei campioni delle radici, un aumento di concentrazione per l'acido 3-caffeoilchinico rispetto al germoglio (91).

In questo lavoro di tesi la macinazione del campione è avvenuta a partire dall'intera pianta, senza mantenere la differenziazione tra radici e fusto: non è stato perciò possibile verificare tutte le considerazioni appena descritte.

Nelle figure sottostanti sono rappresentati gli andamenti di concentrazione dei composti presentati precedentemente, analizzati sia con ionizzazione negativa che positiva.

Per quanto riguarda le intensità di segnale e i tempi di ritenzione si rimanda alle tabelle presenti nell'appendice II.

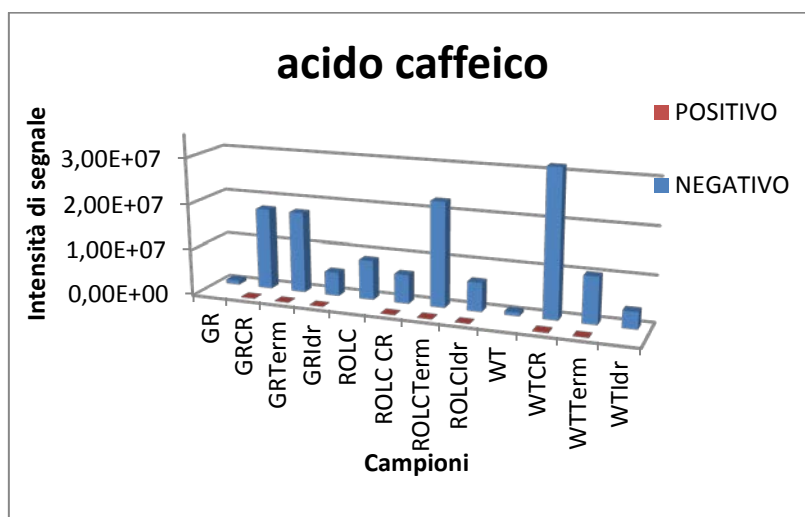


Figura 104 Concentrazione acido caffeico nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

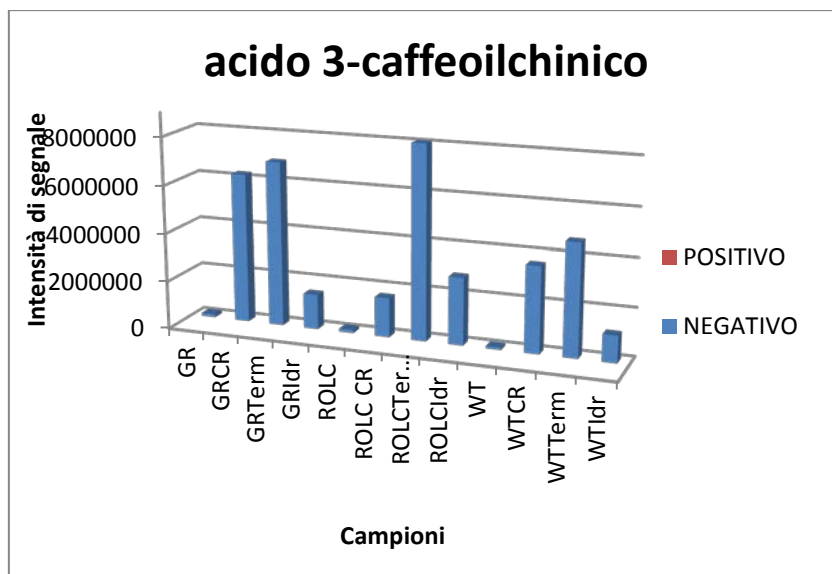


Figura 105 Concentrazione acido 3-caffeoilchinico nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

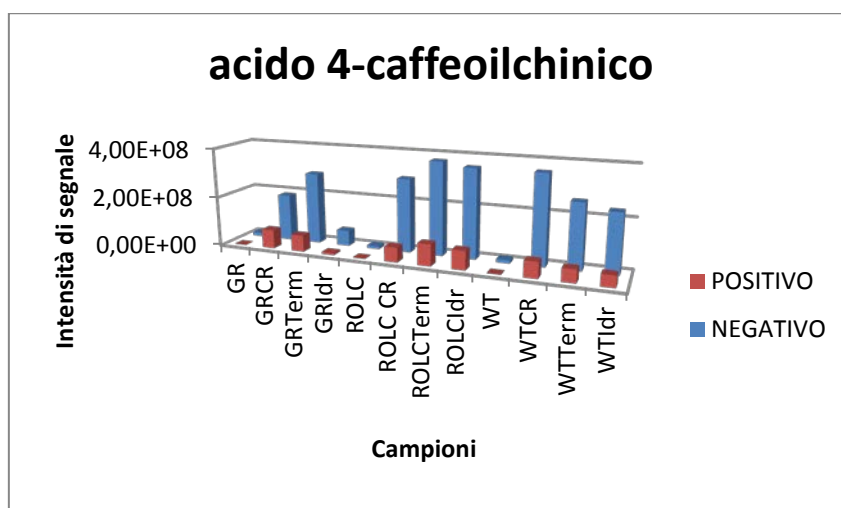


Figura 106 Concentrazione acido 4-caffeoilchinico nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

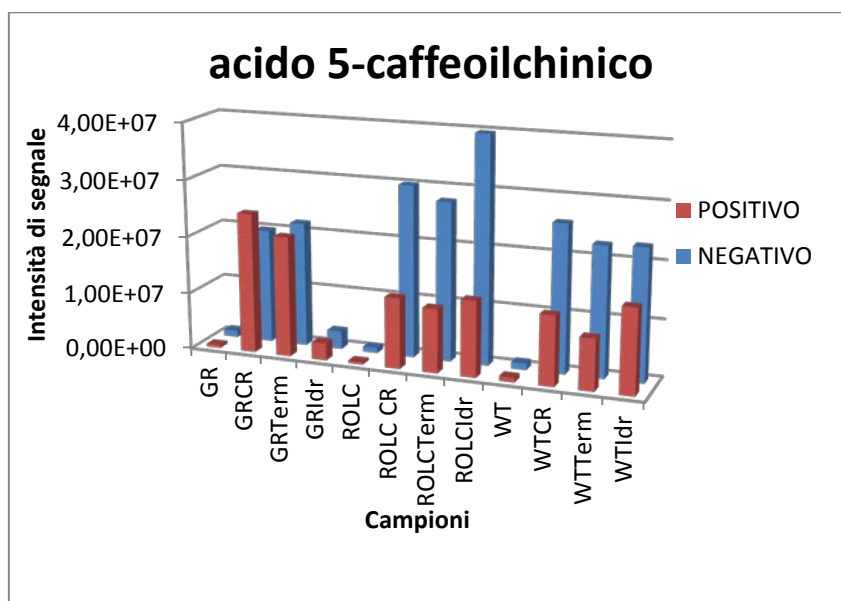


Figura 107 Concentrazione acido 5-caffeoilchinico nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

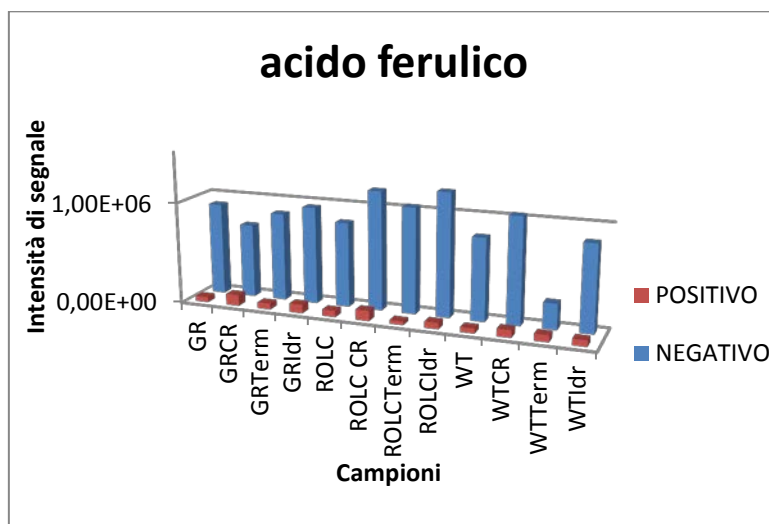


Figura 108 Concentrazione acido ferulico nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

Dalle analisi effettuate su campioni di *Nicotiana Langsdorffii*, per quanto riguarda lo stress chimico, emerge innanzitutto che questi composti, ad eccezione dell'acido 5-caffeoilchinico, in modalità di ionizzazione positiva, abbiano una concentrazione molto bassa rispetto a quella negativa. Vista la loro natura acida, dalla molecola di base si preferisce la perdita di un protone piuttosto che l'aggiunta: verifica ne sia il maggior contenuto nei dati delle analisi in modalità negativa.

In queste analisi si confermano i risultati ottenuti in lavori precedenti: è evidente il significativo aumento della loro concentrazione nelle piante stressate, ad eccezione dell'acido ferulico, nel campione GRCR, per il quale le concentrazioni sono pressoché stabili (figura 108).

Esculetina e scopoletina sono anch'essi composti fenolici ma alla base vi è una struttura cumarinica. La cumarina è nota soprattutto per il caratteristico odore di erba appena tagliata e poiché favorisce il drenaggio della linfa all'interno della pianta.

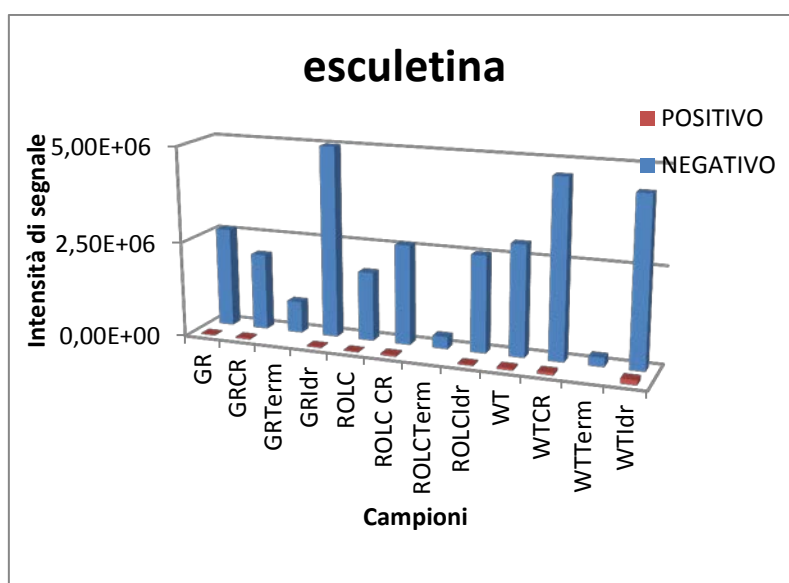


Figura 109 Concentrazione esculetina nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

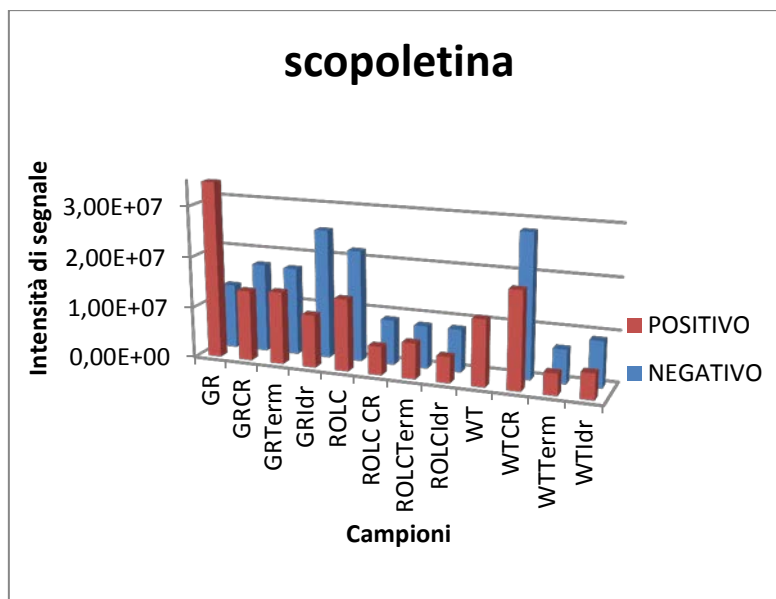


Figura 110 Concentrazione scopoletina nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

Il campione GR in entrambe le analisi mostra un andamento differente da quello atteso. Per i campioni wild e modificati per il batterio rol C invece si evidenzia ancora una volta un aumento di concentrazione nei campioni stressati chimicamente.

Tra gli zuccheri, glucosio e saccarosio sono evidenti segnali della presenza o assenza del cromo nella pianta: nelle piante non stressate le concentrazioni di zuccheri sono molto più basse rispetto alle piante stressate chimicamente. Nello specifico, nei campioni di radici il saccarosio mostra una brusca diminuzione quando è sottoposto a stress chimico. Inoltre per le piante geneticamente modificate i livelli sono pressoché uguali (91).

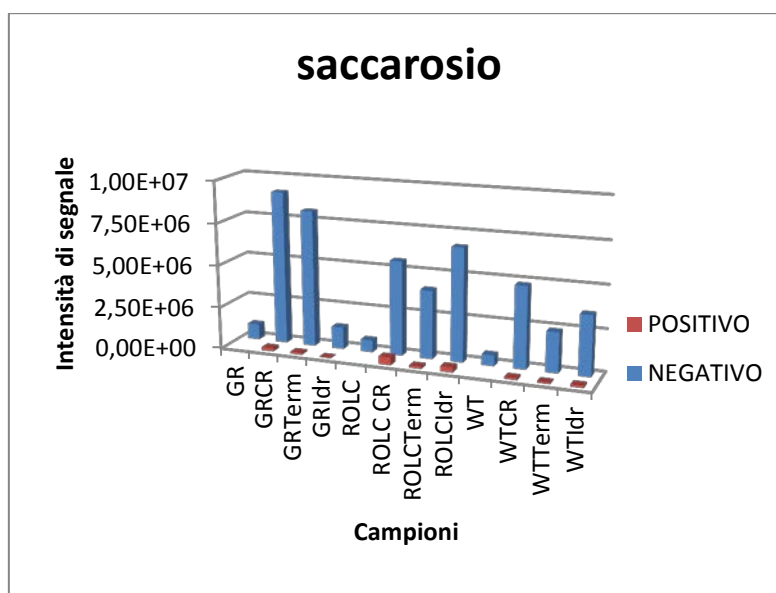


Figura 111 Concentrazione saccarosio nei campioni analizzati, in modalità positiva e negativa.

In figura 111, si nota la notevole differenza in intensità di segnale tra la pianta non stressata e quella soggetta all'esposizione al cromo esavalente.

la fotosintesi, la respirazione e la stabilità di membrana, che comporta il rallentamento della crescita e dello sviluppo della pianta stessa. Gli effetti più evidenti sono dovuti alla denaturazione delle proteine, all'aumento della fluidità dei lipidi di membrana o alla disattivazione di enzimi presenti in mitocondri e cloroplasti.

L'esposizione prolungata ad alte temperature causa una diminuzione nel contenuto di clorofilla, la disintegrazione dei grani di tilacoidi e l'interruzione dei sistemi di trasporto di alcune molecole. Come risposta allo stress, per alleviare il danno cellulare, la cellula stessa provvede alla produzione e all'accumulo di metaboliti con proprietà antiossidanti come acidi cinnamici, flavonoidi antocianine e lignine (92).

La prolina e la glicina betaina si accumulano nelle piante superiori in condizioni di stress poiché la loro sintesi è in grado di tamponare il potenziale redox cellulare modificato (48).

Un altro segnale identificativo dello stress termico è il lieve aumento nella concentrazione di nicotina nelle foglie (nelle radici diminuisce): nella figura 84 si nota questo aumento (93).

Nelle analisi sperimentali si è verificato un livello di concentrazione sempre piuttosto elevato rispetto ai campioni non sottoposti a stress. In linea di massima i livelli di intensità di segnale per i campioni di piante sottoposte a stress termico sono minori di quelli chimicamente stressati, ma notevolmente maggiori delle piante non stressate.

Si evidenzia un caso particolare: lo stress termico riduce, anche sotto il limite di rilevabilità, il contenuto di esculetina, come dimostrato nel lavoro di M. del Bubba (91).

Gli effetti causati dall'alta temperatura sono strettamente correlati alla carenza di acqua: durante il giorno la traspirazione, come l'alta temperatura per evaporazione sia di giorno che di notte, provoca la perdita di acqua all'interno della pianta (48).

La principale conseguenza dello stress idrico è l'aumento dell'idrolisi di macromolecole come proteine e zuccheri: molto frequente è l'identificazione in questi campioni di amminoacidi liberi e mono- e disaccaridi. La presenza di amminoacidi e zuccheri semplici è correlabile all'aumento della tolleranza della pianta nei confronti dello stress subito. In alcuni casi, la prolina viene aggiunta dall'esterno per ristabilire i cicli di crescita e sviluppo danneggiati dallo stress idrico subito (46).

Rispetto a quanto detto, i dati sperimentali mostrano un aumento rilevante nei livelli di concentrazione di prolina in seguito a stress idrico nei campioni modificati ROLC e GR rispetto ai corrispondenti campioni non stressati (per ciascuna replica dei campioni ROLC idrico l'intensità di segnale è addirittura cinque volte quella del campione ROLC).

Nei campioni non geneticamente modificati l'intensità nel campione stressato è minore di quello naturale. I livelli di concentrazione verificati sperimentalmente per il disaccaride saccarosio confermano il medesimo comportamento: si evidenzia un notevole aumento nei campioni stressati rispetto a quelli naturali.

Tutti gli altri composti analizzati seguono le considerazioni fatte: la concentrazione aumenta con lo stress e i livelli dei campioni WT restano comunque più bassi di quelli delle piante geneticamente modificate.

5. Conclusioni

Alla fine del presente lavoro si riassumono i risultati ottenuti.

I 12 campioni di piantine di *Nicotiana Langsdorffii* e i 3 bianchi sono stati preparati secondo una procedura nota in letteratura, adatta all'estrazione del numero maggiore possibile di analiti per effettuare una completa analisi qualitativa del sistema in esame.

Dopo la preparazione dei campioni è seguita la fase strumentale del presente lavoro: gli analiti presenti nei campioni sono stati dapprima separati attraverso un cromatografo liquido ad alte prestazioni e in seguito separati in base al rapporto m/z in uno spettrometro di massa (orbitrap).

Gli spettri ottenuti sono stati elaborati attraverso l'eliminazione del rumore di fondo, l'allineamento dei tempi di ritenzione e del numero di scan dei vari ioni a determinato rapporto massa/carica (MetAlign); in una seconda fase si sono individuati gruppi di ioni simili correlati, riconducibili ad uno stesso metabolita, o cluster (MSClust) e, infine, sono stati selezionati manualmente i metaboliti più abbondanti o più significativi per i vari tipi di stress.

Dall'elaborazione dei dati sono risultati 335 metaboliti probabili per la modalità di ionizzazione negativa e 361 per quella positiva, per un totale di 696 metaboliti. Operando le opportune riduzioni e suddivisioni dei dati, sono stati selezionati gli analiti da identificare.

Grazie ai tempi di ritenzione, le frammentazioni di massa e il supporto dei dati presenti in letteratura e nei database online, è stato possibile identificare un numero altrettanto elevato di composti: 216 sono i metaboliti identificati tra gli analiti selezionati in modalità di ionizzazione negativa, 215 in quella positiva, tra cui vi sono una decina di analiti presenti sia in modalità di ionizzazione negativa che in quella positiva. I metaboliti cui non è stato possibile assegnare un nome o una formula bruta sono 22 per la ionizzazione negativa e 20 per quella positiva.

Attraverso svariate analisi statistiche sui dati raccolti, è stato inoltre possibile verificare la similitudine tra gruppi di composti o tra tipi di campioni: in primo luogo si è osservata la netta separazione tra i campioni sottoposti a stress termico e i restanti tipi di campioni, wild o stressati. Da tale risultato è stato possibile selezionare, attraverso l'estrazione dei loading dei centrotipi (PCA), alcuni metaboliti specifici e identificativi della risposta metabolica della pianta allo stress subito.

Si è inoltre verificata l'omogeneità dei campioni in esame: essi si presentano raggruppati per replica dello stesso tipo di campione e per tipo di stress subito nell'analisi PCA della prima e seconda componente principale (figura 69). Con la seconda e terza componente principale, invece, si distingue nettamente il gruppo di campioni sottoposti a modificazione per il gene GR: i campioni WT e ROL C non sono distinguibili per modificazione genetica ma solo per stress (figura 70).

Le analisi PCA sono state effettuate con i dati ottenuti con la ionizzazione negativa, con quella positiva e riunendo i dati insieme, in seguito all'opportuna scalatura degli stessi. I risultati enunciati sono pressoché uguali in tutte le analisi fatte.

Per quanto riguarda l'analisi dei cluster, analizzando tutti i dati, è evidente la separazione del gruppo di composti GRidrico e GRCR rispetto ai campioni modificati per il gene GR ma anche dai corrispondenti campioni stressati allo stesso modo (figura 73). In futuro, potrebbe essere interessante studiare i centrotipi significativi per i campioni GRidrico e GRCR e identificare i metaboliti compresi, cosa che non è stata possibile in questo lavoro di tesi a causa del numero elevato e della difficoltà riscontrata nel separare gli specifici centrotipi. Tale studio, vista anche l'assenza in letteratura di interesse nei confronti della modificazione genetica per il gene GR, potrebbe evidenziare gli elementi che diversificano tali campioni dagli altri e individuare la via metabolica responsabile della sintesi di eventuali analiti selezionati.

Tenendo presenti i risultati ottenuti, dalle suddivisioni dei dati, sono stati identificati 431 metaboliti. Dagli istogrammi presenti nelle figure 78-86 è possibile osservare la variazione di intensità di segnale tra stress o modificazioni differenti. Dei metaboliti identificati, è possibile selezionare i gruppi di composti presenti in

modo più abbondante nei diversi tipi di ionizzazione. Le classi studiate sono acil saccarosio, acidi grassi e derivati, poliammine, solanidine e composti diterpenici.

L'acil saccarosio è uno zucchero esterificato identificato unicamente in piante appartenenti alla famiglia delle *Solanaceae*, da dati ottenuti sia in modalità negativa che positiva. In questo lavoro di tesi gli acil saccarosio identificati sono soprattutto tetra acil saccarosio e mostrano un aumento in intensità nei campioni stressati termicamente. I lipidi maggiormente presenti risultano i glucosilfosfoinositi, composti digalattosilici e monogalattosilici. Acidi grassi non glucosilati e composti fosforilati, tra cui PE, PA, PI e PG, sono composti costituenti della pianta e perciò presenti in modo costante nella pianta. Con la ionizzazione positiva si ottiene un numero inferiore di composti lipidici, tra i quali emergono anche sfingosine e ammidi legate a catene di acidi grassi (non ionizzate in modalità negativa), molecole di glicerolo con una o due catene di acidi grassi, prive di glucosidi. Dai centrotipi che si riferiscono allo stress termico si è verificata la presenza di glucoglicerolipidi, soprattutto MGDG e l'assenza di composti solfonati.

Le poliammine identificate nel presente lavoro sono putrescina e spermidina, coniugate ad una o due molecole di acido caffeico o ferulico, prodotte come risposta a stress o modificazioni genetiche.

Un gruppo appartenente unicamente alle molte piante della famiglia delle *Solanaceae* è quello delle solanidine. Esse sono state identificate in numero maggiore tra i dati ottenuti con ionizzazione positiva e soprattutto nei campioni modificati per il gene GR. Analizzando i dati significativi per differenti stress, si nota un loro lieve aumento in intensità di segnale in campioni sottoposti a stress termico.

I composti diterpenici glucosidici come nicotianoside, capsianoside e liciumoside sono risultati indicatori di stress termico in modalità di ionizzazione negativa.

La nicotina, alcaloide tossico ovviamente presente in piante di *Nicotiana*, ionizza solo in polarità positiva ed è presente in livelli molto elevati in tutti i campioni. L'intensità di segnale è pressoché uguale in tutti i campioni: un lievissimo aumento può essere osservato nei campioni stressati termicamente.

Nella prima parte della corsa cromatografica sono stati eluiti molti amminoacidi, composti polari costituenti primari del sistema in esame.

Vi sono infine altri composti identificati che presentano una funzione all'interno della pianta come acidi caffeoilchinici, ferulico o prolina, descritti nel capitolo 4.5. L'acido caffeico, l'acido 3- e 4-caffeoilchinico non ionizzano in positivo, sono assenti in campioni non stressati, mentre sono presenti con intensità di segnale elevate in campioni stressati chimicamente o termicamente. L'acido 5-caffeoilchinico, invece, presenta notevole ionizzazione anche in positivo: nei campioni non stressati rimane assente. Tra questi, l'acido 4-caffeoilchinico è presente con intensità maggiore e rappresenta il composto presente nel picco cromatografico principale del cromatogramma dei campioni sottoposti a ionizzazione negativa.

L'esculetina presenta un incremento notevole quando i campioni sono soggetti a stress idrico: essa è responsabile del flusso della linfa all'interno della pianta e perciò, in situazioni idricamente sfavorevoli, viene sintetizzata in quantità maggiore per porre rimedio all'eventuale danneggiamento delle funzionalità della pianta. Il saccarosio, praticamente assente nei campioni di pianta wild, rappresenta una molecola segnale della modificazione genetica.

Concludendo, tale studio dimostra le potenzialità dell'analisi metabolomica nel campo della ricerca biologica, ponendosi come disciplina integrativa tra lo studio dei sistemi biologici, la bioinformatica e la chimica analitica. Dato l'elevato numero di metaboliti identificati attraverso una metodica standardizzata e basata su criteri statistici, tale studio può fornire un importante contributo alla caratterizzazione della risposta sistemica e metabolica delle piante a differenti stress abiotici. Sono state inoltre evidenziate alcune differenti risposte legate alla modificazione genetica applicata, in particolare nel caso dell'introduzione del gene codificante per GR; data la scarsa letteratura presente sul tema, tale studio può costituire un importante punto di partenza per approfondire il ruolo di questo gene nella risposta a stress ambientali, anche nel contesto dell'applicazione in campo agronomico.

Appendice I

IONIZZAZIONE NEGATIVA

Tabella 9 Metaboliti identificati in modalità di ionizzazione negativa.

<i>massa</i>	<i>formula</i>	<i>errore</i>	<i>molecola</i>	<i>l.i.</i>	<i>frammenti</i>
128.03552	C5H7NO3		N-acriloil glicina	2	-
128.03552	C5H7NO3	1.5	N-acriloil glicina	2	-
128.03552	C5H7NO3		N-acriloil glicina	2	-
164.0717	C9H11NO2	-0.01	L/D-fenilalanina	2	147.04530 ; 129.80104; 118.13691; 103.05540 ; 72.39491; 66.09728
172.09795	C8H15NO3	-0.2	isovalerilalanina; N- isovalerilglicina metil estere; isovalerisarcosine; esanoglicina; N-acetil leucina; acexamic acid	3	130.08762
187.0977	C9H16O4	0.6	acido nonanedioico	2	125.09743
188.05624	C7H11NO5	-1.1	acido N-acetil glutammico	2	-
191.03477	C10H8O4	-1.1	scopoletina	2	176.01160; 163.04079; 148.01720; 66.09732
200.05623	C8H10NO5	-1.8	frammento di 2-deossi-2,3- deidro-N-acetilneuraminico	2	182.04616; 156.06683; 140.03557; 128.03558 ; 110.02503; 152.03563; 82.03018; 66.09563
206.04919	C7H13NO4S	-0.3	isobuteina	2	-
206.08212	C11H12NO3	-0.7	N-acetil-D-fenilalanina	2	164.07050 ; 147.04417
210.07716	C10H13NO4	-0.1	enicoflavine; acido 3,4- diidrossifenil-1-metil estere- carbammico	3	124.03988
230.06673	C9H13NO6	-1.2	acido N-succinil-L-glutammico 5-semialdeide; acido N-acetil-L- ammino-6-ossopimelico	3	-
240.05103	C10H11NO6	-1.4	N-(2,3-diidrossibenzoil)-L-serina	3	222.04071; 196.06151; 124.04066 ; 115.00393; 66.09714
241.08267	C10H14N2O5	-2.4	timidina	2	-
241.11925	C11H18N2O4	-0.5	4,8-diidrossi-2,9- undecadienediammide	3	197.12946 ; 169.13428; 167.03519; 141.10327 ; 130.08760; 127.05133; 82.03002

243.06197	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	-1.2	uridina; pseudouridina	2	225.05170; 200.05641 ; 152.03558; 170.04985; 140.03560; 124.04052 ; 110.02506; 97.88329; 82.03006; 66.09731
243.1235 (225+ 18)	C ₁₂ H ₁₈ O ₄ + H ₂ O	-1.2	acido 12-idrossijasmonico + H ₂ O	3	225.11322 ; 181.12350
245.09309	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	-0.3	acido 1,2,3,4-tetraidro-1-(idrossimetil)-β-carbolino-3-carbossilico; N-acetilriptofano	3	203.08224 ; 201.10361
246.09802	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₆	-1.2	linamarina; valinopina	3	228.08771 ; 210.07726; 130.08766
249.12431	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	-0.6	N-caffeoil putrescina	2	234.10088; 207.11394; 149.04825 ; 135.04543 ; 134.02487; 66.09727
254.06671			DIMBOA + COO-	4	236.05637; 218.04555; 210.07715; 208.06084; 192.06635; 174.05589; 129.01932; 124.04069; 94.03001; 66.09732
262.05643	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₈	-1.6	acido ascorbalamico	2	244.04617 ; 226.03584; 218.06699; 128.03560
265.18015	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	-2.6	acido 1a,1b-dinor-10,11-diidro-12-oxo-15-fitoenoico	2	247.16942; 207.13831; 203.17998; 221.19031
275.10355	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₄	-0.6	N-acetil-metossi triptofano	3	-
277.21658	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-2.6	catena C ₁₈ con 3doppi legami	2	275.20135; 259.20590; 233.22697; 213.85474; 191.53889; 125.53001; 101.40262; 72.39489
279.23209	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-2.4	catena C ₁₈ con 2doppi legami o uno triplo, carbossile o acetato terminale, lineare o ramificata	2	261.22168; 243.21080; 66.09720
290.08755	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₈	-2	acido 2-deossi-2,3-deidro-N-acetilneuraminico	2	272.07718; 254.06677; 230.06691; 200.05624 ; 128.03548
290.08755	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₈		acido 2-deossi-2,3-deidro-N-acetilneuraminico	2	-
M + 1 di 290.08755	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₈		acido 2-deossi-2,3-deidro-N-acetilneuraminico	2	-
292.1395	C ₁₂ H ₂₃ N ₂ O ₇	-2.3	N-(1-deossi-1-fruttosil) leucina	2	273.08072; 262.22086; 255.07013 ; 237.05963; 231.07014; 213.05951; 201.05959 ; 171.04918; 129.03877; 128.03549

293.0983	C18H18N2O8	-2.5	N-glicosil-L-asparagina	2	275.08798; 245.07753; 203.06703 ; 173.05673; 131.04625; 114.01981; 95.02513 ; 66.09718
293.21124	C18H30O3		acido idrossilinenolico	2	275.20090; 211.13359; 265.21677; 195.13881; 177.12810; 66.09716
295.22757	C18H32O3	-1	acido idrossilinoico	2	277.2169; 195.1390; 171.1027; 179.1442; 66.0975
297.1087 (151 + 146)	C7H8N2O2 + C6H10O4	-0.7	N'-metil piridone carbrossammide + deossiesoso	2	278.06686; 260.05618 ; 211.07240; 151.05150 ; 108.04573 ; 66.09720
297.11853	C11H22O9	-1.9	2-metil-O-β-D-glucopiranosil-D- eritritolo	2	-
297.24246	C18H34O3	-3.6	acido idrossiottadecenoico	2	-
299.07697	C13H16O8	-0.9	acido salicilico β-D-glucosilato	2	137.02458
307.1293 (263 + 46)	C14H20N2O3 + CH2O2	-2.1	fenilalanil-valina; feruloil putrescina; valil-fenilalanina + acido formico	3	263.13983
307.19058	C18H28O4	-2.9	diidrocapsiate; acido grasso corchori A/D	3	289.18008 ; 235.13370; 209.11818; 185.11813; 121.06603
308.07693	C14H15NO7	-2.1	acido N-feruloil aspartico	2	290.06567; 264.08655; 246.07622; 193.04977 ; 149.06044; 132.02995
308.07724	C14H15NO7	-1.1	acido N-feruloil aspartico	3	-
309.20636	C18H30O4	-2.5	acido idroperossi ottadecatrienoico	2	291.19531 ; 273.18503 ; 251.16400; 247.20576; 239.16443 ; 229.1953; 221.15401; 209.11765; 195.13841; 183.10219; 179. 14381 ; 171.10225; 155.10736 ; 139.11263
311.16769	C17H28O3S	-3	acido N-undecilbenzen solfonico	3	247.20596; 183.01166 ; 170.00407; 119.05018 ; 66.09720
311.18552	C18H32O4	-3.4	C18 PROB DICARBOSSILICO CON UN DOPPIO LEGAME	2	293.17484; 267.19571; 275.20081; 155.10762; 181.12311; 223.16978; 201.11272; 183.10236; 275.16412; 249.18510; 231.21082; 266.23441; 139.11281; 155.10759
312.09454 (266+ 46)	C10H13N5O4 + CH2O2	-1.3	adenosina + acido formico	2	266.08911; 134.04735

312.12326	C18H19NO4	-2.8	N-feruloil tiramina	2	297.10043;270.11353; 253.08638; 178.0511 ; 135.04544
315.07138 (153 + 146)	C7H6O4 + C6H10O4	1.1	acido diidrossibenzoico glucosilato + deossiesoso	2	225.04039; 165.01938; 153.01945 ; 109.02972 ; 66.09731
321.14508 (277 + 46)	C15H20N2O3 + CH2O2	-1.6	Leucina(/isoleucina)- fenilalanina + acido formico	2	303.06342; 277.15533; 162.0563; 179.0827; 233.1659; 122.02504
326.12378	C15H21NO7	-2.3	N-(1-deossi-1-fruttosil) fenilalanina	2	308.11365; 278.10312; 236.09280; 206.08231; 164.07188 ; 101.02469
327.21680	C18H32O5	-2.7	auxina a; acido triidrossiottadecadienoico	2	171.10280; 309.20679; 291.19638 ; 281.21234; 273.18607; 247.20618; 229.14456; 227.12840; 193.15941; 171.10280; 165.12828
329.08722	C14H18O9	-1.8	3'-glucosil-2',4',6'- triidrossiacetofenone	2	311.16058; 167.03500 ; 152.01155; 123.04528
329.23248	C18H34O5	-2.4	acido triidrossiottadecenoico	2	311.22232; 293.21201; 229.14452 ; 211.13396 ; 209.11800; 193.12325; 183.13876 ; 171.10280; 167.14400; 155.14412; 125.09725
333.12939	C13H22N2O8	-2.8	acido pseudaminico	2	287.34879 ; 272.07736; 269.11423; 254.06652 ; 239.10358; 212.05585; 191.08263; 179.08270; 149.07222; 89.02468; 66.09725
338.08759	C15H17NO8	-1.7	glucuronic-5-idrossi-6-metossi indolo	2	294.09717; 276.08667; 223.06046 ; 191.05566; 132.03009; 177.04289; 173.04495; 127.03952
343.10269	C15H20O9	-2.2	idrossi metossi acetofenone 6'- glucosilato	2	328.07962; 299.10336 ; 220.06151; 181.05072; 166.02078 ; 165.01915 ; 150.03201; 136.01662; 109.02969 ; 66.09727
343.21198 (289 + 3*18)	C18H36O3 + 3 H2O	-1.8	acido cromomorico C + 3 H2O	3	325.20148; 307.19092; 289.18045 ; 271.16965
349.11353 (331 + 18)	C14H20O9 + H2O	-1.9	leonuriside A + H2O	3	331.10275; 267.07169; 249.06126 ; 231.05083

351.12891	C14H24O10	-2.2	acido 2-[5-(D-glucopiranos-3-O-il) pentil] malonico	2	333.11853; 315.10760; 268.07526; 249.06133 ; 231.05057; 113.02453; 101.06076; 85.02959
351.14008	C13H24N2O9	-2.3	1,3 diramnosil urea	3	-
353.08701	C16H18O9	-2.2	acido 3-caffeoilchinico	2	335.08783; 191.05603 ; 179.03496; 135.04527
353.0875	C16H18O9	-1.2	acido 4-caffeoilchinico	2	191.05608; 179.03500; 173.04559 ; 155.03514; 135.04530
353.11353	C15H22N4O2S2	6.7	allitamina	4	309.12146 ; 265.13248; 191.05464; 179.03378
359.07623	C18H16O8	-2.8	trimetossi triidrossi flavone	2	344.05246 ; 329.02905 ; 323.1853; 314.00558; 305.17490; 301.03415 ; 286.01089
359.09781	C15H20O10	-1.6	diidrossi metossi acetofenone 6'- glucosilato	2	197.04539
367.10263	C17H20O9	-2.2	acido 5-O-feruloilchinico	2	191.05576 ; 173.04539; 127.04039
371.09781	C16H20O10	-1.5	acido diidroferulic 4-O-glucuronico	2	353.08755; 249.06146 ; 231.05115; 175.02492; 121.02976
371.16028	C20H24N2O5	-2.6	non identificato	4	149.06088 ; 134.03745 ; 66.09710
371.18182	C17H28N2O7	-1.5	lascivolo	3	353.17108 ; 335.16037; 225.11302 ; 309.18127; 186.11324; 145.06192
372.09293	C15H19NO10	-1.8	non identificato	4	249.06134
383.11862	C14H24O12	-2.3	acetil maltosio	2	-
387.09265	C16H20O11	-1.6	non identificato	4	249.06000 ; 137.02383
388.06442	C11H20NO12P	-1.6	acido N-acetilneuraminico fosfato	2	-
390.19101	C21H29NO6	-3.1	O-β-D-glucopiranosil ipalbidine	3	-
391.12390	C16H24O11	-2.2	acido carioptosidico	3	345.11847 ; 327.10791; 301.17615; 221.06659; 179.05612
399.09286	C17H20O11	-1.1	linderofruticoside A	3	353.08759; 191.03491 ; 176.01167; 148.01671
399.13217	C15H27O10S	-2.2	propil 2-S-α-D-glucopiranosil-2-tio-β-D-glucopiranoside	4	380.14566; 354.13031; 353.14194; ; 284.12451; 183.97498; 171.10554; 136.99147
401.0961	non identificato		non identificato	4	-
403.1716 (385 + 18)	C16H22N2O9 +H2O	-3.3	2'-deossi-2'-(2,3-diacetossipropil) uridina + H2O	3	385.16101; 343.15039; 313.13983 ; 241.11896

404.10364	C12H23NO14	-2.3	non identificato	4	341.10715 ; 242.05135
404.10382 (340 + 64)	C12H23NO10 + 64	-2.3	O-β-D-galattosil-D-N-acetil-glucosammina + 64	2	340.12381; 341.10806
411.17651	C19H28N2O8	-1.9	3' β-D-glucopiranosil N-caffeoil putrescina	2	393.16574; 375.15530; 351.15536; 321.14481 ; 291.13443; 249.06131
415.19617	C20H32O9	-2.8	acido etil 7-epi-12-idrossijasmonico glucosilato	2	369.19198; 225.06133; 179.05598 ; 161.04550; 143.03502
417.21228 (371 + 46)	C19H32O7 + CH2O2	-1.7	9-idrossi-7-megastigmen-3-one glucosilato + acido formico	2	371.20676 ; 179.05602; 161.0453
420.09283			non identificato	4	-
429.12399 (383 + 46)	C14H24O12 + CH2O2	-2.3	acetil maltosio + acido formico	2	-
431.21997	C21H37O7P	-1	acido fosfatidico (18:3/0:0)	2	363.21503; 338.42328; 317.20947; 295.22775 ; 277.21759; 171.00656; 152.99602
433.23444	C21H39O7P	-3.7	acido fosfatidico (18:2/0:0)	2	291.70773; 277.53760; 152.99544 ; 171.00587
439.08499	C19H20O12	-7.3	3,5-diidrossifenil 1-O-β-D-glucopiranosil-6-O-gallato	3	-
447.14990 (401 + 46)	C18H26O10 + CH2O2	-2.4	benzil β-primeveroside / benzil O-[arabinofuranosil-(1->6)-glucosilato] + acido formico	3	401.14438
451.21765 (405 + 46)	C19H34O9 + CH2O2	-1.8	kiwiionoside + acido formico	2	405.21194
451.21808 (405 + 46)	C19H34O9 + CH2O2	-2.3	kiwiionoside + acido formico	2	-
459.2229 (413 + 46)	C21H34O8 + CH2O2	-1.5	diidrossi-spirovetiven-2-one-glucosilato + acido formico	2	413.21393 ; 385.07343; 297.05881
461.12927 (415+46)	C18H24O11 + CH2O2	-1.7	2-idrossibenzaldeide O-[silosil-(1->6)-glucosilato] + acido formico	2	415.12347
461.23831	C22H38O10	-1.9	anatolioside	3	415.23178 ; 340.11765
468.21326	C25H31N3O6	-2.4	N,N'-dicaffeoil spermidina	2	426.20053; 332.15869 ; 306.17999; 289.15320 ; 264.16956; 247.14346; 261.12228; 135.04430
472.24429	C23H41NO7P	-5.7	lisofosfatidiletanolammina (18:4/0:0)	3	454.23398; 362.20770; 350.20789; 308.19742 ; 266.18662; 186.16087 ; 137.06073; 121.02952; 240.17012 ; 198.16086
474.17612	C18H29NO4 + C6H10O5	-1.7	N-feruloil tiramina	2	312.12332

474.26108	C23H42NO7P	-3.3	lisofosfatidiletanolamina (18:3/0:0)	2	277.21631 ; 275.20081; 259.20599; 233.22694
474.26108	C23H42NO7P	-3.3	lisofosfatidiletanolamina (18:3/0:0)	2	277.21631; 275.20081; 259.20599; 233.22694; 275.20081
479.26367	C26H40O8	-2.8	farbositide A	3	419.2424; 388.30548; 370.65302; 358.29501; 338.08813; 323.56332; 310.27386; 265.26294
481.25586	C22H43O9P	-2.8	fosfoglicerolo (16:1/0:0)	2	389.20984; 279.58063; 253.21712; 245.04312 ; 152.99605 ; 66.09751
483.27142	C22H45O9P	-2.9	fosfoglicerolo (16:0/0:0)	2	255.23193 ; 245.04231; 152.9955 ; 237.22159; 66.09727
484.24417	non identificato		non identificato	4	348.19080; 334.17538; 291.16989; 237.12329; 169.13431; 121.02937
484.29016	non identificato		non identificato	4	-
487.14801	C21H28O13	4.8	α -L-ramnopiranosil-(1->3)-1-O- caffeoil- β -D-glucopiranoside	3	-
491.13965 (445 + 46)	C19H26O12 + CH2O2	2	acido lucuminico + acido formico	3	445.13409 ; 323.09781; 328.11438; 310.10364 ; 154.06204
504.14999	non identificato		non identificato	4	
504.14999	non identificato		non identificato	4	486.13824; 468.12747; 424.13809; 389.12274 ; 388.13821; 371.11465; 341.10150 ; 263.07883; 193.05003; 192.06609; 181.05003; 151.03998
505.25571	C24H43O9P	-2.9	fosfoglicerolo (18:3/0:0)	2	413.21021; 397.80786; 325.58813; 277.21759 ; 275.20197; 265.53857; 259.20706; 233.22783; 179.18103;
515.13953 (353 + 162)	C16H18O9 + C6H10O5	-2.1	acido 5-caffeoilchinico + esoso	2	497.12918; 469.22910; 353.08698; 323.07651 ; 191.05594 ; 173.04543 ; 127.04024; 85.02966; 66.09734
537.32648	C26H50O11	-2.9	tetradecil 4-O-a-D- glucopiranosil-b-D- glucopiranoside	3	-
555.28336	C25H48O11S	-2	sulfochinovosilmonoacilglicerol o (16:0/0:0)	2	299.04404 ; 225.00754 ; 206.99701 ; 164.98657; 152.98669; 125.02486

559.31061 (513 + 46)	C27H46O9 + CH2O2	-2.8	galattopiranosil-linoleoil glicerolo + acido formico	2	513.30469 ; 277.21628; 253.09201
561.32629 (515 + 46)	C27H48O9 + CH2O2	-3	galattopiranosil-linoleoil glicerolo + acido formico	2	515.32001 ; 279.23190; 253.09201
570.1933 (326 + 244)	C15H21NO7 + 244	-2.3	N-(1-deossi-1-fruttosil) fenilalanina + 244	3	326.12369 ; 278.10327; 236.09258; 164.07167
571.28693	C25H49O12P	-3.4	fosfatidilinositolo (16:0/0:0)	2	391.22360; 315.04718; 255.23184; 241.01115; 237.22194; 223.00066; 152.99557
575.26941 (529 + 46)	C26H42O11 + CH2O2	-3.2	cinnassiola D2 glucosilata + acido formico	3	-
575.30646 (529 + 46)	C28H42N4O6 + CH2O2	-3.8	kukoamine + acido formico	3	529.29962 ; 253.09192
577.26715	C27H46O11S	-2.9	sulfochinovosildiacylglicerolo (18:3/0:0)	2	299.04269; 277.21603; 243.21603; 225.00650 ; 206.99605 ; 164.98593; 152.98608; 125.02431
577.32135	C27H50O10 + CH2O2	-2.8	non identificato	4	531.31464 ; 253.09177
578.30829 (518 + 60)	C27H41N3O7 + C2H4O2	-0.3	acido vignatico B + acido acetico	2	518.28711; 423.18567
579.20667	C28H36O13	-2.3	(+)-siringaresinol O-β-D- glucosilato	2	417.15439
579.28278	C27H48O11S	-2.9	sulfochinovosilmonoacylglicerol o (18:2/0:0)	2	299.04294 ; 279.23190; 225.00670 ; 206.99628 ; 164.98598; 152.98608; 125.02439
581.18262	C22H34N2O16	-2.4	acido 2-deossi-2,3-deidro-N- acetilneuraminico dimero	2	290.08704 ; 200.05597
581.18262	C22H34N2O16		acido 2-deossi-2,3-deidro-N- acetilneuraminico dimero	2	-
593.26208	C27H46O12S	-3.37	sulfochinovosilmonoacylglicerol o (18:4/0:0)	3	551.26563; 524.19019; 482.18076; 471.15204; 427.12585; 385.07922; 299.04291 ; 275.20078; 225.00667 ; 206.99649 ; 164.98605; 152.98637; 125.02438; 66.09728
593.27142	C27H47O12P	-3.1	lisofosfatidilinositolo (18:3/0:0)	2	467.21106; 413.20789; 315.04715; 277.21609 ; 241.01089; 233.22659 ; 259.20563; 152.99541
597.27478 (551 + 46)	C25H44O13 + CH2O2	-3.5	acil saccarosio (S3:12) + acido formico	2	467.21133; 425.16455; 407.15427
601.15186	non identificato		non identificato	4	-

607.25409	C35H36N4O6	-3.5	idrossi feoforbide a	3	575.22754 ; 563.26422; 531.23779; 519.27435; 504.25192; 487.24820 ; 475.24838; 459.54971; 405.36691; 384.17078
611.1438	C20H32N6O12S2	-1.4	glutazione ossidato	2	-
611.25403 (565 + 46)	C25H42O14 + CH2O2	-2.9	acil saccarosio (S3:13) + acido formico	2	565.24872; 523.23822; 481.19128; 467.17551; 425.16483; 505.22867
623.23792	C36H36N2O8	-3.2	grossamide	2	486.15308 ; 471.13031 ; 460.17419; 445.15137; 427.14050; 352.08105; 297.11187 ; 283.09644; 282.08862
623.23798	C36H36N2O8	-3	grossamide	2	460.17490 ; 446.15912; 445.15161; 350.13870; 283.09668; 268.07346
633.21429	C38H34O9	2	non identificato	4	-
639.28528 (593 + 46)	C27H46O14 + CH2O2	-3.3	acil saccarosio (S3:15) + acido formico	2	509.22150; 491.21133; 551.26825; 407.15417; 467.21136; 449.20059; 425.16464
641.24884 (623 + 18)	C36H36N2O8 + H2O	-2.5	grossamide + H2O	3	623.23816 ; 608.21423; 591.21106 ; 551.25293; 489.20187; 460.17471; 432.17993; 328.1181
642.29901 (M- 2H+2*46)	C57H94O26	-1.7	avenacina A-1 + 2 acido formico	3	619.29742 (1238.59484); 1193.59558; 596.29443 (1192.58886); 1047.53418; 1031.53931; 901.47650; 883.46655; 755.41895; 523.26324 (1046.52648)
644.24512	non identificato		non identificato	4	-
649.30646* 2 (M + 246 - 2H) 1207.60669 (M-H)	C58H96O26	-3	hoduloside VII + 2 deossiesoso	3	1207.60669; 1061.55078; 915.49347; 603.29974; 626.30273; 876.61737; 489.21439
651.34955	C31H57O12P	-2.9	fosfatidilinositolo (22:2/0:0)	2	-
653.30072 (607 + 46)	C28H48O14 +CH2O2	-3	acil saccarosio (S4:15) + acido formico	2	607.29437 ; 565.28387; 523.23737; 509.22171; 505.22699 ; 491.21130 ; 481.22638; 463.21619; 425.16470 ; 407.15222; 323.09613

665.41504	C37H63O8P	-5.9	acido fosfatidico (x:i/w:z)	3	633.38818 ; 615.37842; 589.39874; 354.08438; 337.08163 ; 311.10233; 310.09473; 309.08713; 296.07974; 295.07147; 293.09256; 282.0657; 267.11337 ; 188.03520
667.27979 (621 + 46)	C28H46O15 + CH2O2	-3.1	acil saccarosio (S4:16) + acido formico	2	621.27307; 579.26300 ; 537.21637; 523.23798; 509.22083; 495.20554 ; 491.21097; 477.19528; 449.16418
667.31647 (621 + 46)	C29H50O14 + CH2O2	-2.7	acil saccarosio (S3:17) + acido formico	2	621.30884; 537.25201; 523.23651
681.29535 (635 + 46)	C30H50O17 + CH2O2	-2.8	acil saccarosio (S4:17) + acido formico	2	593.27850; 551.23218; 399.13882; 509.22162; 491.21194; 467.17404; 449.16391; 407.15405; 425.16434
681.29541 (635 + 46)	C30H50O17 + CH2O2	-3	acil saccarosio (S4:17) + acido formico	2	635.28906; 593.27844; 551.23199; 509.23199; 431.21826; 509.22141; 467.17490; 491.21085; 453.15906; 407.15411; 523.23694; 477.19525; 575.26898
695.31091 (649 + 46)	C30H50O15 + CH2O2	-2.8	acil saccarosio (S4:18) + acido formico	3	607.29370; 565.24725; 523.23682; 505.22678; 491.21121; 551.23138; 481.19012; 467.17474; 449.16388; 421.16721
699.37903 (653 + 46)	C31H58O14 + CH2O2	-2.4	digalattosilmonoacilglicerolo (16:0/0:0) + acido formico	2	653.37390 ; 415.14478 ; 397.13416 ; 375.12375; 361.11288; 323.09735; 305.08701; 287.07635; 253.09215; 235.08189 ; 179.05550; 161.04526; 143.03499; 125.02431
705.16583	C32H34O18	-2	kaemferolo 3-[2''',3''',4'''-triacetil- α -L-arabinopiranosil-(1->6)-glucosilato]	2	513.10217 ; 339.04965
709.3266 (663 + 46)	C31H51O15 + CH2O2	-2.7	acil saccarosio (S4:19) + acido formico	2	621.30994; 565.24786; 523.23755; 579.26343; 537.25232; 505.22681; 439.17984; 425.16412; 407.15372; 421.16937; 323.09695; 603.29980

712.53491 (666 + 46)	C39H73NO7 + CH2O2	-2.8	glucocerebroside + acido formico	2	550.48181; 532.47119; 514.46134; 502.46124; 463.45108; 340.28458; 324.25333; 312.25330; 306.24296; 278.24823; 271.22693; 270.24283; 225.22185
716.33606 (M+246-2H) 670.83099 (M-2H)	C45H76O18	-2	torvoside A/B + 3 deossiesoso	2	693.83350; 670.83099; 597.29938; 524.27124; 659.80945; 451.24249; 1341 massa vera. 903 massa base (451)
719.34814 (659 + 60)	C32H52O14 + C2H4O2	-1.9	capsianoside I + acido acetico	3	-
721.32648	non identificato		non identificato	4	-
721.36316 (675 + 46)	C33H56O14 + CH2O2	-2.8	digalattosilmonoacilglicerolo (18:3/0:0) + acido formico	2	675.35738 ; 415.14404; 397.13361 ; 374.50363; 323.09720; 305.08667; 287.07620; 253.09203; 235.08170
723.34375 (677 + 46)	C32H54O15 + CH2O2	-1	acil saccarosio (S4:20) + acido formico	2	677.33856; 635.32825; 593.28174; 579.26819; 565.28613; 551.27045; 537.25525; 509.22366; 491.21334; 481.19263 ; 449.20279; 439.18210; 411.14996; 393.14097; 341.06018; 323. 33722
723.37891 (677 + 46)	C33H58O14 + CH2O2	-2.2	acil saccarosio (S3:21) + acido formico	2	551.26801; 593.31476; 467.21100; 449.20056; 575.30426; 533.25775; 407.15356; 425.16403; 323.09668;
723.37903 (677 + 46)	C33H58O14 + CH2O2	-2.4	digalattosilmonoacilglicerolo (18:2/0:0) + acido formico	2	677.37360 ; 415.14444; 397.13382 ; 379.12329; 323.09695; 305.08682; 287.07611; 253.09200; 235.08176 ; 221.06638; 179.05536; 161.04517; 125.02429
733.4884	C42H70O10	-1.7	lipide con C 18:3	3	293.21078; 277.21600; 439.26773; 349.23648; 319.22617

737.35791 (691 + 46)	C33H55O15 + CH2O2	-2	acil saccarosio (S4:21) + acido formico	2	691.35138; 649.34094; 607.29443; 565.25153; 523.23730; 551.26825; 505.22705; 495.27206; 439.18027; 407.19396; 323.09732; 341.10712; 305.08646; 425.16446; 491.21143; 409.89743
737.39441 (691 + 46)	C34H60O14 + CH2O2	-3	acil saccarosio (S3:22) + acido formico	2	593.3143; 565.2831 ; 551.2676; 537.2521; 467.2105
737.39459 (691 + 46)	C34H60O14 + CH2O2	-2.6	acil saccarosio (S3:22) + acido formico	2	691.38696; 565.28320; 439.17969
741.38098			fosfatidilinositolo	3	723.36719; 651.34570; 579.32745; 571.28553; 553.27551; 552.92188; 497.24915; 495.17130; 485.14029; 391.22348; 323.08847; 297.03677; 255.23170; 241.01080; 223.00017; 187.09712;
744.52448 (698 + 46)	C39H73NO9 + CH2O2	-3.7	lucioside; AS 1-2 + acido formico	3	698.51733; 507.27069; 463.20764; 327.21631; 279.23178
749.35803 (703 + 46)	C34H56O15 + CH2O2	-3	Butil glicoside, 2'-butanoil, 4,4',6-tris-O-(2- methylpropanoil), 3'-acetil neoesperidose + acido formico	3	703.35095; 661.34094; 607.29407; 565.28314; 619.29370; 481.19086
751.37347 (705 + 46)	C34H57O15 + CH2O2	-2.8	acil saccarosio (S4:22) + acido formico	2	705.36713; 663.35663; 607.29437; 621.30945; 565.28253; 537.25287; 547.27234; 481.18988; 523.23676; 579.29883; 439.17981; 593.31451; 467.21103; 421.16916; 323.09641
758.54010 (712 + 46)	C40H75NO9 + CH2O2	-3	glucocerebroside + acido formico	2	712.53333 ; 521.24963; 293.21118
761.30255	C38H50O16	-0.1	prieurianin	3	743.29108; 717.31183 ; 689.28094 ; 459.17590; 301.11838 ; 257.12888 ; 242.10593
763.37360 (717 + 46)	C36H60O17 + CH2O2	3.1	vobtusine + acido formico	4	727.45355; 717.36676; 675.35657; 633.30908; 621.30957; 579.29919; 535.23712; 481.19043; 431.21844

765.38928 (719 + 46)	C35H60O15 + CH2O2	-2.7	acil saccarosio (S4:23) + acido formico	2	677.37256; 728.52789; 593.28180; 551.26843; 579.29944; 523.23730; 425.16415; 467.21054; 449.20099; 407.15384; 323.09601
765.42596 (719 + 46)	C36H64O14 + CH2O2	-2	acil saccarosio (S3:24) + acido formico	2	593.31561; 467.21161; 449.20105; 575.30469; 323.09714; 305.08640
773.43140 (611 + 162)	C39H66O15 + C6H10O5	-2.3	heloside A + esoso	3	755.42047; 737.41077; 611.37817; 593.36810; 575.35803; 431.31580; 449.32541; 413.30457
774.53522 (728 + 46)	C40H76NO8P + CH2O2	7.9	isomeri di fosfatidiletanolamina + acido formico	3	728.52777 ; 710.51593; 665.22388; 646.95917; 572.37799; 548.46503; 530.45465 ; 374.30432; 324.25198
777.38885	C37H62O17	-3.3	non identificato	4	-
779.4046 (733 + 46)	C36H62O15 + CH2O2	-3	acil saccarosio (S4:24) + acido formico	2	733.3983; 691.3877; 607.2943; 565.2839; 593.3131; 547.2737; 481.1909; 467.1803; 439.1803; 421.1694; 323.09686; 509.22147
787.46521	C41H72O12S	-2.8	sulfochinovosildiilglicerolo (16:3/18:0)	2	537.27130; 531.22510; 225.00679; 206.99623; 283.04871; 164.98605
791.49506 (745 + 46)	C43H70O10 + CH2O2	-0.4	monogalattosildiilglicerolo (18:3/16:3) + acido formico	2	513.30682; 485.27536; 277.21235; 249.18608; 233.22693; 259.20593; 253.09314
793.50854 (747 + 46)	C43H72O10 + CH2O2		monogalattosildiilglicerolo (18:3/16:2) + acido formico	2	747.50214 ; 513.30475; 277.21625; 251.20067
793.51172	C41H78O12S	-3	sulfochinovosildiilglicerolo (16:0/16:0)	2	706.21576; 555.28314; 537.27167 ; 523.2562; 397.59427; 377.34076; 355.03088; 323.71286; 276.17068; 255.23210; 225.00677
807.43567 (761 + 46)	C38H66O15 + CH2O2	-3.1	acil saccarosio (S5:25) opp (S4:26) + acido formico	3	719.41907; 635.32556; 593.31500; 509.22134; 565.28375; 439.18015; 467.21115; 421.16977; 323.09564

807.43579	non identificato		acil saccarosio (S5:25)/(S4:26) + acido formico	3	761.45447; 719.41931; 607.29443; 565.28394;481.19073
807.43604	non identificato		acil saccarosio (S5:25)/(S4:26) + acido formico	3	761.43048; 719.41907; 635.32556; 593.31500; 565.28375; 467.21115; 439.18015; 421.16977
809.49585	non identificato		non identificato	4	773.45813; 758.53320; 741.43805; 551.24933
815.49609	C43H76O12S	-2.9	sulfochinovosildiacylglicerolo (18:0/16:3)	2	577.26746; 559.25604 ; 555.28198; 537.27216; 396.93982; 297.58200; 277.21628; 255.23151; 225.00676
819.52362 (773 + 46)	C45H74O12 + CH2O2	-3.4	monogalattosildiacylglicerolo (18:3/18:3) + acido formico	2	773.51819 ; 758.53064; 513.30475 ; 277.21628 ; 295.22693
819.52374 (773 + 46)	C45H74O12 + CH2O2	-3.2	monogalattosildiacylglicerolo (18:3/18:3) + acido formico	2	773.51764 ; 758.53070; 513.30518; 295.22647 ; 277.21640
821.53943 (775 + 46)	C45H76O10 + CH2O2	-3.2	monogalattosildiacylglicerolo (18:2/18:3) + acido formico	2	775.53333; 515.32019; 513.30481; 279.23175; 277.21631
831.50012	C43H77O13P	-3.1	fosfoinositolo (18:3/16:0)	3	553.27600; 798.46417; 391.22357; 255.23169; 413.20779; 571.28613; 297.03677; 223.60058; 197.69548; 277.21637; 152.99562; 181.87497
835.51904 (789 + 46)	C45H74O11 + CH2O2	-3.7	monogalattosildiacylglicerolo (18:3/0:0) + acido formico	2	513.30475; 277.21625; 293.21103; 253.09210
837.48047	C45H74O12S	-3.6	sulfochinovosildiacylglicerolo	2	559.25586; 537.27173; 579.28174; 225.00673; 206.99609; 283.04831; 243.01701
847.48505	C43H76O14S	-3.2	sulfochinovosildiacylglicerolo	3	827.46033; 801.47552; 789.44208; 709.37982; 591.24481 ; 537.27106 ; 533.19763; 453.13940; 286.96988; 283.0410; 225.00621 ; 193.89102
899.50543	C46H76O17	4.9	(25R)-spirost-5en-3β-ol 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-[β-D-glucopiranosil-(1-4)]-β-D-glucopiranoside	3	-

912.49481 (866 + 46)	C45H73NO15 + CH2O2	-1.6	β -solamarina; solamargine + acido formico	2	866.48859; 720.43011; 585.23651; 574.37231; 501;21021; 351.12759; 291.10745
951.50964 (905 + 46)	C55H70N4O6Mg + CH2O2	-3.1	clorofilla b + acido formico	2	626.20087; 597.85999; 555.18665; 540.16290; 495.16629; 444.1101
953.54498 (907 + 46)	C49H80O15 + CH2O2	-2.7	digalattosildiacylglicerolo (36:4) + acido formico	2	657.34583; 397.13306; 415.14340; 277.21594; 657.34540; 629.31464; 379.12247; 675.35596; 249.18475
967.473755 (921 + 46)	C44H74O20 + CH2O2	-2.9	capsianoside VI / liciumoside VI + acido formico	2	921.46729
973.57404 (295+...)	C18H32O3 (295)+..non identificato	-0.5	catene C18	3	954.58282; 871.51190; 816.15656; 635.32379; 579.30426; 474.50031; 295.22772; 277.21729; 251.23840; 195.13922; 171.10283;
977.60248	non identificato		digalattosildiacylglicerolo	3	931.59583; 653.37256
981.57678 (935 + 46)	C51H84O15 + CH2O2	-2.1	digalattosildiacylglicerolo (18:3/18:3) + acido formico	2	935.57153; 675.35699; 657.34729; 415.14401; 397.13367; 379.12335; 361.11218; 277.21606
983.46814 (937 + 46)	C44H74O21 + CH2O2	-2.4	liciumoside VII /attenoside + acido formico	2	-
997.57172 (675 + 146 + 176)	C33H56O14+ C6H10O4 + C6H8O6	-4.9	digalattosilmonoacylglicerolo (18:3/0:0) + deossiesoso + acido glucuronico	2	951.564; 933.55334; 675.35638; 415.14310; 397.13235
1007.46826	C47H76O23		nicotianoside IV	2	963.4783; 921.4688; 903.4562; 775.4089; 757.3984; 741.4038
1013.56891	C52H86O19	-0.1	quinquenoside I	3	967.56110; 949.54913; 691.35284
1023.46295	C47H76O24	-2.4	nicotianoside VI	2	1005.32623; 979.47272; 937.46674
1058.55261 (1012 + 46)	C50H81NO17 + CH2O2		γ 2 solamarina + 2 deossiesoso + acido formico	2	866.4870; 720.42975; 574.37286
1059.53552 (1013 + AF)	C51H82O20 + CH2O2	-2.5	spirost-5-en-3-ol + 4 derivati glucosilici + acido formico	2	1013.52692
1072.53076 (1026 + 46)	C50H83N3O15P2 + CH2O2	4	diacylglicerol citidina difosfatata (18:1/20:4) + acido formico	2	1026.52396; 617.22766; 393.13867
1109.46301	C50H78O27	-2.5	nicotianoside VII ; saponina 9 del gelsomino notturno	2	-

1113.53027 (921 + 146 + 46)	C ₄₄ H ₇₄ O ₂₀ + C ₆ H ₁₀ O ₄ + CH ₂ O ₂	-1.9	liciumoside IV / capsianoside VI + deossiesoso + acido formico	3	1067.52466; 921.46832 ; 775.40839; 757.39813; 629.35254; 611.34100
1129.52783 (1083 + 46)	C ₅₀ H ₈₄ O ₂₅ + CH ₂ O ₂	-0.5	capsianoside II + acido formico	2	1083.51929
1153.52527	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₇		nicotianoside III + deossiesoso + C ₃ O ₃ H ₄	2	1109.5364; 1049.5168; 1067.5242; 921.4688; 903.4562; 757.3984
1220.6062 (1174 + 46 + 1)	C ₅₆ H ₉₁ NO ₂₂ + CH ₂ O ₂ + H		γ ₂ solamarina + 2 deossiesoso + esoso + acido formico	2	no frammenti; vedi 2333
1220.6062 (1174 + 46)	C ₅₆ H ₉₁ NO ₂₂ + CH ₂ O ₂		γ ₂ solamarina + 2 deossiesoso + esoso + acido formico	2	1174.54565; 866.4870; 720.42975); 574.37286
1427.82031	non identificato		non identificato	4	-

IONIZZAZIONE POSITIVA

Tabella 10 Metaboliti identificati in modalità di ionizzazione positiva.

<i>massa</i>	<i>formula</i>	<i>errore</i>	<i>molecola</i>	<i>l.i.</i>	<i>frammenti</i>
110.00790	non identificato		non identificato	4	82.01343 ; 66.01846
113.03371	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	-7.3	uracile	2	66.14666
121.06400	C ₈ H ₈ O	-6.5	metilbenzaldeide; fenilacetaldeide	2	-
127.04929	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	-7.2	timina; 1-metil uracile; imidazolo-1-acetato	3	-
130.04906	C ₅ H ₇ NO ₃	-6.2	acido 2 pirrolidon-5-carbossilico	2	84.0438
132.10112	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-5.9	leucina	2	86.09607
147.07562	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	-5.4	glutamina	2	130.04948 ; 84.04390
147.07568	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	-5	glutamina	2	130.04939 ; 84.04390
163.12184	C ₁₀ N ₁₄ N ₂	-7	nicotina	2	132.08060; 106.06490; 84.08041
163.12192	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	-6.4	nicotina	2	132.08073 ; 106.06503; 130.06526; 120.08078
166.08510	C ₉ H ₁₁ NO ₂	-7	fenilalanina	2	120.08027
175.11816	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	-4.5	arginina	2	158.0919 ; 130.09715; 116.07020
179.11668	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O	-6.7	nicotina-N'-ossido	2	132.08057 ; 161.10715; 106.06503; 130.06526; 120.08078
182.08012	C ₉ H ₁₁ NO ₃	-5.8	tirosina	2	165.05383 ; 136.07500

183.06392	C9H10O4	-6.9	non identificato	3	165.05431; 133.02811; 125.05940; 66.14650
194.0799	C10H11NO3	-6.5	non identificato	3	166.08527; 136.07497
209.15225	C13H20O2	-6.5	megastigmene	3	191.14186; 165.12634; 121.10027
213.07434	C10H12O5	-6.6	non identificato	3	195.06406; 163.03824; 155.06931; 140.04620; 135.04332; 107.04850
218.04124	non identificato		non identificato	4	198.93988; 66.14653
230.10088	C8H17NO5Na ⁺	4.3	2-deossi-2-dimetilammino- α -D-glucosio + Na ⁺	3	-
243.13243	C11H18N2O4	-6.2	non identificato	4	225.12256; 197.12790; 141.06546; 132.10143; 129.06558; 113.07056; 84.04390
245.18452	C12H24N2O3	-5.9	2 leucina	3	227.17392; 199.17932; 132.10098; 86.09559
251.13763	C13H18N2O3	-5.5	N-caffeoil putrescina	2	234.11153; 163.03830; 114.09075; 98.05950
256.26190	C16H33NO	-6.2	ammide palmitica	2	116.10642; 102.09078; 88.07507
257.11160	C11H16N2O5	-6.2	1-(β -D-ribofuranosil)-1,4-diidronicotinammide	2	248.62426; 239.10136; 221.09091; 203.08049; 175.08554; 159.09064; 135.05452
265.15320	C14H20N2O3	-5.5	N-feruloil putrescina	2	248.12729; 177.05392; 152.06992; 145.02782; 114.09075
266.12234	C10H19NO7	-4.1	fruttosio-1-deossi-1-(acido-N- γ -amminobutirrico)	2	248.1122
266.13715	C14H19NO4	-5.8	N(α)-benzilossicarbonil-L-leucina	3	207.06474; 163.03876; 154.10298
266.16083	non identificato		non identificato	4	-
267.11874	C12H20O5Na ⁺ / C10H14N6O3	-5.8 / - 4.8	polietilene ossidato + Na ⁺ / 2-ammino-9-(2-deossi- β -D-ribofuranosil) adenina	3	-
268.10251	C10H13N5O4	-5.7	adenosina	2	136.06099
268.26181	C17H33NO	-6.3	ammide esilciclopropanottanoica	3	251.23593; 233.22540; 177.16335; 163.14725; 135.11626
274.09082	C11H15NO7	-4.8	1- β -D-glucopiranosil-2-pirrol carbossilato	2	256.08075; 238.07030; 226.07042; 130.04938
277.1167	C14H16N2O4	-5.7	N(α)-metossicarbonil metil estere triptofano; N-acetil metil etere 5-idrossitriptofano	3	259.10632; 241.09576; 231.11154; 166.08527; 120.07996
277.21469	C18H28O2	-5.4	acido ottadecatetraenoico	2	259.20514; 135.11642

277.21475	C18H28O2	-5.3	catena C18 insatura	2	259.20514; 135.11642
280.26181	C18H33NO	-5.9	linoleammide	3	-
280.26181	C18H33NO	-6	linoleammide	2	
282.27744	C18H35NO	-6	ammide ottadecenoica	2	265.25296 ; 247.24242; 163.14822; 191.17979; 177.16417; 135.11691
284.09717	C10H13N5O5	-6.2	guanosina	2	152.05666
289.13760	C12H20N2O6Na ⁺	-6.3	metil palitine serina + Na ⁺	3	271.12872 ; 253.11821; 235.10756 ; 217.09700 ; 181.09729 ; 175.08620; 163.08665
290.84583	non identificato		non identificato	4	-
291.09586	C14H14N2O5	-5.8	N-malonilriptofano; acido-L-N-(1H-indol-3-ilacetil) aspartico	2	273.08527 ; 245.09061
293.20944	C18H28O3	-5.7	catena C18	2	275.19901 ; 257.18890
295.11240	C10H18N2O8	-4	acido disticonico	2	277.10251 ; 259.09216; 211.07111
295.22491	C18H30O3	-6.3	acido idrossiottadecatrienoico	2	277.21451
295.22504	C18H30O3	-5.8	acido idrossiottadecatrienoico	2	277.21481 ; 259.20459
300.14261	C14H21NO6	-5.2	triacetil swainsonina	3	282.13303
305.13300	C12H20N2O7	-4.3	deossifruuttosazina	3	287.12280 ; 269.11240; 227.10193
305.13300	C12H20N2O7	-4.3	deossifruuttosazina	3	287.12354 ; 269.11295 ; 251.10237; 227.10237; 209.09213 ; 191.08163
308.22018	C18H29NO3	-5.9	diidrocapsaicina	2	290.20963 ; 272.19904; 262.21478 ; 192.13704
309.12787	C11H20N2O8	-4.4	non identificato	4	291.11859 ; 273.10822; 225.08701
309.14267	C12H20N2O5	-5.9	non identificato	4	186.11214 ; 140.10683
312.12155	C18H17NO4	-4.8	idrossi-metossi-metilenediossi noraporfina	3	177.05356
314.13684	C18H19NO4	-5.9	N-feruloil tiramina	2	177.05339 ; 145.02747
316.28409	C18H37NO3	-1.7	deidrofitosfingosina	2	298.27225 ; 280.26202
M+1 di 317.20712	C18H30O3Na ⁺	-5	acido idrossiottadecatrienoico + Na ⁺	2	
318.29871	C18H39NO3	-4.9	fitosfingosina	2	300.28806 ; 282.27768 ; 270.27759; 264.26703 ; 252.26694
320.86444	non identificato		non identificato	4	236.90457 ; 122.92423
322.2106	C17H27N3O3	-5.9	N-feruloil spermidina	2	305.18561 ; 248.12772; 234.11206 ; 160.07513; 177.05434 ; 155.11765
323.15829	C16H22N2O5	-5.8	5-N-benzilossicarbonil, 2-N-acetil, metil estere ornitina	3	200.12810 ; 154.12228
325.13766	C15H20N2O6	-5.4	leucina β xantina	3	-

325.17438	C16H24N2O5	-4.4	glucosil nicotina	2	289.11102; 163.12254; 132.08070; 106.06491; 84.08046
329.11139	C17H16N2O5	-5.5	non identificato	4	206.07997; 160.07500; 105.03296
330.05695	C10H12N5O6P	-8.6	adenosin monofosfato ciclica	2	312.04843
344.13205	C15H21NO8	-5.6	tirosina fruttosio	2	326.12317; 308.11285; 298.12836; 280.11786; 194.08080; 182.08115
353.15405	C16H26O7Na ⁺	-8.6	non identificato	4	335.14392; 317.13364; 299.12332; 269.11258
353.22827	C18H34O5Na ⁺	-7.6	acido triidrossiottadecenoico + Na ⁺	3	335.20462; 317.19406; 235.11655
353.26669	C21H36O4	-5.5	monoacilglicerolo (18:3/0:0)	2	335.25851; 279.23215; 261.22159; 243.21097
355.10059	C16H18O9	-5	acido 3-caffeoilchinico	2	193.04849; 163.03813; 145.02768
355.12701	C15H22N4O2S2	3.7	allitiammina	3	232.0957; 163.03818
M+1 di 355.10056	C16H18O9	-5	acido 3-caffeoilchinico	2	
369.11591	C17H20O9	-5.7	acido N-feruloilchinico	2	177.05342
371.12177	C19H18N2O6	-5.4	non identificato	4	248.09044; 202.08559; 147.04353
371.20447	C19H30O7	-5.3	5-megastigmen-7-yne-3,9- diolo; 3-O-β-D-glucopiranoside	2	209.15236; 191.14183; 133.10028
374.1062	C15H19NO10	-5.3	2,4-diidrossi-7-metossi-2H-1,4- benzoxazin-3(4H)-one 2-D- glucoside	3	198.07489; 180.06445; 124.03867; 106.02806; 66.14638
381.07791	C15H18O10Na ⁺	-3.7	acido-6-O-trans-caffeoil gluconico + Na ⁺	3	219.02574; 201.01521
395.15543	C16H26O11	1.6	1-(3-metil-2-butenoil)-6-apiosil glucosio	3	243.0889
397.22003	C19H34O7Na ⁺ / C21H32O7	0.9 / - 5.2	tsangane L 3 glucoside + Na ⁺ / isopetasoside	3	-
410.30295	C27H39NO2	-5.9	veratrammina	3	392.29572; 267.17480; 239.17999; 173.09593
410.30319	C27H39NO2		veratrammina	2	392.29227; 374.28152; 271.20416; 253.19360; 122.09561
434.19983	non identificato		non identificato	4	317.08292; 295.10095; 259.07990; 241.06943; 229.06697
435.24823	C21H39O7P	-5.5	acido fosfatidico (18:2/0:0)	2	417.24094; 337.27420; 263.23724
440.29819 (422 + 18)	C24H39NO5 + H2O	-5.4	idrossicassaine; peregrine alcol; obtusine + H2O	3	422.28781; 404.27734; 386.26678; 312.17874

442.31393 (424 + 18)	C24H41NO5 + H2O	-5.4	diidro (idrossicassaine; peregrine alcol; obtusine) + H2O	3	424.30484; 406.29462; 388.28482; 312.18188
451.31430 (434+ NH3)	C25H39NO5 + NH4 ⁺	-5.2	N-arachidonoil glutammato + NH4 ⁺	2	434.28815; 322.27267; 305.24606; 173.09111
456.24707	C25H33N3O5	-4.9	non identificato	3	-
460.12164 (442 + 18)	C22H18O10 + NH4 ⁺		catechina-O-gallato + NH4 ⁺	3	442.29297; 268.0802; 193.04848
461.24918	C24H38O7Na ⁺	-3.9	fusicoplagn A + Na ⁺	3	324.15274
465.25858	C27H38O5Na ⁺	-5.5	muzagenina + Na ⁺	3	447.25092; 311.25824
470.22568	C25H31N3O6	-6.2	N,N'-dicaffeoil spermidina	2	453.2001; 399.15326; 382.12698; 381.14301; 364.11642; 356.14771; 279.06406
470.22614	C25H31N3O6	-5.2	N,N'-dicaffeoil spermidina	2	453.20026; 308.19534; 291.16891; 234.11145; 220.09570; 163.03813
472.24191	C25H33N3O6	-4.9	N,N'-dicaffeoil spermidina monoidrata	2	455.21646; 310.21140; 293.18491; 236.12732; 234.11162; 220.09596; 163.03831
474.25714	C25H35N3O6	-5.7	N,N'-bis diidrocaffeoil spermidina	2	457.23346; 236.12798; 222.11227; 165.05458; 123.04401
476.27448	C23H42NO7P	-5.7	fosfatidiletanolamina (18:3/0:0)	2	458.26587; 415.22375; 335.25751; 304.26422; 261.22104
484.24136	C26H33N3O6	-5.8	N-caffeoil-N-feruloil spermidina	2	467.21609; 413.16925; 396.14343; 395.15878; 370.16351; 218.11676; 192.10144
484.24136	C26H33N3O6	-5.8	N-caffeoil-N-feruloil spermidina	2	467.21555; 322.21091; 308.19534; 305.18420; 291.16867; 237.12192; 220.09557; 177.05356; 163.03784; 155.11690
486.25729	C26H35N3O6	-5.3	N-caffeoil-N-feruloil spermidina monoidrata	3	469.23172; 310.21124; 293.18481; 248.12711; 239.13766; 222.11151; 165.05365; 123.04331
488.27274	C26H37N3O6	-5.7	N-diidro caffeoil-N-feruloil spermidina	3	471.24704; 250.14264; 236.12689; 222.11137; 165.05379; 137.05939; 123.04344; 100.07502
492.19974	C28H29NO7	-3.9	grossammide K	3	462.18832; 337.10516; 325.10526; 307.09454

500.27281	C27H37N3O6	-5.4	N,N'-diferuloil spermidina monoidrata	2	483.24591; 350.20551; 324.22653; 307.19992 ; 253.15306; 248.12666; 236.12669 ; 179.06912 ; 177.05345; 137.05878
504.35043			non identificato	4	486.34241 ; 468.33154 ; 393.32376 ; 370.33127; 362.30569; 352.32123; 328.32086; 310.31018
520.33728			non identificato	4	502.32816 ; 443.25507 ; 184.07277
525.26477			non identificato	4	-
534.31561			non identificato	4	
549.30084	C30H44O9	-9	peruvoside	3	-
553.29516	C27H46O10Na ⁺	-5.7	non identificato	4	535.28308; 483.21732; 443.18616 ; 391.24362; 331.09726
568.42401			non identificato	4	549.40491; 476.36234 ; 338.25854
569.29279	C29H44O11	-5	sarmentolosite; canesceol	2	443.18594; 407.23894; 257.18857
573.30090	C29H44O9	-9.1	3-O- α -L-ramnosil sarmentogenina; 3-O- α -L-ramnopiranosil coroglaucingenina	2	375.25055
576.38641	C33H53NO7	-5.3	3-O- β -D-glucopiranosil solasodine	2	558.37610 ; 396.32330 ; 378.31302; 271.20374; 253.19368; 157.10049
576.38715	C33H53NO7	-4	3-O- β -D-glucopiranosil solasodine	2	558.37671 ; 396.32352 ; 378.31329; 271.20395; 253.19400; 197.13144; 157.10023
576.38745	C33H53NO7	-3.7	3-O- β -D-glucopiranosil solasodine	2	558.37695 ; 396.32388 ; 378.31363; 271.20416; 253.19409 ; 211.14709; 197.13150; 171.11606; 157.10030 ; 145.10036
M + 1 di 576.38715	C33H53NO7		3-O- β -D-glucopiranosil solasodine	2	558.37671 ; 396.32352 ; 378.31329; 271.20395; 253.19400; 211.14690; 197.13144; 171.11583; 157.10023; 145.10034
583.41150	C40H54O3	-5.3	derivato luteina	2	565.40088 ; 547.39075 ; 491.34915; 484.36868; 375.26514; 228.12947
590.36572	C33H51NO8	-5.2	O- β -D-glucopiranosil petisidine	2	572.35406
591.49493	C37H66O5	-5.7	diacilglicerolo (x:i/w:z)	2	573.48840 ; 335.25824; 313.27383; 261.22141

593.27277	C35H36N4O5		feoforbide a	2	565.28229; 533.25641 ; 492.25165; 476.25827; 461.23480 ; 433.24011
593.27307	C35H36N4O5	-4.7	feoforbide a	2	533.25256 ; 547.26672; 515.24078; 492.24884; 473.23077; 461.23120 ; 433.23682
607.25177	C35H34N4O6	-5.5	feoforbide b	2	579.25751; 547.23151 ; 519.23688 ; 475.21048 ; 447.21609 ; 419.22049
607.28802	C36H38N4O5	-5.7	Metil feoforbide a	2	547.26886 ; 519.27417; 515.24237; 506.26602; 473.23138; 461.23218 ; 433.23761;
609.26788	C34H40O10	-2.5	genkwanina H; trigonosina C	3	591.25818 ; 559.23212; 531.23737 ; 515.24243; 503.24210; 487.24728 ; 475.24750; 459.25241
613.47992	C39H64O5	-4.5	diacilglicerolo (x:i/w:z)	3	595.47083 ; 577.45898; 539.44348; 521.43445 ; 503.42255
615.49518	C39H66O5	-5	diacilglicerolo (x:i/w:z)	2	597.48462 ; 579.47369; 541.45837; 523.27222; 505.43805
617.27466	C27H45O14Na ⁺	-5.4	acil saccarosio (S4:14) + Na ⁺	2	455.22473 ; 413.21387; 367.17252; 353.15628
617.31091	C28H50O13Na ⁺	-5.6	acil saccarosio (S4:14) + Na ⁺	3	-
621.26691	C36H36N4O6	-6.2	Metil feoforbide b	2	593.27222; 561.24615 ; 533.2511; 475.20935 ; 447.21503
625.25104	C36H36N2O8	-5.4	grossamide	2	488.17087 ; 462.19131; 351.08661 ; 325.10721; 308.06848
625.25110	C36H36N2O8	-5.3	grossammide	2	488.16699 ; 460.17276; 364.11554 ; 351.08374; 323.08865; 201.05327
625.25122	C36H36N2O8	-5.2	grossamide	2	488.16699 ; 460.17276; 364.11554 ; 351.08374; 323.08865; 201.05327
625.2514	C36H36N2O8	-4.9	grossammide	2	462.18912 ; 351.08478; 336.06091; 325.10574 ; 323.08948 ; 307.09503
631.29028	C28H47O14Na ⁺	-5.3	acil saccarosio (S4:15) + Na ⁺	2	469.24084 ; 367.17264 ; 353.15707
641.24646	C36H36N2O9	3.8	ossi-grossammide	3	623.23584 ; 460.17340

643.26190	C36H36N2O8 + H2O	-4.8	grossammide + H2O	2	623.23590 ; 488.16675; 462.18863; 460.17239 ; 351.08411; 325.10495; 299.08954
651.45532	C34H67O9P	-6.5	fosfoglicerolo (P-16:0/12:0)	2	541.38708; 373.23566; 317.20938 ; 299.19913
659.28491	C29H48O15Na ⁺	-5.5	acil saccarosio (S4:17) + Na ⁺	2	557.21924; 455.22427 ; 367.17212; 353.15634; 251.08800
659.32104	C30H51O14Na ⁺	-5.9	acil saccarosio (S4:17) + Na ⁺	2	497.27191 ; 409.21927; 395.20389 ; 353.15692;
668.34564			non identificato	4	464.28461; 429.24765; 327.17969 ; 313.16388; 205.07021
673.30084	C30H49O15Na ⁺	-5	acil saccarosio (S4:18) + Na ⁺	2	571.23712; 469.24173 ; 451.23108; 367.17343 ; 265.10498
682.36127			non identificato	4	443.26285 ; 327.17944
687.31604	C31H52O15Na ⁺	-5.5	non identificato	4	483.25684 ; 395.20428; 381.18875
687.35229	C32H55O14Na ⁺	-5.8	acil saccarosio (S4:19) + Na ⁺	2	525.30493 ; 423.23654 ; 409.22098; 381.18942; 367.17398; 353.15826
699.35199	C33H56O14Na ⁺	-6.1	digalattosilmonoacilglicerolo (18:3/0:0) + Na ⁺	2	537.30365 ; 375.25073
701.33185	C32H53O15Na ⁺	-5.2	acil saccarosio (S4:20) + Na ⁺	2	585.25085; 497.27100 ; 409.21851; 395.20300; 381.18735 ; 353.15604
701.36810	C33H58O14Na ⁺	-5.4	acil saccarosio (S4:20) + Na ⁺	2	539.31738 ; 449.21768; 377.26486
701.36835	C33H58O14Na ⁺	-5	digalattosilmonoacilglicerolo (18:2/0:0) + Na ⁺	2	539.31769 ; 437.24954; 395.20303 ; 293.13513
702.41772 (556 + 146)	C33H49NO6 + C6H10O4	-4.1	triacetil spirosolene-3,15-diolo + deossiesoso	2	556.36072 ; 394.30853; 376.29813; 148.11116
714.54858	C40H75NO9	-4	glucocerebroside	2	696.54144 ; 534.48846
715.34766	C35H54O15	-8.2	convallatoxolide	2	-
715.3479	C33H56O15Na ⁺	-4.5	acil saccarosio (S4:21) + Na ⁺	2	613.28265; 571.23541; 511.28723 ; 493.27679; 409.21927; 367.17239 ; 265.10434
717.36560	C35H56O15	-5	liciumoside IX	2	-
720.42841 (738 - 18)	C39H63NO12 - H2O	-4.6	δ-solamarina - H2O	2	702.41827 ; 574.37122; 556.35986 ; 412.31915; 394.30875; 376.29828
722.44409	C39H63NO11	-4.6	γ-solamarina	2	704.43500 ; 558.37555 ; 396.32382; 378.31360; 253.19383; 157.10016

729.36304	C34H58O15Na ⁺	-5.2	acil saccarosio (S4:22) + Na ⁺	2	613.28455; 525.30438 ; 409.21930 ; 381.18811 ; 367.17242; 353.15616; 227.05237
738.43829	C39H63NO12	-5.4	δ-solamarina	2	720.42792 ; 702.41833 ; 574.36957; 556.35999; 394.30771
738.43829	C39H63NO12		δ-solamarina	2	vedi sopra
738.43884	C39H63NO12	-4.7	δ-solamarina	2	720.42792 ; 702.41785 ; 574.36963; 412.31863; 394.30832; 251.17798
743.37860	C35H60O15Na ⁺	-5.2	acil saccarosio (S4:23) + Na ⁺	2	539.31909 ; 521.30890; 395.20416; 367.17239
743.37872	C35H60O15Na ⁺	-5	acil saccarosio (S4:23) + Na ⁺	2	641.31396; 599.26715; 539.31879 ; 437.25040 ; 395.20386 ; 367.17249
743.41479 (581+162)	C32H53O9 + C6H10O5	-3.9	convallosaponina A + esoso	2	581.36615 ; 437.25064
757.39398	C36H62O15Na ⁺	-5.4	acil saccarosio (S4:24) + Na ⁺	2	613.28320; 553.33466 ; 535.32391; 409.21970 ; 265.10452
757.39429	C36H62O15Na ⁺	-5	acil saccarosio (S4:24) + Na ⁺	2	641.31445; 613.28351; 553.33490 ; 437.25049 ; 409.21988 ; 391.24573; 227.05208
762.43848	C39H65NO12Na ⁺	-1.9	licoperoside D + Na ⁺	2	702.41846 ; 556.35980 ; 394.30798; 376.29755
764.45453	non identificato		non identificato	4	704.43390 ; 558.37518 ; 396.32358; 253.19366
769.48212	C43H70O10Na ⁺	-5.2	monogalattosildiacylglicerolo (2OH-36:4) + Na ⁺	2	519.29028; 491.25891 ; 243.08253
771.40912	C37H64O15Na ⁺	-5.9	acil saccarosio (S4:25) + Na ⁺	2	567.35004 ; 423.23553 ; 409.21957; 395.20004
771.49756	C43H72O10Na ⁺	-5.5	monogalattosildiacylglicerolo (2OH-36:3) + Na ⁺	2	519.29059; 493.27499 ; 243.08241
773.5127	C43H74O10Na ⁺	-6.1	monogalattosildiacylglicerolo (2OH-36:2) + Na ⁺	2	521.30872; 493.27747
775.52820	C43H76O10Na ⁺	-6.3	monogalattosildiacylglicerolo (18:3/16:0) + Na ⁺	2	756.55518; 521.31018; 495.29343
785.42456	C38H66O15Na ⁺	-6.1	acil saccarosio (S4:26) + Na ⁺	2	581.36627 ; 437.25089; 409.21973
785.42474	C38H66O15Na ⁺	-5.9	acil saccarosio (S4:26) + Na ⁺	2	641.31268; 581.36505 ; 437.24976; 409.21866
785.47687	C43H70O11Na ⁺	-5.3	monogalattosildiacylglicerolo (3OH-36:4) + Na ⁺	2	675.40558; 519.29138; 507.25510 ; 491.26031; 397.18207 ; 243.08165

785.47723	C43H70O11Na ⁺	-4.8	monogalattosildiacylglicerolo (3OH-36:4) + Na ⁺	2	519.29138; 507.25510 ; 491.26031; 397.18207; 243.08165
787.49213	C43H72O11Na ⁺	-5.8	monogalattosildiacylglicerolo (3OH-36:3) + Na ⁺	2	642.31750; 582.36932 ; 535.28796; 493.27731; 437.25067 ; 413.17575
791.30908	C31H56N2O17P2	-4.6	N,N-diacetilchitobiosildiphosphodolichol	3	-
797.51331	C45H74O10Na ⁺	-5.1	monogalattosildiacylglicerolo (18:3/18:3) + Na ⁺	2	519.29279 ; 241.06812
799.52814	C45H76O10Na ⁺	-6.2	monogalattosildiacylglicerolo (36:5) + Na ⁺	2	519.29199 ; 243.08334
800.41736			non identificato	4	446.30347; 428.29266
801.47168	C43H70O12Na ⁺	-5.3	monogalattosildiacylglicerolo (18:2/18:2) + Na ⁺	2	535.28595; 517.27393; 507.25479 ; 491.25977; 489.24472; 465.20566; 437.17697 ; 425.21228; 409.18188; 397.18262;
829.50262	C45H74O12Na ⁺	-5.6	monogalattosildiacylglicerolo (OH-18:3/OH-18:3) + Na ⁺	2	551.28357; 535.28851 ; 519.29364
847.46149	C42H70O17	-8.4	gentirigeoside B/C	3	685.41394; 659.36200; 591.22650 ; 535.28815; 497.30807 ; 429.17319 ; 405.13663; 347.09476
848.47461 (738 - 2*18 + 146)	C39H59NO10 - 2 H2O + C6H10O4	-8.6	δ-solamarina - 2 H2O + deossiesoso	2	702.41852 ; 556.36108 ; 394.30881 ; 376.29828
861.40295	C36H64N2O21	-5.2	N-acetil-1-O-ottil-3-O-β-D-galactopiranosil-6-O-[2-(acetilamino)-4-O-β-D-galactopiranosil-2-deossi-β-D-glucopiranosil]-α-D-galattosammina	3	-
868.50085	C45H73NO15	-5.1	β-solamarina; solamargine	2	850.49109 ; 704.43292 ; 558.37524 ; 396.32376; 253.19334
868.50159	C45H73NO15	-4.3	β-solamarina; solamargine	2	850.49182 ; 722.44464; 704.43298 ; 558.37561 ; 396.32388; 378.31375;
868.50165	C45H73NO15	-4.2	β-solamarina; solamargine	2	850.49164 ; 704.43268 ; 558.37537 ; 396.32376; 378.31354
868.50281	C45H73NO15	-2.9	β-solamarina; solamargine	2	850.49194; 722.44501; 704.43445; 576.38733; 414.33493; 396.32422; 378.31396

M+1 di 868.50085	C45H73NO15	-5.1	β -solamarina; solamargine	2	
884.49603	C45H73NO16	-4.7	α -solamarina	2	866.49042; 848.48169; 818.43225; 720.43225; 702.42157; 412.32159; 394.31088; 376.29977; 251.17940
935.56488	C49H84O15Na ⁺	-5.7	digalattosildiacylglicerolo (34:4) + Na ⁺	2	773.51801; 681.34711; 657.34717; 519.29333; 405.13779
937.58051	C49H86O15Na ⁺	-5.7	digalattosildiacylglicerolo (18:3/16:0) + Na ⁺	2	775.52979; 681.34314; 659.35876; 519.29034; 497.30603; 405.13504; 347.09332;
939.59644	C49H88O15Na ⁺	-5.4	digalattosildiacylglicerolo (18:2/16:0) + Na ⁺	2	777.54541; 683.35797; 659.35876; 521.30621; 405.13443; 347.09283
951.59583	C50H88O15Na ⁺	-6	digalattosildiacylglicerolo (35:3) + Na ⁺	2	789.54523; 681.34265; 673.37408; 519.29028; 511.32123; 405.13461; 347.09341
953.57587	C49H86O16Na ⁺	-5.2	digalattosildiacylglicerolo (OH- 34:3) + Na ⁺	2	791.52814; 697.34088; 659.36176; 535.28589; 497.30890; 405.13702; 347.09500
975.56042	C51H84O16Na ⁺	-4.9	α -galattosil- digalattosildiacylglicerolo (OH- 18:3/18:3) + Na ⁺	2	813.51489; 697.34253; 681.34802; 535.28937; 519.29449; 405.13812; 347.09601
977.57574	C51H86O16Na ⁺	-5.2	α -galattosil- digalattosildiacylglicerolo (OH- 36:5) + Na ⁺	2	815.52942; 699.35712; 681.34711; 537.30341; 521.30872; 519.29340
989.53906	C51H82O17Na ⁺	-5.4	digalattosildiacylglicerolo (2OH- 36:4) + Na ⁺	2	827.49103; 711.31909; 693.30872; 681.34552; 549.26611; 519.29260
991.55481	C51H84O17Na ⁺	-5.3	digalattosildiacylglicerolo (OH- 18:3/OH-18:3) + Na ⁺	2	829.50507; 713.33459; 697.33966; 681.34497; 551.28094; 535.28625; 519.29126; 405.13669
1013.52612	C51H80O20	-5.4	papirioside LC	3	996.55084; 867.46875; 721.41174; 575.3548; 413.3028
1014.5592 (868 + 146)	C45H73NO15 + C6H10O4	-4	β -solamarina; solamargine + deossiesoso	2	996.54828; 868.50146; 850.48993; 722.44275; 704.43298; 576.38660; 396.32382; 378.31339

1014.56030 (868 + 146)	C45H73NO15 + C6H10O4	-3.1	β -solamarina; solamargine + deossiesoso	2	996.54950; 868.50317 ; 722.44531 ; 850.49054 ; 704.43335; 576.38672; 414.33530; 396.32404; 378.31357
1026.50586			non identificato	4	-
1028.53845 (590 + 3*146)	C33H51NO8 + 3 C6H10O4	-5.4	O- β -D-glucopiranosil petisidine + 3 deossiesoso	2	1010.52826 ; 882.48169; 864.46906 ; 736.42426; 718.41205 ; 590.36664; 428.31448; 410.30298
M+2 di 1028.53845	C33H51NO8 + 3 C6H10O4	-5.4	O- β -D-glucopiranosil petisidine + 3 deossiesoso	2	1012.54205 ; 994.53400 ; 882.48145; 864.46887 ; 736.42383; 718.41199; 410.30292; 394.30890
M+2 di 1028.53845	C33H51NO8 +3 C6H10O4	-5.4	O- β -D-glucopiranosil petisidine + 3 deossiesoso	2	1012.54297 ; 994.53394 ; 866.48431; 848.47327 ; 720.42743; 702.41748; 412.31866; 394.30875; 376.29764 ; 251.17784
1030.55225	C51H83NO20	-5.7	hyacintoside	2	1012.54315 ; 994.52521; 884.49646; 866.48535 ; 738.43848; 720.42847; 582.53406; 412.31766; 394.31018;
1046.54834	C51H83NO21	-4.5	solaradixina; solasuaveolina	2	1028.53723 ; 900.48987; 754.43298; 446.32388
1048.56323	C51H85NO21	-5.2	diidrosolasuaveolina	2	1030.55273 ; 1010.52734; 902.50659; 884.49573 ; 756.44946; 738.43768; 430.33069
1056.56775 (910 + 146)	C47H75NO16 + C6H10O4	-4.5	leptina I + deossiesoso	2	1038.55811 ; 910.51129; 892.49927 ; 746.44238
1074.46326	C50H77N5O13S3N a ⁺		hoiammide A triacetato + Na ⁺	3	-
1086.56384			non identificato	4	-
1172.56311			non identificato	4	-
1177.59351	C57H92O25	-5.5	asterlingulatoside D	2	-
1177.59436	C57H92O25	-4.8	asterlingulatoside D	2	-
1177.59497	C57H92O25	-4.3	asterlingulatoside D	2	1031.53223; 869.48462; 723.42828 ; 577.37091; 415.31870;

Appendice II

Tabella 11 Intensità di segnale acido caffeico.

acido caffeico $C_9H_8O_4$				
	NEGATIVO (m/z=179.03498)		POSITIVO (m/z=181.04953)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	8.91E+05	16.34	-	
GRCR	1.76E+07	16.32	1.25E+05	16.3
GRTerm	1.75E+07	16.34	9.80E+04	16.34
GRIdr	5.14E+06	16.3	2.38E+04	16.29
ROLC	8.56E+06	16.32	-	
ROLC CR	6.27E+06	16.3	7.62E+04	16.32
ROLCTerm	2.26E+07	16.35	1.33E+05	16.3
ROLCIdr	6.28E+06	16.31	4.55E+04	16.29
WT	7.57E+05	16.27	-	
WTCR	3.15E+07	16.31	1.72E+05	16.37
WTTerm	1.01E+07	16.32	5.32E+04	16.32
WTIdr	3.65E+06	16.34	-	

Tabella 12 Intensità di segnale acido 3-caffeoilchinico.

acido 3-caffeoilchinico $C_{16}H_{18}O_9$				
	NEGATIVO (m/z=353.08781)		POSITIVO (m/z=355.10236)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	1.22E+05	13.75	-	
GRCR	6.23E+06	13.71	-	
GRTerm	6.86E+06	13.74	-	
GRIdr	1.46E+06	13.69	-	
ROLC	1.25E+05	13.73	-	
ROLC CR	1.64E+06	13.72	-	
ROLCTerm	8.06E+06	13.76	-	
ROLCIdr	2.81E+06	13.73	-	
WT	9.90E+04	13.72	-	
WTCR	3.59E+06	13.74	-	
WTTerm	4.66E+06	13.73	-	
WTIdr	1.12E+06	13.63	-	

Tabella 13 Intensità di segnale acido 4-caffeoilchinico.

acido 4-caffeoilchinico $C_{16}H_{18}O_9$				
	NEGATIVO (m/z=353.08781)		POSITIVO (m/z=355.10236)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	1.47E+07	15.49	2.85E+05	15.7
GRCR	1.87E+08	15.32	7.61E+07	15.47
GRTerm	2.88E+08	15.44	6.62E+07	15.46
GRIdr	6.28E+07	15.46	8.29E+06	15.5
ROLC	1.09E+07	15.49	4.19E+05	15.62
ROLC CR	2.96E+08	15.41	6.01E+07	15.46
ROLCTerm	3.75E+08	15.44	8.74E+07	15.45
ROLCIdr	3.58E+08	15.41	7.66E+07	15.45
WT	1.27E+07	15.46	5.73E+05	15.58
WTCR	3.59E+08	15.42	6.54E+07	15.45
WTTerm	2.61E+08	15.45	5.27E+07	15.48
WTIdr	2.36E+08	15.45	4.68E+07	15.5

Tabella 14 Intensità di segnale acido 5-caffeoilchinico.

acido 5-caffeoilchinico $C_{16}H_{18}O_9$				
	NEGATIVO (m/z=353.08781)		POSITIVO (m/z=355.10236)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	1.14E+06	15.81	4.74E+05	15.66
GRCR	2.00E+07	15.8	2.45E+07	15.65
GRTerm	2.18E+07	15.82	2.10E+07	15.65
GRIdr	3.16E+06	15.77	3.02E+06	15.66
ROLC	8.96E+05	15.83	4.19E+05	15.62
ROLC CR	3.01E+07	15.79	1.24E+07	15.62
ROLCTerm	2.78E+07	15.81	1.12E+07	15.67
ROLCIdr	3.98E+07	15.81	1.33E+07	15.64
WT	1.13E+06	15.81	7.91E+05	15.69
WTCR	2.58E+07	15.8	1.22E+07	15.65
WTTerm	2.27E+07	15.8	9.04E+06	15.65
WTIdr	2.30E+07	15.81	1.49E+07	15.67

Tabella 15 Intensità di segnale acido ferulico.

acido ferulico $C_{10}H_{10}O_4$				
	NEGATIVO (m/z=193.05063)		POSITIVO (m/z=195.06518)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	9.08E+05	18.92	5.02E+04	18.9
GRCR	7.24E+05	18.9	1.07E+05	18.92
GRTerm	8.66E+05	18.92	5.85E+04	18.89
GRIdr	9.56E+05	18.89	8.51E+04	18.87
ROLC	8.33E+05	18.91	6.18E+04	18.9
ROLC CR	1.17E+06	18.91	1.00E+05	18.9
ROLCTerm	1.04E+06	18.92	3.59E+04	18.93
ROLCIdr	1.21E+06	18.91	6.28E+04	18.93
WT	8.09E+05	18.88	4.89E+04	18.89
WTCR	1.04E+06	18.91	7.35E+04	18.91
WTTerm	2.54E+05	18.99	6.68E+04	18.91
WTIdr	8.49E+05	18.94	6.15E+04	18.95

Tabella 16 Intensità di segnale esculetina.

esculetina $C_9H_6O_4$				
	NEGATIVO (m/z=177.01933)		POSITIVO (m/z=179.03388)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	2.60E+06	16.61	2.19E+04	16.56
GRCR	2.00E+06	16.57	3.41E+04	16.53
GRTerm	8.25E+05	16.64	-	
GRIdr	6.59E+06	16.54	2.68E+04	16.71
ROLC	1.80E+06	16.6	1.87E+04	16.55
ROLC CR	2.61E+06	16.58	4.89E+04	16.63
ROLCTerm	3.14E+05	16.63	-	
ROLCIdr	2.53E+06	16.58	3.02E+04	16.64
WT	2.90E+06	16.92	5.37E+04	16.63
WTCR	4.65E+06	16.58	6.96E+04	16.64
WTTerm	2.37E+05	16.59	-	
WTIdr	4.39E+06	19.59	1.28E+05	16.63

Tabella 17 Intensità di segnale scopoletina.

scopoletina $C_{10}H_8O_4$				
	NEGATIVO (m/z=191.03498)		POSITIVO (m/z=193.04955)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	1.27E+07	19.29	3.46E+07	19.22
GRCR	1.74E+07	19.25	1.38E+07	19.25
GRTerm	1.72E+07	19.23	1.42E+07	19.24
GRIdr	2.53E+07	19.21	1.03E+07	19.18
ROLC	2.18E+07	19.24	1.41E+07	19.22
ROLC CR	8.80E+06	19.24	5.57E+06	19.22
ROLCTerm	8.33E+06	19.24	6.97E+06	19.23
ROLCIdr	8.37E+06	19.24	5.05E+06	19.22
WT	-		1.29E+07	19.26
WTCR	2.81E+07	19.23	1.90E+07	19.23
WTTerm	6.67E+06	19.23	4.21E+06	19.25
WTIdr	9.01E+06	19.23	5.02E+06	19.25

Tabella 18 Intensità di segnale saccarosio.

saccarosio $C_{12}H_{22}O_{11}$				
	NEGATIVO (m/z=341.10894)		POSITIVO (m/z=343.12349)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	9.27E+05	2.03	-	
GRCR	9.10E+06	2.02	1.93E+05	2.03
GRTerm	8.10E+06	2.03	1.11E+05	2.03
GRIdr	1.31E+06	2.02	1.55E+04	2.08
ROLC	7.16E+05	2.04	-	
ROLC CR	5.59E+06	2.02	4.60E+05	2
ROLCTerm	4.05E+06	2.02	1.31E+05	2.01
ROLCIdr	6.70E+06	2.02	3.03E+05	2.01
WT	6.33E+05	2.03	-	
WTCR	4.83E+06	2	1.11E+05	2
WTTerm	2.39E+06	2.02	7.86E+04	2.01
WTIdr	3.57E+06	2.02	1.29E+05	2.01

Tabella 19 Intensità di segnale acido salicilico.

acido salicilico $C_7H_6O_3$				
	NEGATIVO (m/z=137.02442)		POSITIVO (m/z=139.03897)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	1.88E+06	17.62	-	
GRCR	1.77E+06	17.54	-	
GRTerm	2.13E+06	17.58	-	
GRIdr	1.89E+06	17.44	-	
ROLC	2.76E+06	17.54	-	
ROLC CR	1.64E+06	17.52	-	
ROLCTerm	2.08E+06	17.57	-	
ROLIdr	1.78E+06	17.54	-	
WT	1.84E+06	17.41	-	
WTCR	1.88E+06	17.43	-	
WTTerm	1.06E+06	17.5	-	
WTIdr	1.19E+06	17.51	-	

Tabella 20 Intensità di segnale prolina.

prolina $C_5H_9NO_2$				
	NEGATIVO (m/z=114.05605)		POSITIVO (m/z=116.07061)	
campione	Intensità	t_r	Intensità	t_r
GR	-		6.52E+06	1.96
GRCR	-		6.19E+06	2
GRTerm	-		1.12E+07	1.95
GRIdr	-		9.72E+06	1.95
ROLC	-		3.38E+06	1.95
ROLC CR	-		9.68E+06	1.95
ROLCTerm	-		4.83E+06	1.95
ROLIdr	-		1.55E+07	1.95
WT	-		3.50E+06	1.96
WTCR	-		9.50E+06	1.95
WTTerm	-		3.40E+06	1.95
WTIdr	-		2.21E+06	1.98

Appendice III

Tabella 21 Intensità di segnale acido salicilico marcato ^{13}C nei campioni e nei bianchi.

acido salicilico ^{13}C			
campioni	massa sperim.	t_R	intensità
B1	143.04448	17.65	3.75E+06
B2	143.04442	17.67	3.60E+06
B3	143.04442	17.68	4.42E+06
GRCR1	143.04478	17.56	2.11E+06
GRCR2	143.04478	17.54	1.73E+06
GRCR3	143.04480	17.5	2.27E+06
GRIDR1	143.04483	17.5	2.21E+06
GRIDR2	143.04491	17.49	2.30E+06
GRIDR3	143.04489	17.49	2.25E+06
NIGR1	143.04468	17.62	5.73E+05
NIGR2	143.04485	17.53	2.00E+06
NIGR3	143.04478	17.56	1.88E+06
NIGRTerm1	143.04486	17.6	1.96E+06
NIGRTerm2	143.04480	17.6	1.83E+06
NIGRTerm3	143.04477	17.58	2.02E+06
ROLC1	143.04480	17.54	2.18E+06
ROLC2	143.04480	17.56	2.10E+06
ROLC3	143.04475	17.52	2.25E+06
ROLCCR1	143.04477	17.54	2.45E+06
ROLCCR2	143.04474	17.52	2.39E+06
ROLCCR3	143.04468	17.52	2.42E+06
ROLCIDR1	143.04485	17.54	1.92E+06
ROLCIDR2	143.04483	17.55	2.28E+06
ROLCIDR3	143.04480	17.59	1.88E+06
ROLCTerm1	143.04478	17.57	2.06E+06
ROLCTerm2	143.04477	17.57	1.87E+06
ROLCTerm3	143.04483	17.52	1.94E+06
WTCR1	143.04466	17.45	2.32E+06
WTCR2	143.04466	17.53	2.31E+06
WTCR3	143.04468	17.56	2.26E+06
WTIDR1	143.04468	17.56	1.81E+06
WTIDR2	143.04463	17.53	1.94E+06
WTIDR3	143.04463	17.56	2.09E+06
WTterm1	143.04480	17.52	2.09E+06
WTterm2	143.04474	17.5	2.04E+06
WTterm3	143.04477	17.56	2.15E+06
WT1	143.04460	17.49	2.23E+06
WT2	143.04457	17.41	1.72E+06
WT3	143.04453	17.38	2.03E+06

6. Bibliografia

1. **Y. Tikunov, S. Liptenok, R. Hall, A. Bovy, R. de Vos.** MSClust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. *Metabolomics*. 2011.
2. **Campbell, N.** *Principi di biologia*. s.l. : Zanichelli, 1998.
3. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). *International Association of Plant Taxonomy*. [Online] 2011.
4. **Siani, V.** Piante e fotosintesi. *Ecologia e Nutrizione*. 2006.
5. **Gamow, G.** *Biografia della Fisica*. s.l. : Mondadori, 1963.
6. **B. Buchanan, W. Gruissem, R. Joes.** biochimica e biologia molecolare delle piante. s.l. : Zanichelli, 2003.
7. **Lupia Palmieri, Parotto, Saraceni, Strumia.** *Biologia. Scienze naturali*. s.l. : Zanichelli, 2011.
8. **H. Mohr, P. Schopfer.** *Plant Physiology*. s.l. : Springer, 1995.
9. **J. Tymoczko, J. Berg, L. Stryer.** *Principi di biochimica*. s.l. : Zanichelli, 2010.
10. Kegg database. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. [Online]
11. **N. Housome, B. Housome, D. Tomos, G. Jones.** Plant Metabolites and Nutritional Quality of Vegetables. *Journal of food science*. 2008, Vol. 73, pp. 48-65.
12. **K. Caldentey, D. Inzé.** Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Plant Science*. 2004, Vol. 9, 9, pp. 433-440.
13. **S. Fraire-Velazquez, V. Balderas-Hernandez.** Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses. *INTECH*. 2013, pp. 25-48.
14. **Rose, S.** *La chimica della vita. Come la cellula costruisce e trasforma le proprie sostanze*. s.l. : Mondadori, 1982.
15. **Rachmilevitch, Shimon, Cousins, Asaph B and Bloom, Arnold J.** Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, Vol. 101, 31, pp. 11506-11510.
16. **Moss, G.** *INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY*. [Online] School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London, Mile End Road, London, E1 4NS, UK.
17. **B. Forde, P. Lea.** Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*. 2007, Vol. 58, 9.
18. **R. Azevedo, M. Lancien, P. Lea.** The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids*. 2006, Vol. 30.
19. **M. King, PhD.** Nucleotide metabolism. *The medical biochemistry page*. [Online] 1996-2014.
20. **Rhodes, David.** Department of Horticulture & Landscape Architecture, Purdue University. [Online] 2009.
21. **A. Barta, K. Sommergruber, D. Thompson, K. Hartmuth, M. Matzke, A. Matzke.** The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*. 1986, Vol. 6.
22. **J. Slightom, M. Durand-Tardif, L. Jouanin, D. Tepfer.** Nucleotide Sequence Analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* Agropine Type Plasmid. *Molecular Genetics and Genomics*. 1986, Vol. 261, 1.
23. *A decade of EU-funded GMO Research 2001-2010. Commission, European.* Brussels : s.n., 2010.
24. **R. Croteau, T. Kutchan, N. Lewis.** *Natural Products (Secondary Metabolites). Chapter 24*. s.l. : Biochemistry & Molecular Biology of Plants, 2000.
25. **A. Ibanez, J. Scharfe, P. Bones, A. Pirkl, S. Meldau, I. Baldwin, F. Hillenkamp, E. Weis, K. Dreisewerd.** Rapid metabolic profiling of *Nicotiana tabacum* defence response against *Phytophthora nicotianae* using

- direct infrared laser desorption ionization mass spectrometry and principal component analysis. *Plant methods*. 2010, Vol. 6, 14, pp. 1-16.
26. **D. Ryan, M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, S. Lavee.** Biotransformations in phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientiae Horticulturae*. 2002, Vol. 92.
27. **H. Wu, J. Guo, S. Chen, X. Liu, Y. Zhou, X. Zhang, X. Xu.** Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, Vol. 72.
28. **L. Claveria, O. Jauregui, C. Codina, A. Tiburcio, J. Bastida, F. Viladomat.** Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. *Plant Science*. 2012, Vol. 182.
29. **M. di Carro, C. Ianni, E. Magi.** Determination of terpenoids in plant leaves by GC-MS: development of the method and application to *Ocimum basilicum* and *Nicotiana glauca*. *Analytical Letters*. 2013, Vol. 46.
30. **D. McGarvey, R. Croteau.** Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell*. 1995, Vol. 7.
31. **C. Grubb, S. Abel.** Glucosinolate metabolism and its control. *Plant Science*. 2006, Vol. 11, 2.
32. **X. Yan, S. Chen.** Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta*. 2007, Vol. 226.
33. **S. Moco, R. Bino, R. de Vos, J. Vervoort.** Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007, Vol. 26, 9, pp. 855-866.
34. **J. Allwood, D. Ellis, R. Goodacre.** Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiologia Plantarum*. 2008, Vol. 132, pp. 117-135.
35. **L. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M. Beale, R. Beger, C. Daykin, T. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J. Griffin, T. Hankemeier, N. Hardy, J. Harnly, R. Higashi, J. Kopka, A. Lane, J. Lindon, P. Marriott, A. Nicholls, M. Reilly, J. Thaden, M. Viant.** Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*. 2007, Vol. 3, pp. 211-221.
36. **R. De Vos, S. Moco, A. Lommen, J. Keurentjes, R. Bino, R. Hall.** Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*. 2007, Vol. 2, 4, pp. 778-791.
37. **W. Dunn, A. Erban, R. Weber, D. Creek, M. Brown, R. Breitling, T. Hankemeier, R. Goodacre, S. Neumann, J. Kopka, M. Viant.** Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*. 2013, Vol. 9, pp. 44-66.
38. **J. Loughrin, T. Hamilton-Kemp, R. Andersen, D. Hildebrand.** Headspace Compounds from Flowers of *Nicotiana tabacum* and Related Species. *Journal agricultural food chemistry*. 1990, Vol. 38, 2.
39. **F. Ardini, F. Soggia, M. Abemoschi, E. Magi, M. Grotti.** Ionic profiling of *Nicotiana glauca* wild-type and mutant genotypes exposed to abiotic stress. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, Vol. 405, pp. 665-677.
40. **Fuoco, R.** *Metodologie analitiche innovative per lo studio della risposta metabolica a stress idrico e stress termico di piante di Nicotiana glauca a struttura ormonale geneticamente modificata*. 2009.
41. **M. Schena, A. Lloyd, R. Davis.** A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991, Vol. 88.
42. **M. Intrieri, M. Buiatti.** The Horizontal Transfer of *Agrobacterium rhizogenes* Genes and the Evolution of the Genus *Nicotiana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2001, Vol. 20, 1, pp. 100-110.
43. **J. Palazon, R. Cusidò, C. Roig, M. Pinol.** Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. *Plant cell reports*. 1998, Vol. 17, pp. 384-390.
44. **Bulgakov, V.** Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*. 2008, Vol. 26, pp. 318-324.
45. **R. Fuoco, P. Bogani, G. Capodaglio, M. del Buddha, O. Abollino, S. Giannarelli, M. Spiriti, B. Muscatello, S. Doumet, C. Turetta, R. Zangrando, V. Zelano, M. Buiatti.** Response to metal stress of *Nicotiana*

- langsdorffiplants wild-type and transgenic for the rat glucocorticoid receptor gene. *Journal of Plant Physiology*. 2013.
46. **J. Chutia, S. Borah**. Water Stress Effects on Leaf Growth and Chlorophyll Content but Not the Grain Yield in Traditional Rice (*Oryza sativa* Linn.) Genotypes of Assam, India. II. Protein and Proline Status in Seedlings under PEG Induced Water Stress. *American Journal of Plant Sciences*. 2012, Vol. 3, pp. 971-980.
47. **Pascale, S. de**. *Aspetti fisiologici della risposta delle piante agli stress abiotici*. s.l. : Progetto cofinanziato dal programma LIFE+.
48. **A. Wahid, S. Gelani, M. Ashraf, M. Foolad**. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*. 2007, Vol. 61, pp. 199-223.
49. **Holler, Skoog, Crough**. *Chimica Analitica Strumentale. II edizione*. . s.l. : Edises, 2007.
50. *Ion Max and Ion Max-S API Source. Hardware Manual. Scientific, Thermo*. 2008.
51. *Exactive Plus . Operating Manual. Scientific, Thermo*.
52. *Finnigan LTQ Gettin Started. Scientific, Thermo*.
53. **M. Hardman, A. Makarov**. Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source. *Analytical Chemistry*. 2003, Vol. 75, pp. 1699-1705.
54. **R. Perry, R. Cooks, R. Noll**. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*. 2008, Vol. 27, pp. 661-699.
55. **M. Scigelova, A. Makarov**. Orbitrap Mass Analyzer- Overview and Applications in Proteomics. *Practical Proteomics*. 2006, Vols. 1-2, pp. 16-21.
56. **Q. Hu, R. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Cooks**. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry*. 2005, Vol. 40, pp. 430-443.
57. *Presentazione Thermo Scientific:Orbitrap. M. Scigelova, A. Makarov*.
58. *Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. Makarov, Scigelova*. s.l. : Journal of Chromatography, 2010, Vol. 1217.
59. **Y. Wung, Ming Gu**. The concept of spectral accuracy for MS. *Analytical Chemistry*. 2005, Vol. 82.
60. **J. Olsen, L. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, M. Mann**. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2005, Vol. 4.12.
61. **Spectrometry, American Society for Mass**. *What is Mass Spectrometry*.
62. **Arjen, Lommen**. MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. *Analytical Chemistry*. 2009, Vol. 81, 8, pp. 3079-3086.
63. **Todeschini, R**. *Introduzione alla chemiometria*. Napoli : Edises.
64. **Brereton, R**. *Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. s.l. : Wiley, 2003.
65. **D. Massart, L. Kaufman**. *The interpretation of analytical chemical data by the use of cluster analysis*. s.l. : Wiley, 1983.
66. **Brereton, R**. *Multivariate pattern recognition in chemometrics, illustrated by case studies*. s.l. : Elsevier, 1992.
67. **J. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. de Brabander, F. Andre, B. le Bizec**. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2005, Vol. 529, pp. 129-136.
68. **R. Zeleny, D. Kolarich, R. Strasser, F. Altmann**. Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. *Planta*. 2006, Vol. 224, pp. 222-227.
69. **T. Smyth, V. Ramachandran, A. McGuigan, J. Hopps, W. Smyth**. Characterisation of nicotine and related compounds using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their detection by liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007, Vol. 21.

70. **L. Ding, F. Xie, M. Zhao, J. Xie, G. Xu.** Rapid characterization of the sucrose esters from oriental tobacco using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, Vol. 20, pp. 2816-2822.
71. **S. Slocombe, I. Schauvinhold, R. McQuinn, K. Besser, N. Welsby, A. Harper, N. Aziz, Y. Li, T. Larson, J. Giovannoni, R. Dixon, P. Broun.** Transcriptomic and reverse genetic analyses of branched chain fatty acid and acyl sugar production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology Preview*. 2008, pp. 1-59.
72. **H. Zhu, Y. Feng, J. Yang, W. Pan, Z. Li, Y. Tu, X. Zhu, G. Huang.** Separation and characterization of sucrose esters from Oriental tobacco leaves using accelerated solvent extraction followed by SPE coupled to HPLC with ion-trap MS detection. *Journal of Separation Science*. 2013, Vol. 36, pp. 2486-2495.
73. **H. Sy Vu, P. Tamura, N. Galeva, R. Chaturvedi, M. Roth, T. Williams, X. Wang, J. Shah, R. Welti.** Direct Infusion Mass Spectrometry of Oxylipin-Containing Arabidopsis Membrane Lipids Reveals Varied Patterns in Different Stress Responses. *Plant Physiology*. 2012, Vol. 158.
74. **A. Ibrahim, A. Schutz, J. Galano, C. Herrfurth, K. Feussner, T. Durand, F. Brodhun, I. Feussner.** The alphabet of galactolipids in *Arabidopsis thaliana*. *frontiers in PLANT SCIENCE*. 2011, Vol. 2, 95, pp. 1-24.
75. **Y. Kim, J. Choi, J. Yoo, Y. Park, M. Kim.** Structural Identification of Glycerolipid Molecular Species Isolated from Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Using Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 1999, Vol. 267, pp. 260-270.
76. **I. Yordanov, V. Velikova, T. Tsonev.** Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*. 2000, Vol. 38, 1, pp. 171-186.
77. **A. Gigon, A. Matos, D. Laffray, Y. Fodil, A. Thi.** Effect of Drought Stress on Lipid Metabolism in the Leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Annals of Botany*. 2004, Vol. 94, pp. 345-351.
78. **Upchurch, R.** Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnological Letters*. 2008, Vol. 30, pp. 967-977.
79. **J. Tanguy, D. Tepfer, D. Burtin.** Effects of Ri TL-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* and the inhibitors of polyamine synthesis on growth, floral development, sexual organogenesis and polyamine metabolism in tobacco. *Plant Science*. 1991, Vol. 80, pp. 131-144.
80. **Y. Kasukabe, L. He, K. Nada, S. Misawa, I. Ihara, S. Tachibana.** Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 2004, Vol. 45, 6.
81. **R. Alcazar, F. Marco, J. Cuevas, M. Patron, A. Ferrando, P. Carrasco, A. Tiburcio, T. Altabella.** Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnological Letters*. 2006, Vol. 28, pp. 1867-1876.
82. **Kuc, J.** ANTIFUNGAL COMPOUNDS FROM PLANTS. *Phytochemical Resources For Medicine and Agriculture*. 1992, pp. 159-184.
83. **B. Zywickia, G. Catchpolea, J. Draperb, O. Fiehna.** Comparison of rapid liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic *Weld*-grown potatoes. *Analytical Biochemistry*. 2005, Vol. 336, pp. 178-186.
84. **Mweetwa, A. Mutiti.** Biosynthesis of Steroidal Glycoalkaloids in *Solanum chacoense* Bitter. 2009, pp. 1-141.
85. **K. Kaeneko, M. Tabaka, H. Mitsuhashi.** ORIGIN OF NITROGEN IN THE BIOSYNTHESIS OF SOLANIDINE BY *VERATRUM GRANDIFLORUM*. *Phytochemistry*. 1976, Vol. 15, pp. 1391-1393.
86. *Dictionary of Natural Products*. [Online]
87. **S. Heiling, M. Schuman, M. Schoettner, P. Murkerjee, B. Berger, B. Schneider, A. Jassbi, I. Baldwin.** Jasmonate and ppHsystemin Regulate Key Malonylation Steps in the Biosynthesis of 17-

Hydroxygeranylinalool Diterpene Glycosides, an Abundant and Effective Direct Defense against Herbivores in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Cell*. 2010, Vol. 22, pp. 273-292.

88. **T. Yoshihara, K. Yamaguchi, S. Takamatsu, S. Sakamura.** A New Lignan Amide, Grossamide, from Bell Pepper. *Agricultural Biological Chemistry*. 1981, Vol. 45, 11.

89. **L. Lin, J. Harnly.** Identification of Hydroxycinnamoylquinic Acids of Arnica Flowers and Burdock Roots Using a Standardized LC-DAD-ESI/MS Profiling Method. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008, Vol. 56, pp. 10105-10114.

90. **N. Fang, S. Yu, R. Prior.** LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002, Vol. 50, pp. 3579-3585.

91. **M. del Bubba, C. Ancillotti, L. Checchini, L. Ciofi, D. Fibbi, C. Gonnelli, S. Mosti.** Chromium accumulation and changes in plant growth, selected phenolics and sugars of wild type and genetically modified *Nicotiana Langsdorffii*. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, Vol. 262, pp. 394-403.

92. **J. Lipiec, C. Doussan, A. Nosalewicz, K. Kondracka.** Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics*. 2013, Vol. 27, pp. 463-477.

93. **S. Malik, S. Andrade, A. Sawaya, A. Bottcher, P. Mazzafera.** Root-zone temperature alters alkaloid synthesis and accumulation in *Cantharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum*. *Industrial Crops and Products*. 2013, Vol. 49, pp. 318-325.

94. *Atmospheric pressure ion sources*. **T. Covey, B. Thomson, B. Schneider.** s.l. : Mass spectrometry Reviews, 2009, Vol. 28.

95. **A. America, J. Cordewener, M. van Geffen, A. Lommen, J. Vissers, R. Bino, R. Hall.** Alignment and statistical difference analysis of complex peptide data sets generated by multidimensional LC-MS. *Proteomics*. 2006, Vol. 6.

96. **A. Crozier, J. Burns, A. Aziz, A. Stewart, H. Rabiasz, G. Jenkins, C. Edwards, M. Leans.** Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research*. 2000, Vol. 33, 2.

97. **K. Sieciechowicz, K. Joy, R. Ireland.** The metabolism of asparagine in plants. 1988, Vol. 27, 3.

98. **C. Alvarez, M. Bermudez, L. Romero, C. Gotor, I. Garcia.** Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. *New Phytologist*. 2012, Vol. 193.

99. *Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants*. **L. del Río, G. Hendry.** Granada : s.n., 1998.

100. **J. Bourguignon, F. Rebeille, R. Douce.** Serine and Glycine Metabolism in Higher Plant. [book auth.] B. Singh. *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. 1999.

101. **R. King, R. Bonfiglio, C. Metzler, C. Stein, T. Olah.** Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. *Journal American Society for Mass Spectrometry*. 2000, Vol. 11.

Ringraziamenti

Arrivata al secondo traguardo universitario, desidero fare alcuni ringraziamenti.

Vorrei ringraziare il mio relatore Professor Capodaglio e la mia correlatrice Dott.ssa Elisa Scalabrin per avermi saggiamente guidato nel lungo percorso del tirocinio e seguita nella stesura della tesi.

Un sentito ringraziamento va alla mia famiglia, mamma Sandra, papà Bruno, la mia “sorellina” Federica e il mio fidanzato Roberto che, in tutti gli anni di studio, mi hanno sostenuto, supportato ma soprattutto sopportato nei miei momenti felici e nei mille momenti di tristezza e ansia.

Grazie a loro non ho mollato mai, ho impiegato tutte le mie forze ed energie per raggiungere e conseguire anche la Laurea Magistrale.

Ringrazio parenti, amici e compagni di studi che mi hanno fatto sorridere e allontanare per un attimo il mio pessimismo.

Infine un grazie va a tutti i professori che in questi cinque anni ho avuto il piacere di conoscere e da cui ho tentato di apprendere tutto il necessario per formare il mio bagaglio personale, per avviarmi verso una nuova vita: il mondo del lavoro.