

Università di Napoli Federico II



Dipartimento di Agraria

Dottorato di Ricerca in

Scienze Agrarie e Agroalimentari

Caratterizzazione di sostanze uniche ed estratti etanolici da compost verdi.
Valutazione degli effetti antiossidanti e biostimolanti in piante di lattuga

Docente guida:

Chiar. mo Prof. Piccolo Alessandro

Candidata:

Salzano Melania

Co-Tutor:

Dott. De Martino Antonio

Coordinatore:

Prof. Guido D'Urso

2017-2020

*“Cominciate col fare ciò che è necessario,
poi ciò che è possibile. E all'improvviso vi
sorprenderete a fare l'impossibile”*

(San Francesco)

Indice

Sommario	1
-----------------	----------

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE

1.1 Le sostanze umiche	4
1.2 Effetti biostimolanti delle sostanze umiche	7
1.3 Caratterizzazione: l'uso di tecniche avanzate per caratterizzare la materia organica	13
1.4 L'uso di solventi organici per l'estrazione di composti bioattivi	17

CAPITOLO 2 SCOPO DEL LAVORO

2.1 Scopo del lavoro	20
----------------------	----

CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI

3.1 Compost e sostanze umiche	24
3.2 Estrazione sostanze umiche	25
3.3 Estrazione idroetanolica	25
3.4 Analisi elementare	26
3.5 Spettroscopia DRIFT	26
3.6 Spettroscopia ¹³ C-CPMAS-NMR	26
3.7 Pirolisi TMAH – GC/MS	27
3.8 Analisi GC/MS	28
3.9 Saggio ABTS	29
3.10 Determinazione del contenuto di fenoli totali	30
3.11 Test di germinazione con semi di <i>Zea mays</i>	31
3.12 Saggio di germinazione con semi di <i>Lepidium sativum</i>	32

3.13	Esperimento in vaso su lattuga con sostanze umiche da compost verde e umati di potassio	33
3.14	Esperimento in vaso su lattuga con estratti idroetanolici	33
3.15	Determinazione del contenuto di clorofilla	34
3.16	Analisi dei dati	35
3.17	Estrazione di metaboliti primari ed analisi mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$	35
3.18	Spettroscopia NMR	36
3.19	Estrazione metaboliti secondari ed analisi mediante spettroscopia IT-TOF	36
3.20	Analisi metabolomica mediante LC-MS-IT-TOF	37
3.21	Analisi statistica	38

CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1	Compost e sostanze umiche: caratterizzazione e valutazione dell'attività antiossidante e dell'effetto biostimolante	41
4.1.1	Analisi elementale di compost e sostanze umiche	41
4.1.2	Analisi DRIFT	42
4.1.3	Spettroscopia $^{13}\text{C-CPMAS-NMR}$	44
4.1.4	Termochemolisi-GC/MS	50
4.1.5	Attività antiossidante e contenuto fenolico totale in sostanze umiche da compost verdi	57
4.1.6	Test di germinazione con semi di mais	60
4.1.7	Esperimento in vaso: valutazione delle biomassa e del contenuto di clorofilla di piante di lattuga	64
4.1.8	Analisi metabolomica IT-TOF	68
4.2	Estratti etanolici: caratterizzazione e valutazione dell'attività antiossidante e dell'effetto biostimolante	80
4.2.1	Caratterizzazione chimica degli estratti in etanolo	80

4.2.2 Contenuto di fenoli totali e attività antiossidante	88
4.2.3 Test di germinazione	92
4.2.4 Prove in vaso con estratti in etanolo mediante applicazione fogliare	96
4.2.5 Analisi metaboliti primari mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ degli estratti in etanolo	100

CAPITOLO 5 CONCLUSIONI

5.1 Conclusioni	110
-----------------	-----

CAPITOLO 6 BIBLIOGRAFIA

6.1 Bibliografia	114
------------------	-----

CAPITOLO 7 APPENDICE

7.1 Appendice	138
---------------	-----

Sommario

Le sostanze umiche giocano un ruolo fondamentale nel migliorare le condizioni fisiche, chimiche e biologiche del suolo, nel determinare il sequestro del carbonio nel suolo e nel stimolare la crescita vegetale. Da tali proprietà scaturisce il loro crescente utilizzo come componente principale in trattamenti su suolo o in pianta. In questo lavoro sono state isolate sia sostanze umiche sia composti solubili in soluzioni idroetanoliche (acqua:etanolo 30:70, v:v) da un ammendante compostato verde, con l'obiettivo di individuare nuovi prodotti il cui impiego apporti benefici alla pianta, e che servano anche a valorizzare il riutilizzo di scarti vegetali derivanti dalla filiera produttiva di carciofo, caffè, peperone o limone (pastazzo).

I compost e i relativi estratti sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare mediante tecniche analitiche quali spettroscopia DRIFT, Pirolisi-GC/MS, spettroscopia ^{13}C -CP-MAS-NMR. Da tale indagine è emersa una marcata differenza in composizione molecolare tra i compost ed i relativi estratti, in gran parte ascrivibile al diverso materiale vegetale impiegato nelle fasi di compostaggio. In particolare le sostanze umiche estratte da compost da carciofo hanno esibito, in assoluto, i valori più elevati per gli indici di idrofobicità e di aromaticità.

I prodotti in esame estratti dai compost verdi sono stati poi sottoposti a dei saggi per valutarne l'attività biologica ed identificarne possibili correlazioni struttura/attività. Dai test ABTS e Folin-Ciocalteu è emersa una correlazione positiva tra l'attività antiossidante ed il contenuto di fenoli totali, con valori significativamente più elevati nelle sostanze umiche e negli estratti da compost da carciofo e da pastazzo di limoni.

I test di germinazione relativi al trattamento di semi di *Zea mays* con sostanze umiche hanno evidenziato un effetto sull'allungamento della radice. Tale effetto è stato particolarmente pronunciato nel caso delle sostanze umiche da compost da carciofo ed è stato attribuito all'elevato contenuto in composti fenolici.

Sulla base di tali risultati, si è scelto di testare, su piante di lattuga, le sostanze umiche da compost da carciofo in associazione con umati di potassio estratti da lignite, somministrandoli sia

singolarmente che miscelati a diverse percentuali. Risultati fenologici (biomassa secca e contenuto di clorofilla) hanno indicato un effetto significativamente positivo solo quando i materiali sono stati impiegati singolarmente. L'analisi del metaboloma secondario, condotta mediante spettrometria di massa IT-TOF, ha rivelato che le sostanze uniche da carciofo inducono una lieve condizione di stress cui segue una modulazione nel contenuto di alcune classi di flavonoidi.

Con gli estratti etanolic da caffè, carciofo e pastazzo, sono stati condotti saggi di fitotossicità su semi di *Lepidium sativum*. I risultati hanno permesso non solo di scartare la fitotossicità ma anche di osservare un effetto sull'allungamento radicale, particolarmente pronunciato per i trattamenti a base di estratti da compost da carciofo e da pastazzo di limoni.

Tali prodotti sono stati poi somministrati in pianta anche via applicazione fogliare.

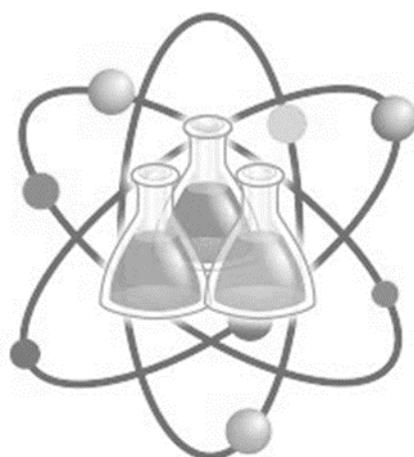
Mentre, in termini di biomassa secca e contenuto di clorofilla, non è stato riscontrato alcun risultato degno di nota, l'analisi del metaboloma primario, eseguito via spettroscopia ¹H-NMR, ha rivelato piccole variazioni nel contenuto di alcuni carboidrati, acidi organici e amminoacidi.

I risultati riportati nel presente lavoro di tesi testimoniano come le sostanze qui considerate siano capaci di determinare un effetto biologico su pianta, la cui azione ed intensità varia in funzione della specifica composizione molecolare del prodotto impiegato per il trattamento.

Inoltre, si è osservato come alcuni dei prodotti studiati promuovano lo sviluppo vegetale permettendo di considerare materiali derivanti dal riciclo di biomasse vegetali come fonti ecosostenibili di biostimolanti per le colture agrarie.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE



1.1. Le sostanze umiche

La sostanza organica (SO) del suolo è un importante componente dei sistemi agricoli in quanto strettamente connessa a diverse proprietà dei suoli sia fisiche che biologiche. La diminuzione della SO nelle aree agricole del continente europeo è uno dei principali fattori che influenzano la fertilità dei suoli e la crescita delle piante (Wood and Baudron, 2018). La SO del suolo è costituita per più dell'80% da sostanze umiche (SU) che rappresentano un fondamentale strumento ecologico per la regolazione del contenuto e del sequestro del carbonio del suolo, per l'attività microbica e per la produzione vegetale (Piccolo et al., 2018). In particolare, le SU sono il risultato della trasformazione sia chimica che biologica di residui di piante e animali che vengono depositati nel suolo e rappresentano la più grande riserva di carbonio organico della superficie terrestre, con 1300 Pg di carbonio nel primo metro di suolo e 3000 Pg di carbonio a livello degli strati più profondi (Köchy et al., 2015). L'importanza delle SU è collegata al loro ruolo sia ecologico che ambientale (Canellas et al., 2015; Piccolo et al., 2018; Piccolo et al., 2019). Questa frazione organica colloidale garantisce il miglioramento delle principali caratteristiche del suolo; quelle fisiche favorendo l'aumento della ritenzione idrica ed una maggiore stabilità degli aggregati di suolo; quelle biologiche influenzando le attività di base delle comunità microbiche del suolo (Magdoff and Weil, 2004), ed infine quelle chimiche in quanto le sostanze umiche contengono la forma organica dei principali macronutrienti (azoto, fosforo, zolfo) e la forma complessata dei micronutrienti vegetali. Questo materiale organico umificato rappresenta sia la componente del suolo più stabile dal punto di vista biologico, sia quella maggiormente bioattiva. Basandosi sulle suddette proprietà, l'aumento del contenuto di sostanze umiche nei suoli coltivati è da considerarsi una strategia sostenibile per permettere la stabilizzazione del SO del suolo, per il sequestro di carbonio organico (Piccolo 2012), per stimolare lo sviluppo delle piante aumentandone la resa produttiva (Canellas and Olivares, 2014), per promuovere l'attività dei microrganismi del suolo, per

regolare il ciclo del carbonio e dell'azoto nel suolo e per controllare il comportamento ambientale dei contaminanti sia organici che inorganici (Piccolo et al., 1996; 2019).

Le sostanze umiche sono tradizionalmente classificate in tre grandi gruppi, creati sulla base della loro solubilità a diversi pH: 1) acidi fulvici (AF), solubili in tutte le condizioni di pH; 2) acidi umici (AU) solubili in soluzioni alcaline e 3) umina (UM) strettamente associata alla componente minerale del suolo, insolubile a qualsiasi pH e considerata la frazione più inerte delle sostanze umiche (Nebbioso et al., 2015).

Per diversi anni, la comunità scientifica si è interrogata sulla reale conformazione e struttura delle sostanze umiche. La prima definizione fu data da *Achard* nel 1786, ma a partire da quell'anno, la complessa ed eterogenea composizione delle sostanze umiche ha favorito la definizione e l'espressione di diverse ipotesi. Solo all'inizio del secolo, *Piccolo* (2001; 2002) ha specificato quale fosse la reale natura delle sostanze umiche attraverso la formulazione della “*teoria supramolecolare*”. Da un primo esperimento fu dimostrato che trattando le sostanze umiche con una soluzione diluita di acido acetico la massa di molecole umiche si separava in frazioni più piccole con un peso molecolare apparentemente più basso (Nardi et al., 1988). Il comportamento conformazionale delle sostanze umiche è stato dimostrato da *Piccolo* e collaboratori (1996) mediante cromatografia ad esclusione molecolare condotta a bassa pressione attraverso cui le variazioni del peso molecolare con interazione con acido acetico sono state osservate. Questi studi pionieristici sono stati confermati da analisi condotte mediante la rapida e riproducibile cromatografia ad esclusione molecolare ad alta prestazione (HPSEC), ed hanno dimostrato come il profilo di eluizione delle sostanze umiche cambiava dopo l'aggiunta di piccoli volumi di acido acetico (Cozzolino et al., 2001; Piccolo et al., 2002) determinando uno spostamento dei picchi di eluizione verso maggiori volumi di eluizione sulla base dell'abbassamento del pH dovuto all'aggiunta di acidi organici (Piccolo et al., 2019).

Questi risultati sperimentali hanno messo in dubbio la precedente interpretazione della natura chimica delle sostanze umiche come strutture polimeriche, ma sono diventati la base per una

più plausibile descrizione, termodinamicamente più valida, delle natura supramolecolare delle sostanze umiche. Oggi, le sostanze umiche sono viste come associazioni supramolecolari di molecole eterogenee con peso molecolare in media inferiore a 1000 Da (Piccolo, 2001; Piccolo et al., 2002; 2019), tenute insieme da forze di legame deboli (come interazioni di van der Waals, π - π , CH- π e legami idrogeno) in domini contigui sia idrofobici sia idrofilici che mostrano solo apparentemente un alto peso molecolare (Piccolo et al., 2002) (Piccolo et al., 2018, 2019) (figura 1).

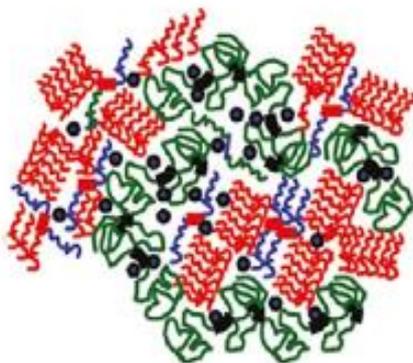


Figura 1: Struttura supramolecolare delle sostanze umiche (Nebbioso and Piccolo, 2011)

L'organizzazione supramolecolare è dovuta alla stabilizzazione del reciproco assemblaggio delle componenti idrofiliche con quelle idrofobiche. Infatti, le sostanze umiche sono il risultato di molecole eterogenee che interagiscono le une con le altre in base alla struttura, alla taglia, ed all'affinità chimica (Nebbioso and Piccolo, 2012). La complessità dell'associazione supramolecolare può essere ridotta trattando le sostanze umiche con soluzioni poco concentrate di acidi organici, che alterano la conformazione originale, e portano alla stabilizzazione di nuove strutture di dimensioni inferiori grazie alla formazione di legami di idrogeno con le complementari funzioni acide delle sostanze umiche e di forza maggiore delle forze dispersive deboli che stabilizzano la conformazione umica originale (Conte and Piccolo, 1999; Piccolo et al., 1999).

Il concetto di natura supramolecolare delle sostanze umiche ha premesso di sviluppare una nuova tecnica, chiamata “*Umeomica*”, che implica l’isolamento di più frazioni umiche omogenee mediante l’uso di blandi passaggi di separazione molecolare (Nebbioso et al., 2014, 2015, Nebbioso and Piccolo, 2011, 2012;). Questo frazionamento sequenziale permette di ridurre la complessità della matrice organica con il progressivo rilascio di associazioni supramolecolari meno complesse, che facilitano la determinazione analitica della loro struttura molecolare.

I progressi scientifici nella comprensione della natura delle sostanze umiche hanno promosso nuovi studi al fine di chiarire il ruolo che questi materiali hanno come mediatori nei processi di interazione che coinvolgono suolo, pianta e microorganismi (García et al., 2014; Piccolo et al., 2018, 2019). Gli effetti che le sostanze umiche hanno sulla piante possono essere sia di tipo diretto che indiretto. Gli effetti indiretti sono collegati all’impatto che hanno sulle proprietà chimiche, fisiche e biologiche del suolo (Piccolo et al., 1992; Chen et al., 2004; Nardi et al., 2002, 2007; Jindo et al., 2016), mentre l’azione diretta è associata alla relazione struttura–attività dei processi biochimici e fisiologici delle piante (Canellas and Olivares, 2014).

1.2. Effetti biostimolanti delle sostanze umiche

La parola “*biostimolante*” appare per la prima volta nella letteratura scientifica nel 2007, quando Kauffman (2007) definì un biostimolante come “*materiale, diverso dai fertilizzanti, che promuove la crescita della pianta se applicato in piccole quantità*”. Questa definizione concorda con quella data da Zhang e Schmidt nel 1997 che hanno associato alla parola biostimolante il concetto di “*materiale che, in minime quantità, promuove la crescita della pianta*” e riportata sul giornale web *Ground Maintenance* (<http://grounds-mag.com>). Per Kauffman era possibile includere nel termine biostimolante una varietà di formulazioni e sostanze, generalmente classificate in tre grandi gruppi: 1) sostanze umiche, 2) prodotti contenenti ormoni, 3) prodotti contenenti

amminoacidi (du Jardin, 2015). In pratica, si può definire biostimolante una qualunque sostanza, che non contenga nutrienti, pesticidi o ammendanti e che possa indurre effetti benefici sulla pianta.

Nel corso degli anni nelle classi dei biostimolanti sono stati inclusi anche estratti di alghe e microorganismi quali funghi, batteri e micorrize. Gli effetti dei biostimolanti sono collegati alla tolleranza a stress biotici e abiotici, alla germinazione e allo sviluppo della pianta. (du Jardin, 2015).

Le SU sono biostimolanti che producono effetti benefici diretti sulla pianta. Ad essi sono da attribuire l'attività ormono-simile e all'incremento della permeabilità delle membrane biologiche (Zhang and Ervin, 2004). *Jindo* e collaboratori (2012) hanno osservato che le SU manifestano un comportamento ormonale auxino-simile che provoca l'allungamento delle radici principali e la formazione di radici laterali. *Canellas e Olivares*, (2014) riportano che la frazione umica solubile induce l'allungamento e la crescita delle radici in seguito all'attivazione e alla continua divisione delle cellule indifferenziate del meristema. Lo studio della struttura supramolecolare delle SU ha permesso di individuare composti auxino-simile in grado di attivare le pompe ATPasiche (Hager, 2003). E' stato infatti dimostrato che le auxine agiscono attraverso il legame con specifici recettori, sia di membrana sia intracellulari creando, tramite pompe ATPasiche di membrana, un gradiente protonico all'esterno della cellula che favorisce l'accumulo di ioni H^+ all'interno della cellula con successiva acidificazione dell'apoplasto, richiamo di acqua e crescita per distensione. L'effetto ormono-simile delle SU non è ancora ben chiaro ma è sicuramente collegato alla protezione dagli stress.

Aydin e collaboratori (2012) hanno dimostrato che l'aggiunta di SU al suolo migliora la tolleranza di piante di fagiolo in condizioni di stress salino in seguito ad una riduzione della conducibilità elettrica del suolo ed alla fuoriuscita di prolina dalle piante. Altri studi hanno evidenziato come le SU, riducendo l'accumulo di prolina e acido abscissico (ABA) all'interno delle piante, ne influenzano la crescita in condizione di stress salino (Moghaddam and Soleimani, 2012).

Calvo e collaboratori (2014) riassumono come il trattamento con acidi umici di piantine cresciute in condizioni di stress idrico aumenta il peso secco di germogli e delle radici, migliora il

livello di clorofilla, carotenoidi, proteine e carboidrati. Infine, studi condotti su piantine di mais cresciute in idroponica hanno mostrato come le SU attivino enzimi collegati alla risposta agli stress (Olivares et al., 2015; Schiavon et al., 2010). *Vaughan* e *Ord* (1981) hanno riportato che le SU sono assorbite dalla pianta mediante l'interazione con le radici, sebbene escludano che possano attraversare la membrana plasmatica. A tal proposito, *Muscolo* e collaboratori (2007) hanno ipotizzato che il passaggio dalla membrana plasmatica possa essere effettuato dalla frazione umica con massa molecolare apparente inferiore a 3500 Da priva di composti aromatici e ricca di gruppi carbossilici. Anche *Nardi* e collaboratori (2007) hanno riportato che componenti umici di piccole dimensioni possono attraversare le cellule radicali attivando poi enzimi coinvolti nella via glicolitica e nella via degli acidi tricarbossilici.

È stata dimostrata l'esistenza di una correlazione positiva tra crescita delle radici e maggiore rilascio di essudati radicali (García et al., 2001). Infatti, suoli trattati con SU hanno mostrato sia una variazione nella composizione degli essudati radicali sia un'acidificazione della rizosfera con conseguente alterazione della struttura supramolecolare del materiale umico del suolo (Canellas et al., 2008). È stato riportato che l'essudazione radicale di acido citrico rompe la struttura supramolecolare delle SU favorendo l'interazione tra le componenti umiche più piccole e la superficie delle radici (Canellas and Olivares 2014). Questa interazione modifica il potenziale redox della membrana radicale e favorisce la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La presenza di ROS nelle cellule comporta un'iperpolarizzazione della membrana con successiva attivazione delle proteine chinasi attivate da mitogeni (MAP) e dei canali del calcio (coinvolti nella risposta agli stress) e maggiore allungamento della radice (García et al., 2019). Quindi, le SU ricche di radicali liberi sono in grado di ridurre la tossicità delle specie chimiche dannose (García et al., 2016). *Barbera* e *García* (2014) hanno mostrato che il perossido di idrogeno (H₂O₂) è tra le specie di ROS i cui livelli sono maggiormente influenzati da determinate concentrazioni di SU. Infatti, a moderate concentrazioni, la perossidazione dei lipidi mediata dai

ROS veniva inibita, mentre concentrazioni elevate risultavano essere deleterie per le piante in quanto i livelli di ROS aumentavano.

Gli acidi umici migliorano anche la fertilità del suolo in quanto incrementano il trasporto di micronutrienti dal suolo alle piante (Chen and Stevenson, 1986). Cationi metallici come ad esempio Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} , importanti per la nutrizione delle piante, in seguito ad un processo di solubilizzazione e complessazione da parte degli acidi umici vengono più facilmente traslocati dal suolo alla pianta (Tahir et al., 2011). Il ruolo degli ioni metallici nella soluzione è lo stesso di quello degli ioni H^+ , vale a dire la neutralizzazione della carica, maggiore è la carica del catione tanto più efficace è la formazione di pseudo-micelle. Studi sul legame AU-metallo hanno dimostrato che questa interazione varia in relazione alla concentrazione e peso atomico del metallo e alla concentrazione di acidi umici (Yates and von Wandruszka, 1999; Christl et al., 2001). Spettri ^{13}C NMR hanno mostrato che le frazioni di SU con basso peso molecolare sono quelle con il maggior numero di gruppi fenolici e carbossilici e sono quindi le frazioni che possono legare i metalli nel modo più efficiente, incrementando i domini pseudo-micellari e l'effetto detergente. Infatti i gruppi funzionali acidi possono reagire rapidamente con cationi polivalenti sulla superficie delle particelle di argilla, formando complessi humus-metalli-argilla (Piccolo et al., 1996a). Va aggiunto che la capacità delle SU di complessare cationi metallici diminuisce la perdita di nutrienti per lisciviazione aumentandone di conseguenza la disponibilità per le piante (Campitelli and Ceppi, 2008).

Un numero considerevole di indagini hanno confermato che le SU migliorano anche la capacità di ritenzione idrica del suolo (Piccolo et al., 1996b) ed i gruppi funzionali idrofilici determinano la quantità di acqua che le SU possono intrappolare (Aquino et al., 2009). Infatti, le molecole d'acqua formano una rete stabile di legami idrogeno con i gruppi contenenti ossigeno nella struttura delle SU (Kučerík et al., 2012; Cihlář et al., 2014).

È noto che le colture agricole sono suscettibili alle infezioni da parte di numerosi agenti patogeni (Termorshuizen et al., 2006) e l'uso ripetuto di pesticidi di sintesi sta causando un aumento della resistenza dei microrganismi a tali composti rendendone inutile l'impiego (Loffredo

et al., 2007). Al contrario dei pesticidi, l'azione biocida di alcuni compost può controllare le popolazioni microbiche patogene senza effetti negativi. Infatti, le comunità microbiche presenti nel compost sono in grado di sopprimere gli agenti patogeni del terreno attraverso vari meccanismi come predazione, antibiosi, iperparassitismo e competizione (Pascual et al., 2002; Mehta et al., 2014). Inoltre, acidi umici e composti fenolici agiscono come fungicidi naturali esercitando effetti tossici direttamente sui patogeni (Cao et al., 2014). Uno studio di Saxena e collaboratori (2015) ha mostrato che l'aggiunta di vermicompost al suolo permetteva una diminuzione del 21% di agenti patogeni (Saxena et al., 2015).

Loffredo e Senesi (2009) hanno riportato che acidi umici isolati da un compost maturo avevano effetti soppressivi nei confronti di *Pythium ultimum* e *Fusarium oxysporum f. sp. callistephi*. Cao e collaboratori (2014) hanno osservato che SU provenienti da differenti fonti a causa delle diverse strutture chimiche avevano differenti capacità di soppressione dei patogeni.

Infatti, i gruppi chinonici, responsabili della formazione di ROS, hanno attività fungicida e battericida mentre i gruppi fenolici effetti antiossidanti. Non va dimenticato che le SU apportate al suolo migliorano i processi metabolici dei microrganismi. Questo ruolo è da imputare alla presenza di gruppi chinonici che fungono da catalizzatori sia nel trasferimento di elettroni nella respirazione cellulare sia nella fosforilazione (Jackson, 1995).

Altri studi hanno invece mostrato che le SU influenzano il metabolismo primario e secondario della pianta attivando specifiche vie metaboliche. Il metabolismo primario è collegato a quei processi molecolari che portano allo sviluppo della pianta attraverso la formazione di metaboliti come proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici strettamente necessari per i processi fisiologici e per la vita della pianta. Il metabolismo secondario è collegato generalmente con risposte della pianta a stress biotici e/o abiotici al fine di favorirne un adattamento.

Studiando il metabolismo primario, in seguito all'applicazione di SU, sono stati evidenziati cambiamenti a livello della glicolisi e del ciclo degli acidi carbossilici imputabili ad un aumento di enzimi quali la glucochinasi, la fosfo-glucosio isomerasi, la fosfo-frutto-chinasi pirofosfato (PPi)

dipendente e la piruvato chinasi (Nardi et al., 2007). A livello della respirazione le SU influenzano la citrato sintasi, la malato deidrogenasi NADP⁺ e l'isocitato deidrogenasi (Nardi et al., 2007) e comportano variazione anche nell'accumulo di zuccheri come il saccarosio, prodotto nel metabolismo fotosintetico (ciclo di Calvin Benson) e primo substrato per le reazioni di respirazione.

Questi effetti sono strettamente collegati alla concentrazione e alle modalità di applicazione delle SU. Infatti, è stato osservato che le SU stimolano l'attività di enzimi quali l'invertasi e la saccarosio sintasi solo se applicate sulla foglia ma non ai tessuti basali (Canellas and Olivares 2014). Altri enzimi attivati dalle SU sono la glutammina sintasi, la glutammato sintasi (Ertani et al., 2011), la malato deidrogenasi, la glutammato deidrogenasi e la fosfoenol-piruvato carbossilasi (Panuccio et al., 2001) coinvolti nell'assorbimento dell'azoto. Studi proteomici hanno mostrato che amminoacidi come glutammato, aspartato, serina, glicina e metionina aumentano di concentrazione in seguito a trattamenti con SU (Schiavon et al., 2010). Questi trattamenti comportano anche l'attivazione della fenilalanina ammonia-liasi (enzima che catalizza la conversione di L-fenilalanina in ammina e acido trans-cinnamico) e della tirosina ammonia-liasi (enzima coinvolto nella naturale biosintesi dei fenoli che trasforma la L-tirosina in acido p-cumarico) (Schiavon et al., 2010).

Il metabolismo secondario viene attivato in risposta a vari tipi di stress. E' stato dimostrato che le SU agiscono in risposta a stress idrici influenzando l'attività delle perossidasi a livello dei tessuti fogliari e radicali, in quanto riducono la concentrazione di perossido di idrogeno, mantenendo inalterata la permeabilità di membrana ed aumentando la concentrazione di prolina (García et al., 2012). Come è stato precedentemente evidenziato alti livelli di questo amminoacido sono ascrivibili a risposte a stress salino (Aydin, 2012). Quindi è possibile affermare che la prolina è un buon marcatore in quanto è il principale amminoacido coinvolto nelle risposte allo stress e le sue variazioni regolano la permeabilità di membrana, stabilizzano le proteine che inibiscono la perossidazione dei lipidi.

Considerando la complessità delle SU la sfida per la ricerca scientifica è cercare di individuare quali sono le molecole uniche specificamente coinvolte nelle diverse risposte sulla

pianta. *Garcia* e collaboratori (2016) hanno dimostrato una stretta correlazione tra struttura chimica delle sostanze umiche ed il loro effetto sulla pianta, sottolineando come ogni gruppo di molecole è coinvolto in una o più specifiche risposte. Anche l'alternanza di siti idrofobici e idrofilici a livello della struttura supramolecolare comporta una modulazione della risposta in pianta. Dato che la conformazione delle SU dipende dalla loro natura chimica non è possibile stabilirne un unico modello strutturale.

Quindi, la caratterizzazione è il punto chiave per comprendere quale può essere la relazione tra struttura e attività di ciascuna tipologia di SU testata. Pertanto l'utilizzo di tecniche di caratterizzazione avanzata, come ^{13}C -CP-MAS-NMR e pirolisi con idrossido di tetrametilammonio seguita da gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (TMAH GC-MS), sono fondamentali.

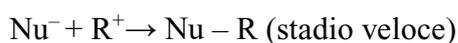
1.3 Caratterizzazione: l'uso di tecniche avanzate per caratterizzare la materia organica

L'importanza di caratterizzare le sostanze umiche nasce dalla necessità di conoscere in dettaglio la loro composizione, perché non esiste un unico modello che le rappresenti. Dato che le sostanze umiche sono formate dall'associazione supramolecolare di diverse classi di composti, molto spesso le informazioni molecolari in merito alla loro composizione diventano complesse e controverse (Grasset and Amblès, 1998). Esistono diverse tecniche che possono essere impiegate per analizzare e caratterizzare le sostanze umiche: la tecnica spettroscopica di risonanza paramagnetica (EPR), la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), la gas-cromatografia, l'analisi termica, la spettroscopia di massa (MS) accoppiata sia all'HPLC (HPLC-MS) sia alla gas cromatografia (GC-MS), la risonanza magnetica nucleare (NMR); ciascuna con i suoi vantaggi e svantaggi.

L'uso combinato di più tecniche analitiche permette di ottenere maggiori informazioni in merito alla composizione chimica delle sostanze umiche e della materia organica.

Data la complessità molecolare delle sostanze umiche, la pirolisi con idrossido di tetrametilammonio (TMAH) seguita da gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (Pyr-TMAH-GC-MS) e la risonanza magnetica nucleare per trasferimento di polarizzazione dal ^1H al ^{13}C con rotazione ad angolo magico (^{13}C -CPMAS-NMR) sono due tecniche applicabili per una caratterizzazione molecolare diretta. La pirolisi è una degradazione termochimica del materiale organico in assenza di ossigeno ad alte temperature che ha però il limite di permettere la pirolizzazione solo di alcune molecole e di indurre cambiamenti strutturali (come deidratazione o ciclizzazione di polisaccaridi e proteine) quando le temperature superano i 500 gradi centigradi (Saiz-Jimenez 1996). Queste limitazioni sono superate dalla termochemolisi cioè dalla preventiva metilazione con idrossido di tetrametilammonio (TMAH; Pyr-TMAH) dei composti da analizzare.

La pirolisi eseguita contemporaneamente alla reazione con tetrametilammonio favorisce la volatilizzazione e la cromatografia di composti polari, abbondanti nelle sostanze umiche, offrendo dei risultati migliori rispetto alla pirolisi tradizionale. Quindi, il TMAH ha il doppio vantaggio di stabilizzare i gruppi acidi, alcolici e fenolici e di permettere successivamente una buona rivelazione cromatografica. La metilazione con TMAH è una reazione di sostituzione nucleofila a due stadi: rottura del legame preesistente e formazione di un nuovo legame. La reazione può essere schematizzata nel seguente modo:

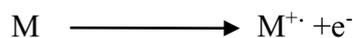


R = molecola di interesse; X = gruppo uscente; Nu = nucleofilo

Nel primo stadio avviene la rottura del legame con formazione di un carbocatione ad alta energia che a questo punto reagisce con un nucleofilo per formare un nuovo legame (secondo stadio). Quando il nucleofilo è lo stesso solvente la reazione di sostituzione è detta “*solvolisi*”

La termochemolisi delle SU in presenza di TMAH genera un elevato numero di molecole, come metil-esteri e metil-eteri di composti naturali, che sono successivamente separate mediante tecnica gas-cromatografica (GC) e identificate mediante spettroscopia di massa (MS). Tuttavia, la reazione di metilazione mediante TMAH è anche una reazione di transesterificazione. Per questo non è possibile distinguere tra gruppi impegnati in legami esterei e gruppi liberi preesistenti.

La GC/MS è una tecnica di indagine analitica che combina le caratteristiche della cromatografia in fase gassosa con la spettrometria di massa per la determinazione qualitativa e quantitativa di una ampia gamma di sostanze presenti in matrici complesse, prevalentemente organiche, a bassa polarità e basso peso molecolare, accomunate da una temperatura di ebollizione sempre inferiore a 300 °C. Schematicamente uno spettrometro di massa è composto da una sorgente, da un analizzatore e da un rivelatore. La sorgente è la parte dello spettrometro di massa che ha il compito di trasformare le molecole del campione in ioni (ionizzazione). In questo studio lo spettrometro di massa è equipaggiato con una sorgente ad impatto elettronico (EI). Nella camera di ionizzazione, mantenuta sotto vuoto, le molecole in fase gassosa provenienti dal GC, bombardate con elettroni ad alta energia, si ionizzano generando un radical catione detto “*ione molecolare*”:



Questa specie ionica metastabile di massa m e carica z può a sua volta frammentarsi in ioni a massa minore originando lo spettro di massa. A questo punto il flusso di ioni prodotto entra nell'analizzatore, un singolo quadrupolo, che separa gli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). Il quadrupolo consiste di quattro barre metalliche disposte parallelamente. La separazione degli ioni avviene mediante la combinazione di un campo elettrico variabile ed uno

costante applicato alle barre. Gli ioni percorrono lo spazio all'interno delle quattro barre, e solo quelli con il rapporto m/z desiderato riescono ad attraversare il campo quadrupolare ed essere rivelati. Il rivelatore trasforma il fascio di ioni proveniente dall'analizzatore in un segnale elettrico che viene amplificato e registrato. I segnali ottenuti vengono trasmessi al computer equipaggiato con un opportuno software in grado di rappresentare l'abbondanza di ogni ione in funzione della sua massa, cioè lo spettro di massa finale. Il software permette anche la ricerca bibliografica in librerie di spettri di massa facilitando l'identificazione dei composti.

La reazione di termochemolisi e l'analisi GC-MS permettono di studiare biopolimeri naturali (come cere e cutine delle piante), legni, materiali umici, acidi grassi (di origine microbica o vegetale), alcani, steroli, carboidrati e composti ligninici. È anche possibile studiare lo stato di maturazione del compost (Spaccini and Piccolo, 2007), l'origine della sostanza organica (microbica o vegetale) attraverso l'analisi di acidi grassi metilati a lunga catena (FAMES) (Peacock et al., 2001), il grado di degradazione delle sostanze umiche e le classi di batteri maggiormente presenti nel campione (Gram⁺ e/o Gram⁻) (Pörschmann et al., 2001).

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica spettroscopica non distruttiva che fornisce informazioni in merito alla distribuzione di nuclei di carbonio organico in un vasta gamma di matrici solide, liquide e semisolidi e permette di analizzare le correlazioni inter/intra molecolari del campione analizzato (Mazzei and Piccolo, 2015). La tecnica NMR può essere monodimensionale (1D), bidimensionale (2D) o multidimensionale e può sfruttare il potere di diversi nuclei di risonanza (H, C, N, P etc) al fine di caratterizzare la composizione di tessuti vegetali e animali, della lettiera, della materia organica del suolo e delle sostanze umiche (Spaccini and Piccolo, 2007).

La spettroscopia NMR 1D (¹H-NMR) è una tecnica ad alta sensibilità utile per conoscere la struttura chimica delle SU, ma non permette la rilevazione dei composti aromatici (Piccolo et al. 1990; Mazzei and Piccolo 2015). La spettroscopia 2D allo stato liquido è una tecnica che permette di ottenere il massimo delle informazioni sulla composizione molecolare e sui gruppi funzionali

delle SU ed anche sulla correlazione intra/inter molecolare delle componenti umiche (Savy et al., 2016).

Infine, la spettroscopia CPMAS-NMR è una tecnica non distruttiva applicabile a solidi cristallini o amorfi. Malgrado non sia una tecnica ad alta risoluzione permette di approfondire la distribuzione molecolare nel campione riducendo le interazioni che impediscono l'acquisizione degli spettri (come le forti interazioni dipolari tra omologhi, l'anisotropico spostamento chimico, l'interazione quadrupolare e la maggiore suscettibilità magnetica) (Duer, 2002). Infatti le forti interazioni eteronucleari della spettroscopia MAS allo stato solido sono utilizzate per produrre un trasferimento di magnetizzazione (polarizzazione incrociata) che migliora il segnale. Questi effetti permettono l'uso dei nuclei più abbondanti come l'idrogeno (^1H) per trasferire energia a nuclei meno abbondanti e con basso rapporto giromagnetico γ (come il ^{13}C , ^{15}N o il ^{29}S) (Savy et al., 2016). Oltre ad avere molti settori di applicazione (settore ambientale, diagnostico, forense), questa tecnica è ritenuta molto utile per lo studio del materiale organico (Mazzei and Piccolo, 2015).

Nel presente lavoro la pirolisi con idrossido di tetrametilammonio seguita da gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa e la spettroscopia ^{13}C -CPMAS-NMR sono state scelte come tecniche avanzate non solo per la caratterizzazione dei composti, delle sostanze umiche, ma anche per caratterizzare chimicamente estratti in etanolo da compost il cui protocollo di estrazione è stato ottimizzato durante la seconda parte del lavoro di tesi.

1.4 L'uso di solventi organici per l'estrazione di composti bioattivi

Nel corso degli anni gli scarti di biomasse vegetali sono state considerati sempre più importanti e di grande interesse per la comunità scientifica, non solo per la produzione di compost e biostimolanti a basso impatto ecologico, ma anche come fonte di composti naturali bioattivi da

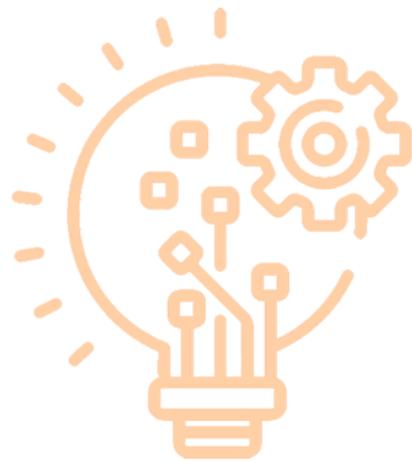
impiegare nel settore nutraceutico, farmacologico e cosmetico. Le proprietà terapeutiche delle piante sono un riflesso della loro ricchezza fitochimica e la tipologia di sostanze fitochimiche presenti in esse ne influenza l'attività antiossidante. Tra i composti fitochimici rientrano i flavonoidi, gli acidi fenolici e gli alcaloidi che giocano un ruolo importante nei diversi processi antiossidanti all'interno delle cellule vegetali (Jimoh et al., 2019). Nel settore medico questi composti sono di interesse per la loro attività antiossidante ed antimicrobica (Andrade et al, 2009) e pertanto sono utilizzati come formulati naturali in alternativa a farmaci prodotti da sintesi chimica (Wendakoon and Gagnon, 2012) per la cura di un numero sempre più crescente di patologie.

La maggior parte dei composti fenolici di origine vegetale è contenuta all'interno di bucce, foglie, gambi o fiori che comunemente vengono scartati o rimossi dall'industria agroalimentare. Per poter utilizzare e rivalorizzare al meglio questi scarti, numerosi gruppi di ricerca lavorano all'ottimizzazione di protocolli di estrazione di svariate specie vegetali attraverso l'uso di diverse tipologie di solventi. Soluzioni a diverse concentrazioni di etanolo, metanolo e acetone sono tra i solventi maggiormente utilizzati soprattutto per l'estrazione di composti fenolici ad elevato potere antiossidante (Jimoh et al., 2019; Maietta et al., 2017; Muhlack et al., 2018; Page et al., 2017; Safdar et al., 2017). È stato inoltre osservato che variando la concentrazione dei solventi, i tempi, le temperature di estrazione si ottengono diverse valori non solo in termini di resa, ma anche di attività antiossidante legata alla quantità ed alla tipologia dei composti fenolici estratti nelle differenti condizioni (Spigno et al., 2007).

Malgrado siano stati prodotti numerosi lavori sull'utilizzo di biomasse di scarto per l'estrazione di composti bioattivi, non vi sono studi che ne prevedano l'estrazione da materiale altamente umificato quale il compost. Pertanto l'obiettivo del presente lavoro di ricerca è stato estrarre composti con potenziale antiossidante e biostimolante da compost prodotti da scarti della lavorazione del caffè, carciofo e limoni.

CAPITOLO 2

SCOPO DEL LAVORO



2.1 Scopo del lavoro

La ricerca scientifica sta investendo sempre più verso un uso efficiente delle risorse, con particolare attenzione alla rivalorizzazione di rifiuti urbani e industriali, in linea con il concetto di economia circolare che negli ultimi anni sta suscitando una crescente attenzione (Ghisellini et al., 2016). Questa tipologia di sviluppo sostenibile prevede la pianificazione di un sistema economico volto al riutilizzo di materiali nei diversi cicli produttivi, riducendo al massimo gli sprechi e favorendo una bilanciata coesistenza di aspetti economici, tecnologici e ambientali all'interno dei diversi processi industriali (FAO 2002).

Al fine di rispondere al desiderio di crescita sostenibile, il presente lavoro di dottorato ha avuto come obiettivo la rivalorizzazione di scarti agricoli partendo dal recupero di biomasse di caffè, carciofo, peperone e pastazzo di limoni, al fine di produrre compost. Questo è stato poi utilizzato sia per l'estrazione di sostanze umiche seguendo la procedura standard riportata da *Stevenson* (1994), sia per l'ottimizzazione di un nuovo protocollo di estrazione che ha previsto l'uso di una soluzione idroetanolica al 70%. Sono state pertanto perseguite due linee di ricerca al fine non solo di valutare le differenze in termini di composizione chimica dei diversi estratti ma anche di verificare l'effetto sulla crescita ed il metabolismo di piante di lattuga, sia mediante applicazione al suolo (nel caso delle sostanze umiche) sia mediante applicazione fogliare (per gli estratti in etanolo).

Le SU sono state caratterizzate chimicamente mediante tecniche di spettroscopia DRIFT-IR, ¹³C-CP-MAS-NMR e pirolisi THAM-GC/MS. Inoltre, sono state saggiate le attività antiossidanti degli estratti mediante saggio ABTS e valutato il contenuto di fenoli con il test Folin-Ciocalteu.

Le SU che hanno mostrato maggiori valori di attività antiossidante sono state oggetto di valutazione circa i potenziali effetti biostimolanti mediante test di germinazione con semi di *Zea mays* (LG 80130) e misurazione dell'allungamento del coleotile e della radice primaria delle plantule di mais. In considerazione dei precedenti risultati positivi ottenuti testando sostanze umiche

da carciofo su piante di mais (Monda et al., 2018; Spaccini et al., 2019), si è scelto di testarli da soli ed in combinazione con umati di potassio (derivati da residui di lignite) anche su piante di lattuga. Al termine dell'esperimento sono stati analizzati i parametri fenologici (biomassa, contenuto di clorofilla) e possibili variazioni a livello del profilo metabolico secondario (mediante spettrometria di massa IT-TOF).

La seconda parte del lavoro ha previsto lo studio di estratti in etanolo da compost, vista la mancanza di riferimenti bibliografici in merito a questa tipologia di estrazione da compost, sottoponendo gli estratti non solo alla caratterizzazione chimica ma anche alla valutazione della loro attività antiossidante e biostimolante.

Pertanto, tutti gli estratti sono stati caratterizzati chimicamente mediante spettroscopia NMR in fase solida con la tecnica del CP-MAS (*Cross Polarization Magic Angle Spinning*) e pirolisi TMAH-GC/MS. L'attività antiossidante ed il contenuto di fenoli totali sono stati valutati, rispettivamente, mediante saggio ABTS e Folin-Ciocalteu.

La fitotossicità degli estratti è stata misurata attraverso test di germinazione con semi di *Lepidium sativum* (APAT 2004) ed i campioni che hanno mostrato differenze significative, in termini di maggiore allungamento della plantula (estratti da carciofo e pastazzo di limoni) sono stati poi testati con applicazione fogliare, su piante di lattuga.

Poiché è noto che le SU hanno un effetto sul metabolismo primario vegetale, in questo lavoro è stata utilizzata la spettroscopia NMR per analizzare il profilo metabolico primario delle piante di lattuga trattate con gli estratti.

Tutti i materiali testati, oltre a rivestire un ruolo molto importante nel recupero e corretto smaltimento degli scarti di lavorazione agricola, possono rappresentare un'importante risorsa per la produzione di sostanze ad alto valore aggiunto ad azione biostimolante.

Inoltre, i risultati positivi ottenuti dai test antiossidanti aprono novi strade per la ricerca al fine di inserire queste sostanze di riciclo non solo in campo agricolo ma anche nel settore del

packaging; con il possibile impiego nella creazione di biofilm utilizzabili al fine di aumentare i tempi di conservazione degli alimenti riducendo i processi di ossidazione e degradazione.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI



3.1 Compost e sostanze umiche

I compost (CO) vegetali utilizzati in questo lavoro sono stati prodotti presso l'azienda sperimentale dell'Università di Napoli Federico II di Castel Volturno (CE). Le matrici utilizzate per la preparazione dei cumuli sono stati gli scarti della lavorazione di carciofo, la posa di caffè, peperoni e limoni. Il compostaggio è stato condotto in condizioni aerobiche mediante il sistema dei cumuli statici con insufflazione continua di aria. Nel corso della fase termofila in cui la temperatura dei cumuli ha raggiunto i 60 - 70 °C, c'è stato un monitoraggio giornaliero dei parametri di umidità e temperatura. I compost sono stati definiti maturi e stabili dopo 45 giorni dalla creazione dei cumuli.

La preparazione dei cumuli è stata condotta come segue. Per il compost da carciofo, i cumuli sono stati formati utilizzando il 78% di scarti della lavorazione di carciofo (gambi, foglie e parti esterne delle infiorescenze), 20% di sfalci verdi e legnetti e 2% di compost da letame utilizzato per avviare la reazione. Il compost da caffè ha richiesto il 30% di posa di caffè, 65% sfalci verdi e 2% letame. Per il compost da pastazzo di limoni sono stati utilizzati limoni privati della buccia (albedo e succo), 36% sfalci verdi, 6% segatura di legno e 0.6% calce viva (impiegata per abbassare il pH).

Infine il compost da peperoni è stato ottenuto utilizzando 30% di scarti di peperoni, 68% sfalci di erba e 2% di compost da letame. Al termine del processo di compostaggio, il compost è stato lasciato maturare all'aperto per altri 30 giorni, quindi, una frazione di esso è stata seccata all'aria, polverizzata mediante l'uso di un mortaio e setacciata con maglie di 2 mm al fine di rendere omogeneo il campione.

Ciascun compost è stato poi caratterizzato chimicamente e successivamente utilizzato per l'estrazione di sostanze umiche ed estratti in etanolo secondo i protocolli riportati di seguito.

3.2 Estrazione sostanze umiche

Le sostanze umiche (SU) estratte da ciascun cumulo di compost sono state ottenute mediante il seguente protocollo: 200 g di compost secco è stato sospeso in 1 L di una soluzione 1 M di NaOH in barattoli di polipropilene posti su un agitatore rotante per una notte. Rimosso il surnatante per centrifugazione, al residuo è stata aggiunto 1 L di acqua deionizzata e posto nuovamente in agitazione per 2 ore. Al termine, il surnatante ottenuto dai due processi di estrazione, contenente le sostanze umiche è stato separato dal residuo mediante centrifugazione per 20 minuti a 7000 rpm, filtrato utilizzando filtri Wathman 41. La soluzione è stata poi portata ad un pH neutro mediante l'uso di HCl 0.5M e dializzata fino ad ottenere una conducibilità elettrica pari al valore dell'acqua deionizzata. Al termine del processo di dializzazione tutti i campioni sono stati congelati e liofilizzati.

3.3 Estrazione idroetanolica

Un aliquota di compost da pastazzo di limoni, carciofo e caffè, dopo essiccazione all'aria, è stata sospesa in una soluzione idroetanolica (EtOH:H₂O, 70:30, v:v). Per ogni mg di campione sono stati utilizzati 5 ml di soluzione. La miscela è stata posta in agitazione per un'intera notte a 25 °C in palloni di vetro oscurati. Il surnatante è stato poi rimosso per centrifugazione ed il residuo risolto nuovamente in soluzione con EtOH 70% e posto a ricadere a 70 °C per 24, 72 e 72 ore rispettivamente per pastazzo di limoni, carciofo e caffè. Il surnatante è stato poi recuperato, aggiunto con ugual volume d'acqua e posto a rotoevaporare fino a completa evaporazione dell'etanolo. La soluzione acquosa risultante è stata poi congelata e liofilizzata.

3.4 Analisi elementare

L'analisi elementare dei campioni studiati in questa tesi è stata condotta con un analizzatore Interscience EA1108 CHNS della Fisons Instruments. Pochi milligrammi di ogni campione secco, pesati in una piccola capsula di stagno, sono stati totalmente mineralizzati a 1020 °C sotto flusso di ossigeno. La CO₂, l'H₂O e l'N₂ sviluppati sono stati separati per gascromatografia e rilevati con un rilevatore a conduttività termica. La determinazione quantitativa di C, H e N è stata effettuata mediante integrazione dei picchi dei gas sviluppati dalla degradazione delle sostanze organiche usando il software fornito dalla casa costruttrice ed in relazione a curve di calibrazione precedentemente approntate utilizzando come standard l'acetanilide.

3.5 Spettroscopia DRIFT

Gli spettri infrarossi in riflettanza diffusa a trasformata di Fourier (DRIFT) dei campioni di sostanze umiche sono stati acquisiti utilizzando lo spettrometro FT-IR PerkinElmer 1720-X FT-IR (Waltham, MA, USA), equipaggiato con un accessorio PerkinElmer per la riflettanza diffusa. Sono state accumulate 8 scansioni con valori di risoluzione pari a 4 cm⁻¹. Prima delle analisi, i campioni sono stati accuratamente omogeneizzati e poi finemente macinati e mescolati con bromuro di potassio (KBr) in polvere in un mortaio d'agata, in proporzione di 1:40 in peso.

3.6 Spettroscopia ¹³C-CPMAS-NMR

L'acquisizione degli spettri di risonanza magnetica nucleare dei campioni di compost, sostanze umiche ed estratti idroetanolici presi in esame è stata effettuata con la tecnica ¹³C-

CPMAS-NMR (^{13}C – Cross Polarization Magic Angle Spinning – Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy), utilizzando un magnete Bruker AVANCE 300 widebore, dotato di una sonda MAS.

I parametri utilizzati per l'acquisizione degli spettri sono stati: 4000 scansioni, velocità di rotazione del rotore 13000 Hz, tempo di riciclo 1 secondo, tempo di contatto 1 ms e tempo di acquisizione 20 ms. I campioni sono stati compattati in rotori in zirconio da 4 mm con coperchio in Kel-F. La correzione di qualsiasi disomogeneità della condizione di Hartmann–Hahn è stata corretta applicando una sequenza di rampa ^1H . Gli spettri ^{13}C -CPMAS-NMR sono stati interpretati dividendo lo spettro in sei regioni in base allo spostamento chimico, in particolare da 0 a 45 ppm appartenete alla regione dei carboni alchilici (alkyl-C), da 45 a 60 ppm la regione dei carboni metossilici (methoxyl-C), da 60 a 110 la regione dei carboni idrossi alchilici (O-alkyl-C), da 110 a 145 quella dei carboni aromatici (aromatic-C), da 145 a 160 quella dei carboni fenolici (phenol-C) ed infine da 160 a 190 la regione dei carboni carbossilici (carboxyl-C) (Tadini et al., 2015; Vinci et al., 2019). I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software Mestre-C (4.9.9.9, MestreLab Research, A Coruña, Santiago de Compostela, Spain). I parametri adottati per trasformare il decadimento libero dell'induzione (FID) sono stati: 4K di zero filling ed una funzione di filtro esponenziale con un ampliamento della linea di trasformata di 200 Hz. Le percentuali di area di ciascuna regione sono state calcolate sulla base dell'area totale dello spettro ed i valori ottenuti sono stati poi utilizzati per calcolare i rapporti idrofobici (HB/HI), alchilici/idrossialchilici (A/AO), ligninico (LR) (Spaccini et al., 2000; Almendros et al., 2000) ed il valore di aromaticità (ARM).

3.7 Pirolisi TMAH – GC/MS

Le pirolisi dei compost, delle sostanze umiche e degli estratti idroetanolici sono state eseguite utilizzando una quantità pari a 200, 200 e 500 mg, rispettivamente. I campioni posti in navicelle di quarzo, sono stati metilati mediante l'aggiunta di 500 mL di una soluzione al 25% di

idrossido di tetrametilammonio in metanolo (TMAH) (w:v, 1:1). Dopo un'imbibizione di 2 ore i campioni sono stati introdotti in un tubo di reazione in pyrex (50cm×3.5cm i.d.) e riscaldati (rampa 20 °C min⁻¹) fino a 400 °C (10 min di temperatura costante) per un tempo di reazione totale pari a circa 40 min (forno Barnstead Thermolyne 21100). I prodotti rilasciati dalla termochemolisi sono stati trasferiti mediante un flusso continuo di elio (30 mL min⁻¹) in due beute in serie contenenti cloroformio (50 mL) poste in vasche con ghiaccio. Al termine della reazione il contenuto delle due beute è stato unito in un pallone di raccolta e concentrato mediante rotovaporazione. Il residuo è stato poi disciolto in 1 ml di cloroformio e successivamente un volume pari a 0.2 mL trasferito in una vial di vetro da 0.2 ml per l'analisi GC/MS.

3.8 Analisi GC/MS

L'analisi mediante gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC/MS) dei prodotti di pirolisi è stata condotta con un gas-cromatografo Perkin-Elmer Autosystem XL equipaggiato con un colonna capillare RTX-5MS WCOT (Restek, 30m×0.25mm i.d.; film thickness = 0.25µm) e accoppiato attraverso una linea riscaldata (250 °C) con uno spettrometro di massa a quadrupolo PE Turbomass-Gold. Il tempo di corsa totale per la separazione cromatografica è stato di circa 60 minuti. Le temperature utilizzate sono state: 60 °C (1 minuto di temperatura costante), un innalzamento da 7 °C min⁻¹ a 100 °C min⁻¹ e poi da 4 °C min⁻¹ a 320 °C (5 minuti di temperatura costante). L'elio è stato utilizzato per trasportare i gas alla velocità di 1.90 mL min⁻¹, la temperatura di iniezione utilizzata è stata di 250 °C, e la modalità di iniezione suddivisa (*split*) aveva un flusso minimo di 30 mL min⁻¹. Gli spettri di massa sono stati ottenuti in modalità EI (70 eV), l'intervallo di scansione è stato di m/z 45–650, con un tempo di ciclo di 0.2 secondi. L'identificazione dei composti è stata basata sui confronti degli spettri di massa contenuti nella libreria della banca dati NIST e con i dati riportati in letteratura. Per l'analisi semiquantitativa è

stata calcolata la percentuale di ciascun composto in relazione all'area totale dei composti identificati.

3.9 Saggio ABTS

L'attività antiossidante delle sostanze umiche e degli estratti idroetanolicci è stata valutata mediante il saggio con l'acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6- sulfonico (ABTS). La misura è stata eseguita utilizzando il saggio di decolorazione del radicale libero ABTS^{•+} in accordo con la metodica standard (Re et al., 1999; Serpen et al., 2012), con alcune modifiche. Il radicale monocationico ABTS^{•+} è stato generato facendo reagire una soluzione ABTS (7 mM) con 2.45 mM di perossido solfato di potassio (K₂S₂O₈). La miscela è stata lasciata riposare al buio per 16 ore a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi diluita con metanolo fino a leggere l'assorbanza di 0.7 ± 0.2 unità a 734 nm.

Per misurare l'attività antiossidante degli estratti, 100 µl di ciascun campione alle varie concentrazioni è stato aggiunto a 1900 µL di soluzione diluita di ABTS^{•+}, i campioni sono stati lasciati a reagire per 2 minuti al buio, al termine dei quali l'assorbanza è stata misurata spettrofotometricamente a 734 nm.

È stata calcolata la riduzione percentuale dell'assorbanza (decolorazione della soluzione) a 734 nm per ogni concentrazione di estratto e la capacità antiossidante è stata espressa come percentuale di inibizione (I %) calcolata secondo la relazione:

$$I (\%) = (Abs X - Abs 0) / Abs 0$$

Abs X e Abs 0 rappresentano, rispettivamente, l'assorbanza a 734 nm dei campioni da misurare e del controllo. È stata valutata anche la capacità antiossidante equivalente Trolox (TEAC) confrontando la variazione di assorbanza a 734 nm degli estratti con quella contenente Trolox

(acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) come standard. Le soluzioni standard sono state preparate in metanolo in un intervallo di concentrazioni da 0 a 600 µg ml⁻¹.

La I % di Trolox è stata calcolata come:

$$I \% = [(Abs\ bianco - Abs\ Trolox) / Abs\ bianco] \times 100.$$

Mentre il valore di TEAC, espressi come millimoli equivalenti di Trolox per kg di campione è stato calcolato come segue:

$$TEAC\ (mmol\ eq.\ Trolox / kg\ campione) = [I\ \% \ campione / (a \times m)] \times 10$$

Dove *a* è la pendenza della retta di calibrazione del Trolox, *m* sono i mg di campione utilizzati nella reazione, 10 è il fattore di conversione per ottenere il valore di TEAC come mmol eq. Trolox / kg di campione. Tutte le analisi sono state condotte in triplicato.

3.10 Determinazione del contenuto di fenoli totali

Il contenuto di fenoli totali (TPC) è stato calcolato mediante il test del Folin-Ciocalteu (Dewanto et al., 2002). Il reagente Folin-Ciocalteu è una miscela in soluzione acquosa di acido fosfomolibdico e acido fosfotungstico che complessati con fenoli costituiscono un cromoforo blu.

Il saggio si basa sulla riduzione del reagente Folin-Ciocalteu e la formazione di un complesso cromoforo blu. Il massimo assorbimento dipende dalla concentrazione di composti fenolici misurata spettrofotometricamente a 760 nm. E' stata formata una miscela di reazione contenente 830 µl di acqua milliQ, 50 µL di reagente di Folin-Ciocalteu e 20 µL di campione.

La miscela è stata lasciata a reagire per 3 minuti a temperatura ambiente, al termine dei quali la reazione è stata interrotta aggiungendo 100 µL di una soluzione al 6% di NaOH. Dopo un'ulteriore incubazione di 1 ora è stata letta l'assorbanza a 760 nm. La retta di calibrazione per il calcolo dei fenoli totali è stata ottenuta utilizzando come standard l'acido gallico ed i valori di TPC

sono stati espressi come mg equivalenti di acido gallico su grammo di campione. Tutte le analisi sono state condotte in triplicato.

3.11 Test di germinazione con semi di *Zea mays*

Il saggio per valutare la bioattività delle sole sostanze umiche estratte da compost da carciofo (SU-CAR) e da pastazzo di limoni (SU-PAS) è stato condotto utilizzando semi di mais (*Zea mays*, LG 30.215 Limagrain). Prima dell'inizio del saggio i semi sono stati tenuti a bagno in acqua per una notte al buio. Il saggio, della durata di 7 giorni, è stato condotto in camera di crescita alla seguenti condizioni di crescita: temperatura di 25 °C, umidità 75% e zero illuminazione.

Sono state saggiate 5 concentrazioni (10, 25, 50, 100, 200 ppm), ciascuna delle quali valutata utilizzando 5 repliche. Il controllo ha previsto la crescita dei semi con acqua deionizzata. Il fondo delle capsule Petri (90 Ø) all'interno delle quali sono stati posti i semi (15 semi/capsula) è stato rivestito con carta filtro e aggiunto con 2 ml di acqua deionizzata. Dopo aver posizionato i semi, sono stati aggiunti per ciascuna piastra 15 mL di soluzione contenente le SU. Al termine del test, la percentuale di germinazione è stata calcolata contando il numero di semi germinati in rapporto al totale. Successivamente le piantine sono state scannerizzate mediante uno scanner con piano modificato Perfection V700 (Epson, Suwa, Japan) ed è stata misurata la lunghezza del coleotile e della radice primaria attraverso l'uso del software WinRhizo versione 2012b (Regent Instruments, Inc., Ch Ste-Foy, Québec, QC, Canada).

3.12 Saggio di germinazione con semi di *Lepidium sativum*

I test di germinazione e della valutazione dell'accrescimento radicale sono stati condotti con semi di *Lepidium sativum*, al fine di valutare la fitotossicità degli estratti idroetanolici. Il protocollo utilizzato è in accordo con le metodiche APAT, 2004 (Jacomini et al., 2004). Il saggio è stato eseguito utilizzando il campione testato a concentrazione predefinita. Da ciascuna soluzione sono stati prelevati 5 ml e posti in capsule Petri (90 Ø) contenenti dischi di carta filtro. Per ciascun test sono state utilizzate 4 repliche con 10 semi ciascuna disposti casualmente all'interno della capsula (figura 2). Infine le capsule sono state incubate in termostato a 25 ± 2 °C per 72 ore. Al termine dell'incubazione sono stati contati i semi germinati ed è stata misurata la lunghezza radicale. Per ciascun trattamento sono stati calcolati gli indici di germinazione relativa (GR), lunghezza radicale relativa (LR) e germinazione (IG), mediante le seguenti formule; $GR=100 \times (Gs/Gc)$, $LR= 100 \times (Ls/Lc)$, $IG= 100 \times (Gs/Gc) \times (Ls/Lc)$. Le sigle Gs e Gc indicano i numeri di semi germinati del campione e del controllo mentre Ls e Lc sono le lunghezze radicali del campione e del controllo.

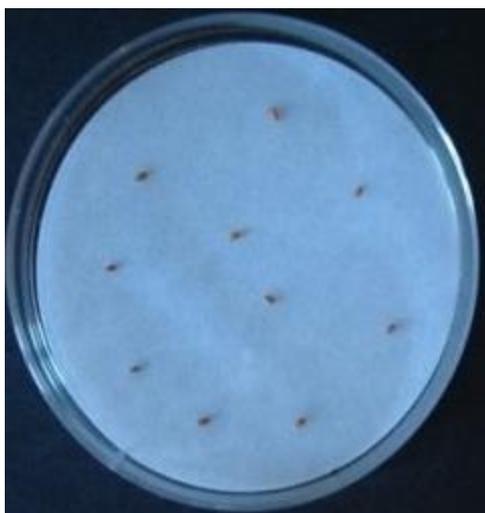


Figura 2: Allestimento saggio con *Lepidium sativum*

3.13 Esperimento in vaso su lattuga con sostanze umiche da compost verde e umati di potassio

L'esperimento è stato condotto con piante di lattuga al fine di valutare gli effetti delle sostanze umiche da compost da carciofo (SU-CAR) applicate sia da sole sia in miscela con diverse percentuali di umati di potassio (UK). I vasi sono stati preparati utilizzando 2.5 kg di una miscela di suolo (Vertic Xerofluvent, franco limo argilloso, 18.3% sabbia, 31.3% limo, 50.4% argilla) e sabbia in rapporto 2:1. Per ciascun trattamento sono state previste 5 repliche. Le piante di lattuga sono state cresciute in serra per 45 giorni mantenendo il suolo ad una capacità di trattenimento dell'acqua tra il 50 e il 70 %. Sono state applicate al suolo soluzioni sia di solo SU-CAR ed UK, sia di tre loro miscele: 1) 75% SU-CAR e 25% UK, 2) 50% SU-CAR e 50% UK, 3) con 25% SU-CAR e 75% UK. Ciascun materiale umico è stato disciolto in acqua deionizzata per 3 concentrazioni (10-50-100 ppm). Le piante utilizzate come controllo (CT) sono state trattate con acqua. Non sono state indotte condizioni di stress, pertanto tutte le piante sono state periodicamente irrigate e per l'illuminazione è stato mantenuto il fotoperiodo naturale (essendo le piante cresciute in serra). L'applicazione delle sostanze è stata effettuata ogni 15 giorni, aggiungendo al suolo di ciascuna pianta 200 mL di soluzione. Al termine dell'esperimento le piante sono state campionate ed è stata pesata la parte di biomassa aerea totale, dalla quale sono stati prelevati campioni di foglia (prontamente congelati in azoto liquido) per l'estrazione della clorofilla e dei metaboliti. La restante parte è stata seccata in stufa (70 °C) per poi effettuare la stima del peso secco.

3.14 Esperimento in vaso su Lattuga con estratti idroetanolic

Per gli esperimenti con i soli estratti idroetanolic da compost da carciofo e da pastazzo di limoni sono state utilizzate giovani piante di lattuga. Gli esperimenti sono stati condotti in serra,

rispettando il fotoperiodo naturale, utilizzando vasi da 3.5 kg i quali sono stati riempiti con solo suolo (Vertic Xerofluvent, franco limo argilloso, 18.3% sabbia, 31.3% limo, 50.4% argilla). Il test è stato condotto testando 5 diverse concentrazioni (10, 25, 50, 100, 200 ppm) degli estratti idroetanolici, più il controllo. Sono state effettuate 5 repliche per un totale di 30 piante ad esperimento. A ciascuna pianta è stata aggiunta una soluzione di nutrienti di base composta da K (come K₂O) 20%, N 20 % e P 20%. I trattamenti hanno previsto l'applicazione fogliare delle soluzioni di estratti effettuata ogni 15 giorni a partire da una settimana dopo il trasferimento in vaso delle piante per un totale di 4 trattamenti. Per ciascun trattamento è stato utilizzato un volume di estratto necessario a bagnare l'intera pianta. Dopo 7 giorni dall'ultimo trattamento le piante sono state campionate, ed è stata pesata la biomassa aerea, dalla quale sono stati prelevati campioni (prontamente congelati in azoto liquido) per la valutazione del contenuto di clorofilla e di metaboliti. Il peso secco è stato calcolato facendo seccare le piante in stufa a 70 °C per 3 giorni.

3.15 Determinazione del contenuto di clorofilla

Da ciascuna pianta di lattuga sottoposta ad esperimento sono stati prelevati 2 dischi di foglia del diametro di 20 mm, prontamente poi congelati in azoto liquido. L'estrazione della clorofilla è stata effettuata utilizzando un mortaio con pestello in ceramica, i campioni sono stati omogenizzati in 10 ml di acetone (99.9%), trasferiti in tubi da centrifuga di vetro e centrifugati a 3000 rpm per 6 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato recuperato ed è stata misurata l'assorbanza spettrofotometrica a 661.1 e 644.8 nm. Il contenuto di clorofilla A (Chl a), clorofilla B (Chl b) e clorofilla totale (Chl tot) sono state calcolate in accordo con la metodologia riportata da *Lichtenthaler* (1987) ed è stato espresso come mg di pigmento per mg di foglia fresca.

3.16 Analisi dei dati

I risultati ottenuti dagli esperimenti in pianta e dai test di germinazione sono stati analizzati mediante analisi statistica ANOVA ad una via seguita dal test LSD (significativo per valori di $p < 0.05$).

3.17 Estrazione di metaboliti primari ed analisi mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

L'estrazione dei metaboliti primari è stata effettuata solo su piante di lattuga trattate con gli estratti idroetanolici. I campioni di foglia conservati a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in seguito al campionamento, sono stati omogeneizzati con mortaio e pestello in ceramica utilizzando azoto liquido e successivamente liofilizzati. Circa 40 ± 5 mg di campione sono stati pesati in tubi Eppendorf da 2 ml pre-raffreddati ai quali è stato aggiunto 1 ml della miscela acqua / metanolo / cloroformio (in rapporto 1:3:1).

I campioni sono stati miscelati per 20 secondi e centrifugati a 1200 rpm per 10 minuti a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Al fine di inibire l'attività di enzimi presenti nel campione questi sono stati incubati in agitazione a 1000 rpm per 18 minuti a $70\text{ }^\circ\text{C}$, al termine dei quali sono stati lasciati a riposare per 1 minuto. I campioni sono stati poi incubati nuovamente a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ per 5 minuti, agitati e centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Sono stati prelevati 0.5 ml di surnatante, trasferiti in tubi Eppendorf da 2 ml ai quali sono stati aggiunti 0.2 ml di acqua milliQ al fine di permettere la separazione della fase polare e apolare corrispondente, rispettivamente, a metanolo-acqua (parte superiore) e cloroformio (parte inferiore). I campioni sono stati poi centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti a $4\text{ }^\circ\text{C}$ al termine dei quali sono stati prelevati 0.8 ml di fase polare e trasferiti in tubi da 2 ml in vetro per poi essere portata a secco sotto flusso di azoto. I campioni sono stati poi risospesi in 0.75 ml di una soluzione di tampone fosfato deuterato (90 mM, pH 6.0) contenente 0.02 mg ml^{-1} di acido 3-(tri-metilsilil) propionico-2,2,3,3-d₄ (TMSPA, EurisoTop, France) utilizzato come standard

interno, e trasferiti in tubi di vetro (di diametro 5 mm) per NMR. La completa dissoluzione di ciascun estratto è avvenuta in seguito a sonicazione per 5 minuti (40 kHz) prima dell'analisi NMR. L'analisi NMR è stata condotta utilizzando 8 repliche di ciascun trattamento.

3.18 Spettroscopia NMR

L'analisi NMR è stata condotta utilizzando uno spettrometro a 400 MHz Bruker Avance munito di una sonda BBI Bruker a 5 mm e lavorando ad una frequenza di 400.13 MHz per ^1H .

Gli spettri monodimensionali ^1H (1D) sono stati acquisiti regolando a 5 secondi di ritardo di equilibrio termico, una lunghezza di impulso di 90° entro 8 e 8.85 μs (-2 dB di attenuazione), 128 transienti, 67584 punti nel dominio del tempo e 16 ppm (6410.3 Hz). Il segnale dell'acqua residua è stato soppresso applicando la pre-saturazione in risonanza durante il ritardo di equilibrio termico.

I segnali NMR che hanno mostrato differenze significative tra i vari trattamenti (test ANOVA $p < 0.05$) sono stati assegnati e interpretati utilizzando la letteratura specifica. Il software Bruker Topspin (v 2.1, BrukerBiospin, Rheinstetten, Germany) è stato utilizzato per processare gli spettri. Il libero decadimento dell'induzione (FID) degli spettri ^1H 1D è stato trasformato mediante la trasformata di Fourier con una dimensione di funzione di 32.768 punti e un'apodizzazione di 0.5 Hz. Di tutti gli spettri sono state corrette la fase e la linea di base.

3.19 Estrazione metaboliti secondari ed analisi mediante spettroscopia IT-TOF

L'estrazione dei metaboliti secondari per l'analisi mediante spettrometria di massa IT-TOF è stata condotta solo da piante di lattuga trattate con le miscele SU e UK e con le sole SU e UK.

I campioni di foglia conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sono stati omogeneizzati con mortaio e pestello in ceramica utilizzando azoto liquido e successivamente liofilizzati. Circa 40 ± 5 mg di campione liofilizzato sono stati pesati in tubi di vetro da 4 mL, ai quali è stato aggiunto 1 mL di metanolo (80%). In seguito ad agitazione, i campioni sono stati incubati una notte a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ al buio. Poi sono stati agitati e lasciati sedimentare. Sono stati prelevati 0.7 mL di surnatante e trasferiti in tubi Eppendorf da 2 mL. Al residuo è stato nuovamente aggiunto 1 mL di metanolo (80%), incubato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti e centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Infine è stato prelevato il surnatante e riunito a quello precedentemente prelevato. I surnatanti sono stati trasferiti in tubi in vetro da 4 ml e portati a secco sotto flusso di azoto. I campioni sono stati poi risospesi in 0.8 mL di metanolo (100%), ai quali sono stati aggiunti 0.02 mL di umbrelliferone (2 ppm), utilizzato come standard interno. Infine i campioni sono stati filtrati utilizzando una siringa di vetro filtro Sartorius (Minisart NML) sterile da $0.2\text{ }\mu\text{m}$.

3.20 Analisi metabolomica mediante LC-MS-IT-TOF

Le soluzioni dei composti estratti da foglie di lattuga trattate con le SU-CAR, gli umati di potassio e le miscele SU-CAR e UK sono state sottoposte a cromatografia liquida mediante l'utilizzo di un sistema UHPLC della *Shimadzu*, composto da due pompe LC-20AD XR UHPLC, un'unità di degassamento DGU-20A 5R, un'unità di autocampionamento SIL-20A XR, un rilevatore SPD-N20A UV DAD fornito di una cella UHPLC. Il sistema UHPLC è abbinato in linea con uno spettrometro di massa ibrido LCMS-IT-TOF attraverso una sorgente Electrospray (ESI).

Una colonna Kinetex $1.60\text{ }\mu\text{m}$ EVO C18 100 Å (150×2.1 mm) è stata eluita ad un flusso di 0.3 ml min^{-1} con una soluzione composta da (A) 0.1% di acido formico in acqua v/v e (B) 0.1 % di acido formico in acetonitrile v/v. L'analisi è stata condotta utilizzando il seguente gradiente di eluizione: 95:5 % di A:B per 0.1 min; un gradiente fino a 10:90 % di A:B in 25 min, poi in

isocratica a 10:90 % di A:B per 5 min, riequilibrata fino a 95:5 % di A:B in 5 min ed infine tenuto a 95:5 % di A:B per 5 min. La colonna è stata termostata a 40 °C per l'intera durata dell'analisi. Sono state effettuate iniezioni di 2 microlitri per ogni campione.

L'analizzatore IT-TOF è stato tarato utilizzando una soluzione standard di trifluoroacetato di sodio. La determinazione delle masse è stata condotta in modalità di ionizzazione negativa utilizzando i seguenti parametri: voltaggio del detector: 1.57 kV, voltaggio dell'interfaccia: -3.5 kV, temperatura del CDL e del blocco di riscaldamento: 250 °C, flusso del gas di nebulizzazione (N₂): 1.5 L/min.

I dati sono stati acquisiti in un intervallo di massa 120-800 m/z, tempo di accumulo degli ioni: 50 ms. Le molecole da identificare sono state selezionate sulla base delle referenze bibliografiche mentre la determinazione delle aree dei corrispondenti frammenti è stata condotta utilizzando il software METID con un errore di 10 ppm tra la massa attesa e quella calcolata.

3.21 Analisi statistica

La valutazione semi quantitativa dei metaboliti secondari è stata condotta normalizzando ciascun valore dell'area del picco IT-TOF sullo standard interno (umbrelliferone) a concentrazione nota.

Per quanto riguarda i metaboliti primari, gli spettri ¹H-NMR sono stati divisi in n-intervalli simmetrici di 0.04 ppm, ciascuno dei quali è stato integrato e normalizzato per lo standard interno (TMSPA).

Per ambedue le valutazioni di metaboliti primari e secondari, l'analisi delle componenti principali (PCA) è stata utilizzata qui come tecnica multivariata per ridurre la dimensionalità del set di dati permettendo contemporaneamente di conservare le informazioni utili espresse in termini di varianza variabile. Il software XLSTAT, versione 9.0 (Addinsoft) è stato utilizzato per elaborare la

PCA dell'insieme totale di dati degli spettri sia IT-TOF che NMR. Le differenze significative nella quantità di metaboliti in funzione dei trattamenti applicati sono state testate mediante il test ANOVA a una e due vie, seguite dal test di Tukey (significativo per valori di $p < 0.05$).

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI



4.1 Compost e sostanze umiche: caratterizzazione e valutazione dell'attività antiossidante e dell'effetto biostimolante

4.1.1 Analisi elementale di compost e sostanze umiche

La tabella 1 riporta i risultati dell'analisi elementale di compost (CO) da carciofo (CO-CAR), caffè (CO-CAF), peperone (CO-PEP) e pastazzo (CO-PAS), delle relative sostanze umiche (SU) da essi estratti (SU-CAR, SU-CAF, SU-PEP e SU-PAS) ed i relativi rapporti atomici carbonio/azoto (C/N) e idrogeno/carbonio (H/C).

I quattro CO mostrano delle significative differenze riguardo al contenuto di carbonio (C), idrogeno (H) e azoto (N). I più alti valori di C per CO-CAF e CO-PEP suggeriscono una maggiore presenza di molecole più recalcitranti (Adani et al., 1997; Castaldi et al., 2005) mentre i valori più bassi per CO-CAR e CO-PAS riflettono la formazione di composti organici ossidati. Il valore di N è simile per CO-CAR, CO-PEP e CO-PAS mentre il maggior valore osservato in CO-CAF, è da attribuire al più grande contenuto di questo elemento nella posa di caffè, materiale originale sottoposto al compostaggio. Il rapporto C/N decrementa significativamente seguendo l'ordine CO-PEP > CO-PAS > CO-CAR > CO-CAF. Un alto rapporto C/N al termine del processo di compostaggio, specialmente per CO-PEP, indica un processo di degradazione microbica delle varie componenti più lento rispetto alle altre matrici utilizzate. *Liu e Price* (2011) hanno riportato che un compost con valori del rapporto C/N minori di 25/1 può essere utilizzato come fertilizzante a lento rilascio di azoto. Il rapporto H/C fornisce indicazioni sul grado di condensazione e di insaturazione delle sostanze umiche (Belzile e al., 1997). Questo rapporto presentandosi molto simile indica che le componenti organiche del compost presentano il medesimo stato di trasformazione della materia organica.

L'analisi elementale delle quattro SU ha mostrato in tutti i casi un aumento di C, N e H rispetto ai rispettivi CO. Le 4 SU mostrano valori simili sia del rapporto C/N che H/C ma più bassi

dei rispettivi CO indicando la stessa stabilità, grado di condensazione e umificazione (Lu et al., 2000) in seguito alla perdita di gruppi idrossialchilici e al conseguente aumento del grado di condensazione aromatica.

Tabella 1: Composizione elementare di compost (CO) e sostanze umiche (SU) da peperone (PEP), pastazzo di limone (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF)

	C	N	H	C/N	H/C		C	N	H	C/N	H/C
	%						%				
CO-PEP	34.4	1.5	3.9	27.2	1.4	SU-PEP	40.8	4.5	4.4	11.7	1.3
CO-PAS	25.2	1.7	3.1	17.2	1.5	SU-PAS	41.4	4.6	4.6	10.5	1.3
CO-CAR	20.5	1.9	2.3	12.6	1.3	SU-CAR	41.6	4.3	4.7	11.3	1.4
CO-CAF	37.4	4.4	4.1	9.9	1.3	SU-CAF	49.1	5.6	5.1	10.1	1.2

4.1.2 Analisi DRIFT

La spettroscopia infrarossa è una tecnica che dà informazioni sui gruppi funzionali presenti nelle molecole che formano il campione e quindi, indirettamente, sulle molecole stesse. Gli spettri DRIFT delle SU contengono una varietà di bande che possono essere diagnostiche di strutture molecolari specifiche.

Gli spettri DRIFT delle SU isolate dai 4 compost, ad eccezione di SU-CAF, mostrano un profilo spettroscopico molto simile (figura 3). In particolare, il segnale a circa 3400 cm^{-1} è attribuito allo stiramento degli O-H di gruppi alcolici e carbossilici ed N-H. I segnali tra 2950-2850 cm^{-1} e quelli a 1457 cm^{-1} e 1326 cm^{-1} sono assegnati alle vibrazioni di stiramento e deformazione dei legami tra carbonio e idrogeno di gruppi alifatici (Muscolo et al., 2007). L'assorbimento a circa 1457 cm^{-1} , assegnato ai gruppi C-H₂, ad eccezione di SU-CAF, era indice di un alto contenuto lipidico del materiale analizzato (Spaccini and Piccolo, 2008). I segnali tra 1650-1600 cm^{-1} sono

assegnati alle vibrazioni di diversi gruppi funzionali quali i C=O di ammidi primarie e i C=O di chetoni, chinoni, acidi carbossilici ed esteri e/o C=O impegnati in legami ad idrogeno. La banda a circa 1593 cm⁻¹ è assegnata a vibrazioni C=C degli anelli aromatici. Inoltre, quella a circa 1526 cm⁻¹, attribuibile a vibrazioni C=C, suggerisce l'esistenza di componenti aromatiche di origine ligninica (Brunow, 2001). I segnali nella regione intorno a 1420 cm⁻¹ corrispondono al legame tra ossigeno e idrogeno e tra carbonio ed ossigeno degli ossidrili fenolici ed alcolici e ai gruppi carbossilato. La banda a 1269 cm⁻¹ può essere attribuita ad anelli di guaiacile (Francioso et al., 2002). La banda a 1220 cm⁻¹ è attribuita allo stiramento dei gruppi C-O e O-H di gruppi carbossilici e C-O di eteri aromatici. Le bande a 1129 e 1082 cm⁻¹ sono anche caratteristiche di C-H aromatici di siringil- e guacil-alcoli, due componenti strutturali delle lignina (Ferrari et al., 2011). Infine il segnale a 1042 cm⁻¹, meno pronunciato in SU-CAF, è dovuto ai gruppi C-O di polisaccaridi o di natura polisaccaridico-simile (Bellamy, 1975; Stevenson, 1994).

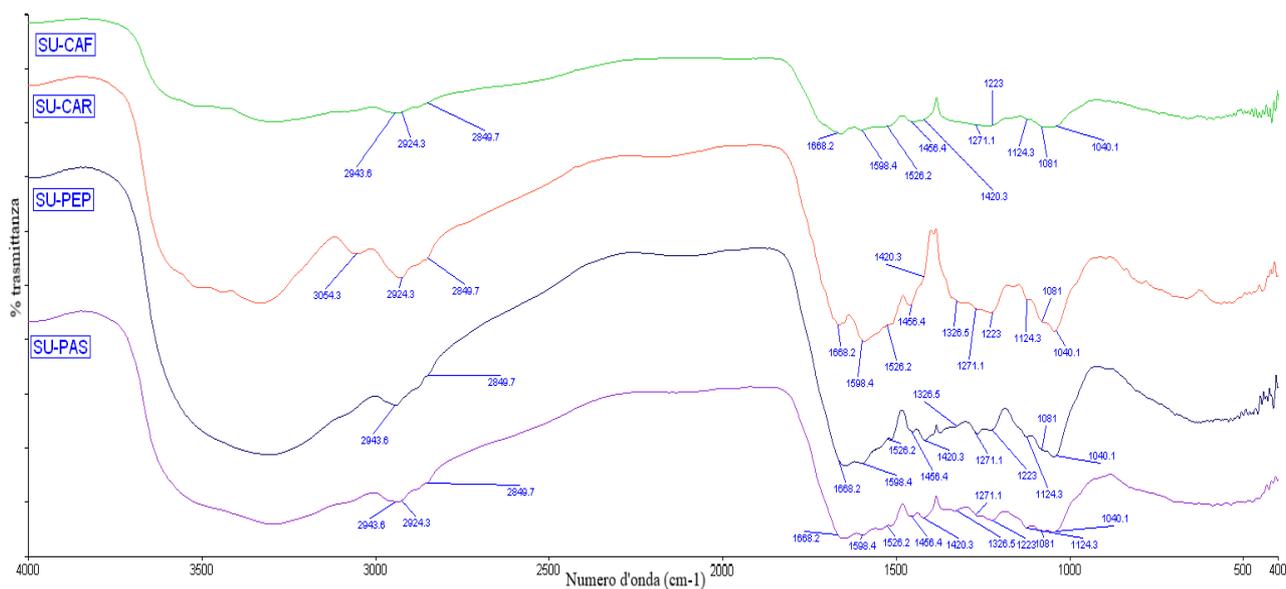


Figura 3: Spettri DRIFT di sostanze umiche (SU) estratte da compost da caffè (SU-CAF), carciofo (SU-CAR), peperone (SU-PEP) e pastazzo di limoni (SU-PAS)

4.1.3 Spettroscopia ^{13}C -CPMAS-NMR

In figura 4 e 5 sono riportati rispettivamente gli spettri ^{13}C -CPMAS-NMR dei CO e delle SU, mentre i valori delle aree dei segnali negli intervalli di risonanza calcolate come percentuale relativa all'area dell'intero spettro, sono riassunti in tabella 2 e 3. L'intero spettro è stato diviso in sei intervalli (0-45, 45-60, 60-110, 110-145, 145-160 e 160-190), a ciascuno dei quali appartiene una specifica classe di composti di carbonio. La regione 0-45 ppm è attribuita ai carboni alchilici (alkyl-C), come i carboni metilenici $(\text{CH}_2)_n$ e i gruppi metili terminali (CH_3) . In particolare, il segnale intorno a 30 ppm può essere associato alle catene metileniche derivate da biopoliesteri, lipidi o cere di origine vegetale (Tadini et al., 2015). La regione tra 45-60 ppm è attribuita ai carboni metossilici (methoxyl-C) ed ai carboni alifatici coinvolti nel legame carbonio-azoto (C-N) di peptidi. La spalla più alta a 56 ppm è collegata alla presenza di gruppi metossili appartenenti agli anelli aromatici delle subunità guaiaciliche e siringiliche delle strutture ligniniche (Spaccini and Piccolo, 2009; Hatcher, 1987). La regione di risonanza tra 60-110 ppm appartiene ai carboni idrossi alchilici (O-alkyl-C) come negli alcoli e nei carboidrati. In tutti i campioni analizzati il segnale a 72 ppm è associabile alla risonanza dei carboni C2, C3 and C5 delle strutture piranosiche di cellulosa ed emicellulosa (González et al., 2001; Spaccini and Piccolo, 2007). La regione tra 110-145 ppm è attribuita ai carboni arilici (aromatic-C). In particolare, dati riportati in letteratura permettono di associare il segnale a 130 ppm all'anello p-idrossifenilico dell'unità cinnamica di lignina e suberina (Spaccini and Piccolo, 2007). La regione da 145-160 ppm è da assegnare ai carboni fenolici (phenol-C), ma non è possibile associarli alla risonanza di specifiche subunità ligniniche (Hatcher et al., 1995). Infine nella regione tra 160 a 190 ppm (carboxyl-C) si ha la risonanza dei carboni carbonilici C=O e in particolare il picco a circa 174 ppm può essere assegnato ai carbossili di acidi grassi, aminoacidi, zuccheri (Spaccini and Piccolo, 2007; Tadini et al., 2015), ed ai carbonili di chetoni ed esteri.

I quattro CO mostrano un elevato contenuto della componente alifatica (0-110 ppm) rispetto a quella aromatica (110–160 ppm). In particolare, per CO-CAR e CO-CAF il maggior contenuto di carboni alchilici (0-45 ppm) e carbossilici (160-190) è da imputare alla maggiore presenza di lunghe catene di acidi grassi mentre per CO-PEP e CO-PAS è presente un picco molto intenso nella regione dei carboni idrossialchilici (60-110 ppm) attribuibile al maggior contenuto di composti di natura polisaccaridica o di forme ossidate che si originano dalla degradazione della componente ligninica. Inoltre, per CO-CAR e CO-CAF il maggior contenuto di carboni alchilici (0-45 ppm) e il più basso contenuto di carboidrati (60-110), composti aromatici (110-145 ppm) e fenolici (160-145 ppm) suggerisce una maggiore attività da parte della biomassa microbica che lascia indisturbati i composti a maggiore idrofobicità (Schmidt et al., 2000). Gli indici di idrofobicità (HB/HI), achilico (A/AO) e ligninico (LR), utilizzati al fine di valutare la stabilità biochimica del materiale organico analizzato, sono riportati in tabella 3 e 4. Gli indici HB/HI ed LR indicano il maggior carattere idrofobico e un maggior contenuto di composti condensati di natura ligninica e tanninica in CO-CAR e CO-CAF rispetto a CO-PEP e CO-PAS. La componente alchilica (0-45 ppm) dopo il processo di estrazione delle SU diminuiva per SU-CAR ed aumentava per SU-PEP e SU-PAS mentre non si osservano sostanziali differenze in SU-CAF. Le quattro SU mostrano anche una sostanziale perdita di zuccheri, più evidente in SU-PEP e SU-PAS rispetto a SU-CAR e SU-CAF.

Inoltre, SU-CAR, SU-PEP e SU-PAS mostrano un incremento dei gruppi metossilici (40-65 ppm) rispetto ai corrispondenti CO mentre per SU-CAF si osserva un minimo decremento. I carboni aromatici (100-145 ppm) incrementano notevolmente per SU-CAR ed in misura minore per SU-CAF e SU-PEP mentre vi è una diminuzione in SU-PAS. I carboni fenolici (145-160 ppm) aumentano per SU-CAR e diminuiscono nelle altre tre SU. Infine, la regione 160-190 ppm mostra un aumento dei carboni carbonilici molto evidente in SU-PEP mentre solo SU-CAR mostra una diminuzione di questa frazione. L'indice HB/HI aumenta in tutte le SU evidenziando il maggior carattere idrofobico delle SU rispetto ai corrispondenti CO. Per SU-PEP, SU-PAS e SU-CAR si aveva anche un sostanziale incremento dell'indice LR rispetto a SU-CAR il cui valore diminuiva.

La tabella 4 mostra i dati della percentuale di aromaticità dei CO e delle SU calcolata utilizzando i valori di integrazione delle aree tra 112-163 ppm e 0-190 ppm, mediante la seguente formula (Tadini et al., 2015; Malcom, 1990):

$$\% \text{ Aromaticità} = \left[\frac{\text{Integrazione da 112 a 163 ppm}}{\text{Integrazione da 0 a 190 ppm}} \right] \times 100$$

Dai risultati si evince che i valori di aromaticità nelle SU non seguono lo stesso andamento dei CO, poiché l'estrazione con KOH fornisce dei materiali con un contenuto molecolare diverso rispetto ai compost di origine.

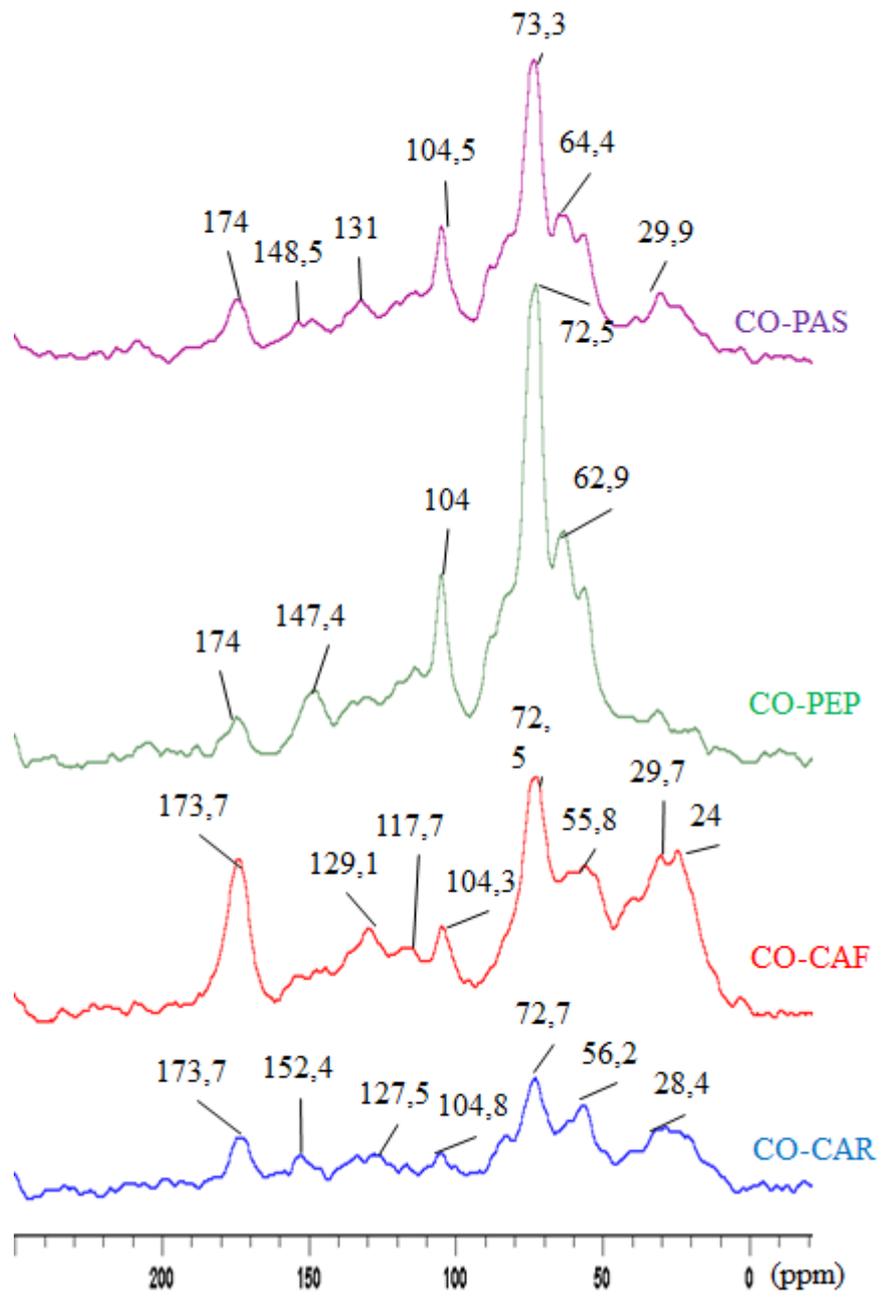


Figura 4: Spettri ^{13}C -CPMAS NMR dei compost da carciofo (CO-CAF) (blu), caffè (CO-CAF) (rosso), peperone (CO-PEP) (verde), pastazzo di limoni (CO-PAS) (viola)

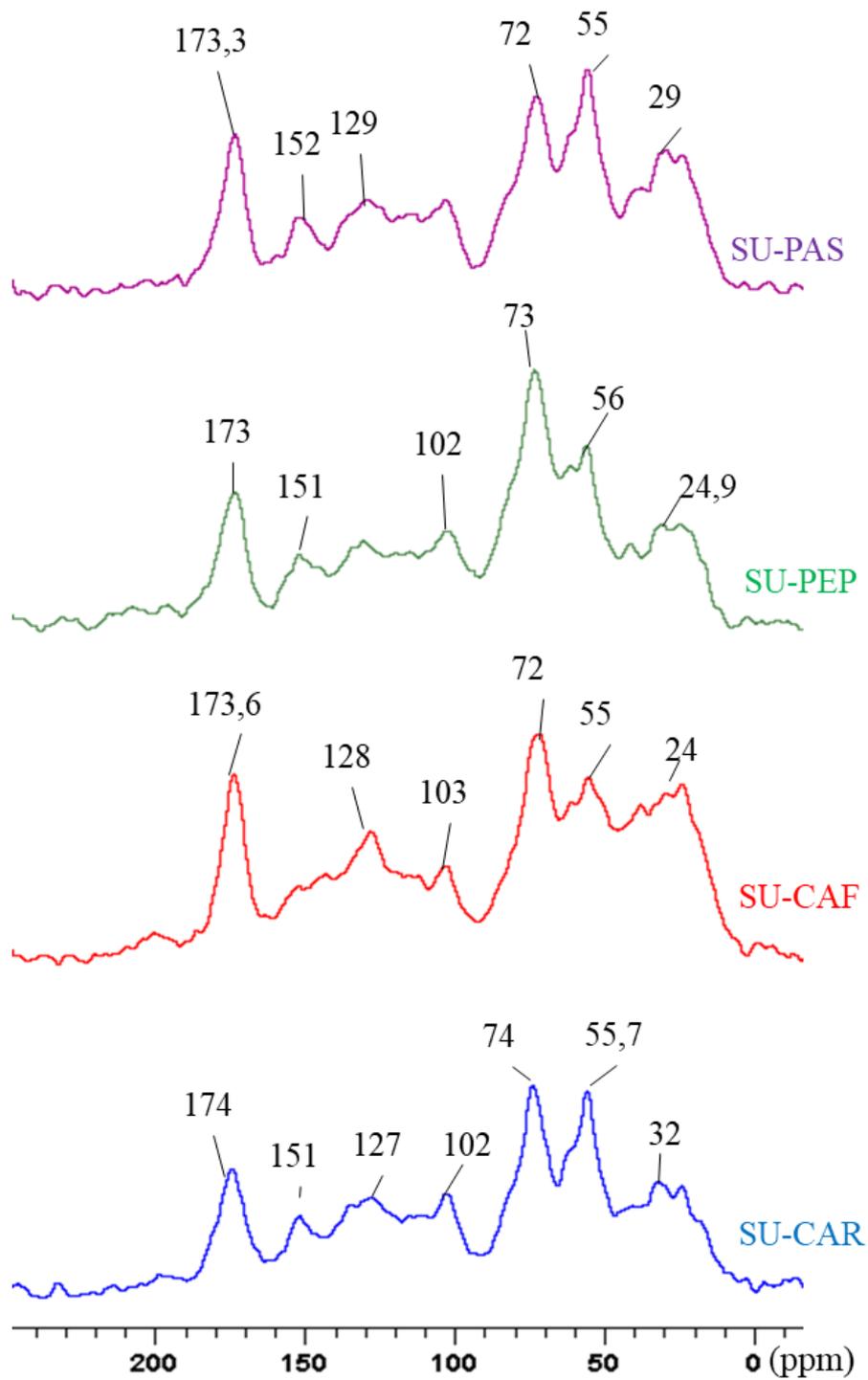


Figura 5: Spettri ^{13}C -CPMAS NMR delle sostanze umiche estratte da compost da carciofo (SU-CAR) (blu), caffè (SU -CAF) (rosso), peperone (SU-PEP) (verde) e pastazzo di limoni (SU -PAS) (viola)

Tabella 2: Integrazione degli spettri ¹³C-CPMAS-NMR espressa come percentuale relativa, dei composti da peperone (CO-PEP) e pastazzo di limoni (CO-PAS), carciofo (CO-CAR) e caffè (CO-CAF),

	0-45 (Alkyl-C)	45-60 (Methoxyl-C)	60-110 (O-alkyl-C)	110-145 (Aromatic-C)	145-160 (Phenol-C)	160-190 (Carboxyl-C)	HB/BI	LR	A/AO
CO-PEP	8.62	9.89	58.07	11.18	6.58	5.65	0.41	1.50	0.15
CO-PAS	10.90	6.91	50.07	16.90	4.97	10.25	0.54	1.39	0.22
CO-CAR	31.90	11.49	27.41	12.09	2.99	14.11	1.13	3.84	1.16
CO-CAF	29.59	13.48	33.06	9.09	4.02	10.76	0.97	3.36	0.90

Indice di idrofobicità (HB/BI): [(0-45) + (45-60) + (110-145) + (145-160)] / [(60-110) + (160-190)]

Rapporto alchilico/idrossialchilico (A/AO): [(0-45) / (60-110)]

Rapporto ligninico (LR): [(45-60) / (145-160)]

Tabella 3: Integrazione degli spettri ¹³C-CPMAS-NMR espressa come percentuale relativa, delle sostanze umiche estratte da composti da peperone (SU-PEP) e pastazzo di limoni (SU-PAS), carciofo (SU-CAR) e caffè (SU-CAF)

	0-45 (Alkyl-C)	45-60 (Methoxyl-C)	60-110 (O-alkyl-C)	110-145 (Aromatic-C)	145-160 (Phenol-C)	160-190 (Carboxyl-C)	HB/BI	LR	A/AO
SU-PEP	20.1	14.2	35.8	14.4	4.5	11.1	1.1	3.2	0.6
SU-PAS	24.4	15.9	29.0	14.3	4.6	11.9	1.4	3.4	0.8
SU-CAR	16.3	13.8	24.7	28.9	5.6	10.6	1.8	2.5	0.7
SU-CAF	30.6	13.1	24.7	15.3	3.4	12.9	1.7	3.8	1.2

Indice di idrofobicità (HB/BI): [(0-45) + (45-60) + (110-145) + (145-160)] / [(60-110) + (160-190)]

Rapporto alchilico/idrossialchilico (A/AO): [(0-45) / (60-110)]

Rapporto ligninico (LR): [(45-60) / (145-160)]

Tabella 4: Percentuale di aromaticità (ARM) dei composti (CO) e delle sostanze umiche (SU) calcolata come:

$$\% \text{ di aromaticità} = \left\{ \frac{[\text{Integrazione area da 112 a 163 ppm}]}{[\text{Integrazione area da 0 a 190 ppm}]} \times 100 \right\}$$

	% ARM		% ARM
CO-PEP	24.0	SU-PEP	17.5
CO-PAS	29.5	SU-PAS	19.9
CO-CAR	13.3	SU-CAR	20.8
CO-CAF	3.7	SU-CAF	17.9

4.1.4 Termochemolisi-GC/MS

La termochemolisi dei CO e delle SU in presenza di idrossido di tetrametilammonio (TMAH) ha permesso il riconoscimento mediante GC/MS di circa 100 molecole, identificate come eteri ed esteri metilici di composti naturali (Spaccini et al., 2009). Essendo la reazione di metilazione mediante TMAH una reazione di transesterificazione, non è possibile distinguere tra gruppi impegnati in legami esterei e gruppi liberi. I cromatogrammi di CO e SU ottenuti sono mostrati in figura 6 e 7 mentre l'elenco dei composti identificati è riportato in tabelle appendice A1 e A2 rispettivamente per CO e SU. L'analisi mediante pirolisi non permette di effettuare una precisa identificazione dei carboidrati presenti, ma è molto selettiva per composti ligninici e lipidici (Spaccini and Piccolo, 2009). Inoltre, il processo di termochemolisi non permette di ottenere una buona riproducibilità in termini di risposta semi-quantitativa delle proteine, questo perché le proteine non essendo stabili a temperature molto elevate (>400 °C) si degradano e non è possibile poi identificarle in GC/MS. Tuttavia è possibile attraverso questa tecnica identificare composti di natura azotata che possono essere associate alle proteine presenti nel campione. I prodotti di pirolisi riconosciuti comprendono diverse tipologie di composti (tabella 5), identificati come ligninici (Lig) esteri metilici di acidi grassi lineari (FAME), contenenti azoto (N), e sebbene in quantità minime, composti di origine polisaccaridica (carb). I monomeri delle lignina sono identificati con i seguenti simboli: P = *p*-idrossifenile, G = guaiacolo (3-metossi, 4-idrossifenile) e S = siringolo (3,5-dimetossi, 4-idrossifenile) (Vane et al., 2001).

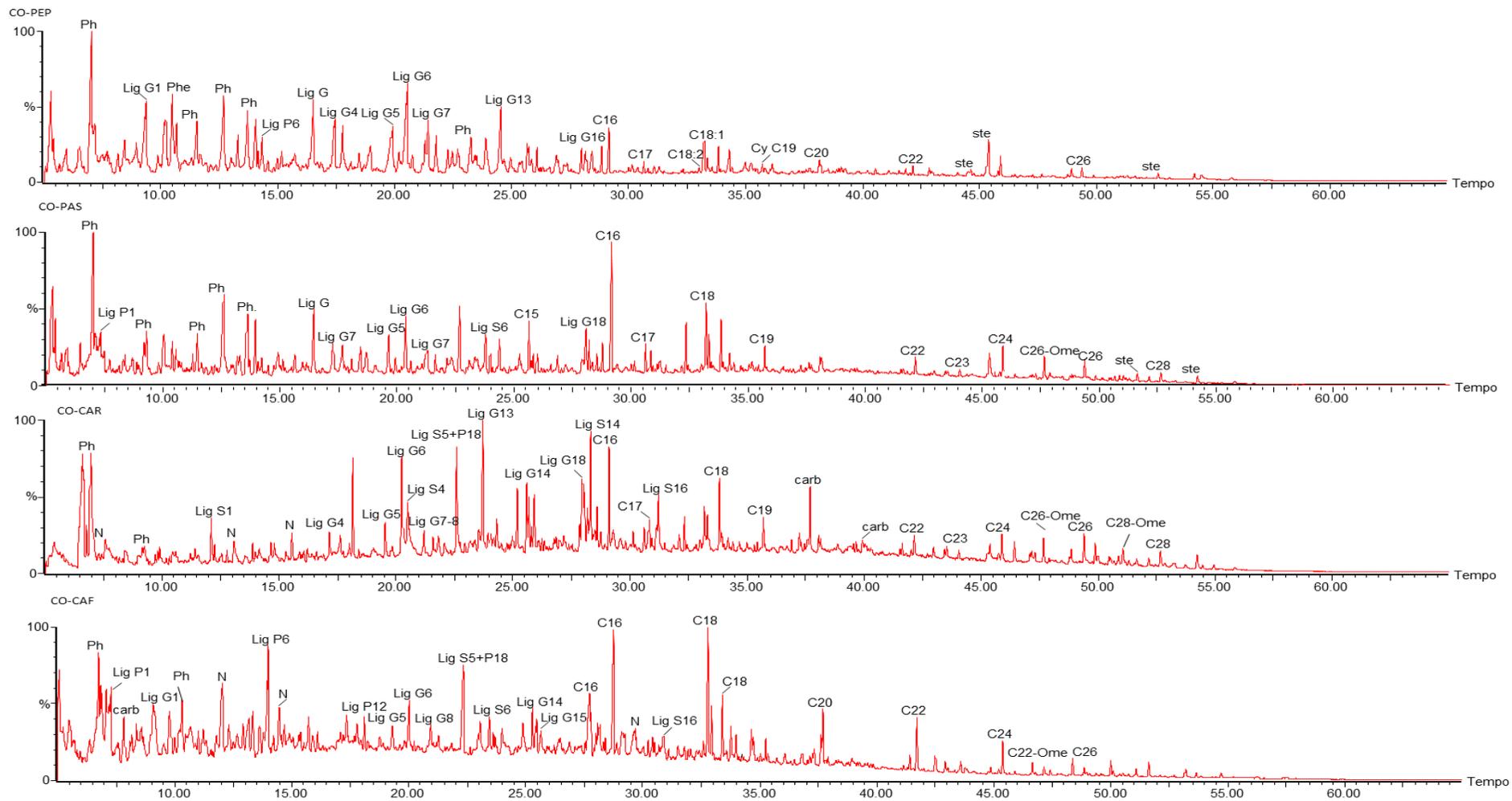


Figura 6: Cromatogrammi di prodotti di pirolisi da compost da peperone (CO-PEP), pastazzo di limoni (CO-PAS), carciofo (CO-CAR) e caffè (CO-CAF)

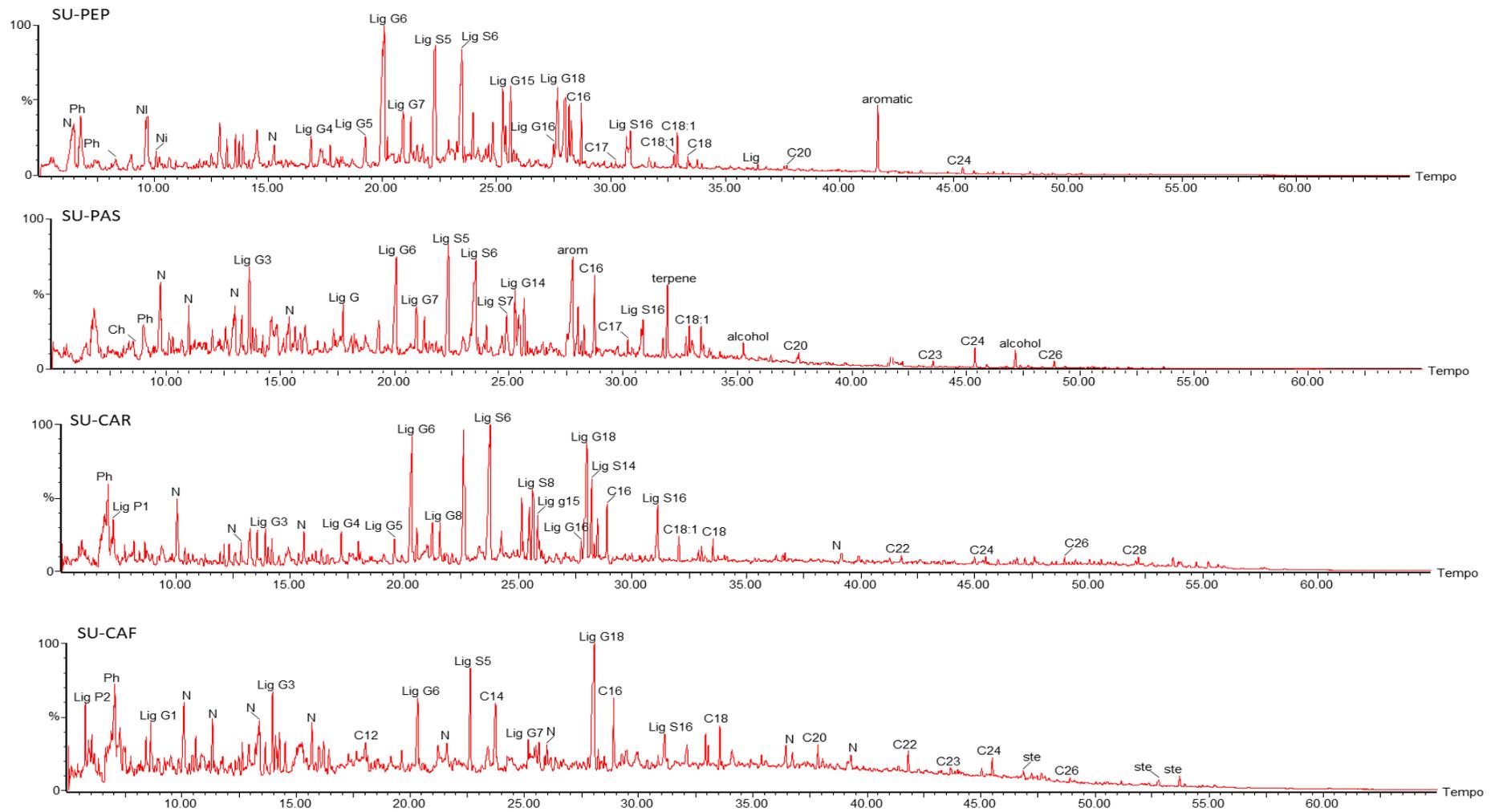


Figura 7: Cromatogramma di prodotti di pirolisi delle sostanze umiche estratte da compost da peperone (SU-PEP), pastazzo di limoni (SU-PAS), carciofo (SU-CAR) e caffè (SU-CAF)

Tabella 5: Classi di composti e dei rispettivi valori percentuali identificati in seguito a termochemolisi GC-MS dei compost da peperone (CO-PEP), pastazzo di limoni (CO-PAS), carciofo (CO-CAR), caffè (CO-CAF)

	CO-PEP	CO-PAS	CO-CAR	CO-CAF
			%	
FAME	27.1	27.1	23.6	19.6
Steroli	1.7	1.7	2.1	1.5
Alcoli	1.0	1.0	2.3	1.2
N	5.6	5.6	6.8	19.6
Aromatici	26.1	26.1	10.3	18.0
Alcani	4.7	4.7	5.2	2.8
Carboidrati	0.9	0.9	4.8	4.7
Lignina	26.4	26.4	42.7	32.0
Lig G6/G4	2.4	2.4	3.2	4.4
Lig S6/S4	4.2	4.2	3.0	6.1

Il valore di FAME nei quattro CO segue il seguente ordine percentuale: CO-PAS (27.1%) > CO-CAR (23.6%) > CO-CAF (19.6%) > CO-PEP (10.7%). E' possibile osservare un'abbondanza di FAME con una lunghezza della catena alchilica compresa tra C14 e C30, con una predominanza di omologhi saturi e insaturi di acidi pentadecanoici, esadecanoici, eptadecanoici e octadecanoici, che sono i principali costituenti dei lipidi di piante superiori (tabella 6) (Amblés et al., 1994).

Inoltre, FAME ramificati a catena corta, in particolare da acidi 12 e 13-metil tetradecanoici e da acidi 14 e 15-metil esadecanoici (iso e anteiso C15 e C17 FAME) sono collegati all'attività microbica (tabella 6). La variazione del contributo dato dai composti alchilici nei CO è da imputare alla diversa predominanza di FAME saturi ed insaturi. La maggiore percentuale di FAME di origine microbica in CO-PAS si può associare ad un avanzato processo di degradazione e stabilizzazione della componente organica. Infatti il CO-PAS è stato ottenuto utilizzando come prodotti di scarto della lavorazione di limoni soprattutto succo e albedo, pertanto materiali poco recalcitranti, ricchi di pectine e facilmente attaccabili dai microrganismi coinvolti nel processo di compostaggio.

Altre differenze tra i composti analizzati sono state osservate nel contenuto di carboidrati, derivati azotati e composti aromatici. In particolare, CO-CAF mostra un contenuto di composti di

origine azotata maggiore rispetto agli altri CO con una percentuale di 19.6%. Questo valore concorda con i risultati ottenuti mediante CP-MAS-NMR in cui il valore di risonanza nella regione tra 45-60 ppm è maggiore per CO-CAF. Il contenuto aromatico si presenta elevato in CO-PAS e CO-PEP (rispettivamente con valori di 26.1% e 39.2%) e più basso in CO-CAF e CO-CAR (rispettivamente 18% e 10.3%). Il contenuto della componente polisaccaridica nei compost è per CO-CAF e CO-CAR circa il 5% mentre per CO-PAS e CO-PEP <1%. La mancata concordanza dei risultati ottenuti in pirolisi con i dati CP-MAS-NMR è spiegata in quanto si stanno ponendo a confronto due analisi che non permettono entrambe una stima pienamente quantitativa dei risultati.

Infatti, la tecnica CP-MAS-NMR è solo semiquantitativa e riferisce i propri dati ad una percentuale relativa, calcolata sulla base delle aree degli altri segnali.

Un contenuto maggiore di steroli è stato identificato in CO-PEP (2.6%) seguito da CO-CAR (2.1%), CO-PAS (1.7%) e CO-CAF (1.5%), le cui origini per tutti i quattro compost sono da attribuire a composti derivanti in gran parte da cere vegetali. Gli alcoli identificati nei CO si mostrano in quantità paragonabili con valori di 1% per CO-PAS, 1.2% per CO-CAF, 1.9% per CO-PER ed infine 2.3% per CO-CAR. Tutti gli alcoli identificati possono considerarsi prodotti derivanti dalla idrolisi di biopoliesteri o dalla bioossidazione degli n-alcani (Amblès et al., 1994). I composti della lignina presenti nei CO derivano dalla mancata decomposizione dei residui ligninici durante il processo di compostaggio (Filley et al., 2000; Vane et al., 2003). Le maggiori componenti derivate dalla lignina e presenti nei CO sono i rispettivi prodotti ossidati, sia del di-, sia del trimetossifenilpropano, come la benzaldeide (G4 e S4), l'acetofenone (G5 e S5) e l'acido benzoico (G6 e S6). Altri prodotti di termochemolisi della lignina sono stati identificati in basse quantità, come i cis e trans isomeri del 1-(3,4-dimetossifenil)-2- metossietilene (G7 e G8) e l'1-(3,4,5-trimetossifenile)-2-metossietilene (S7 e S8), oltre agli enantiomeri dell'1-(3,4-dimetossifenile)-1,2,3-trimetossipropano (G14 e G15) e l'1-(3,4,5-trimetossifenile)-1,2,3-trimetossipropano (S14 e S15). L'acido 3,4- dimetossifenile-2-propenoico (G18) può derivare sia dall'ossidazione delle unità guaiaciliche della lignina, sia dai domini aromatici della suberina. Altri composti aromatici rilasciati

dalla pirolisi sono fenoli, metil-fenoli, alchil-benzeni, ma non è possibile attribuirli ad un'unica fonte in quanto possono avere più origini (polisaccaridi, proteine, lignina) o essere il prodotto di reazioni secondarie. Il quantitativo di forme acide e aldeidiche delle subunità G e S consentono di calcolare gli indici strutturali G6/G4 e S6/S4 correlati alla diversa ossidazione della lignina (Vane et al., 2001). Nei compost i rapporti G6/G4 e S6/S4 hanno rispettivamente i seguenti valori: per CO-CAF 4.4 e 6.1, per CO-CAR 3.2 e 3, per CO-PAS 2.4 e 4.2. Per CO-PEP è stato possibile calcolare il solo indice G6/G4 (con valore 2), manca infatti il valore del rapporto S6/S4 in quanto i segnali erano molto bassi e di difficili integrazione. Dai risultati ottenuti è possibile affermare che per tutti i compost era stato raggiunto un buono stadio di maturazione.

Tabella 6: Contenuto percentuale delle diverse classi di FAME identificate mediante pirolisi TMAH dei compost da peperone (CO-PEP), pastazzo di limoni (CO-PAS), carciofo (CO-CAR) e caffè (CO-CAF)

	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C22	C23	C24	C26	C28	C30
CO-PEP	–	0.24	2.83	0.83	2.35	0.30	0.54	0.29	0.15	0.73	0.31	0.21	0.10
CO-PAS	0.53	2.38	7.92	2.65	6.36	1.21	0.06	0.84	0.22	1.68	0.71	0.44	0.12
CO-CAR	–	–	4.67	2.66	5.19	1.68	0.13	0.86	0.32	1.06	1.00	0.81	–
CO-CAF	0.44	0.79	5.07	1.45	4.69	0.41	1.28	0.69	0.17	0.56	0.09	0.05	0.06

Dai risultati di pirolisi delle SU è possibile osservare che le classi di composti maggiormente presenti nei quattro campioni di SU sono FAME, composti azotati, lignina e aromatici (tabella 7). In particolare si osserva che per la classe dei FAME tutti i quattro campioni di SU mostrano valori paragonabili (tabella 7), con monomeri appartenenti soprattutto ad acidi pentadecanoici (C15), esadecanoici (C16) e octadecanoici (C18) che indicano il diretto input dell'attività microbica (tabella 8) (Spaccini et al., 2013). Anche per le SU i composti di natura azotata identificati possono essere riconducibili ad amminoacidi, proteine e altri peptidi (van Bergen et al., 1998, Schulten and Schnitzer, 1998) di cui, però, l'analisi mediante pirolisi non permette di riconoscere la struttura quaternaria.

Si osserva che il contenuto maggiore di composti azotati è dato da SU-CAF (20.2%) seguito da SU-PAS (17.1%), SU-PER (13.9%) e SU-CAR (12.7%). Composti appartenenti alla

classe dei carboidrati sono stati identificati solo in SU-PAS (2.6%), SU-CAR (3%) e SU-PEP (2.2%), la mancanza di dati per SU-CAF non è da attribuire alla completa assenza di carboidrati nel campione analizzato bensì a segnali troppo bassi e di difficile integrazione. A differenza dei CO precedentemente descritti, il contenuto aromatico è maggiore nelle SU-CAF (9.1%) e SU-PAS (8.6%) rispetto a SU-PEP (5.9%) e SU-CAR (4.6%). In queste categoria rientrano i composti aromatici legati a polisaccaridi e/o a proteine. Il maggiore contenuto di alcoli nelle SU-PAS e SU-CAF indica un migliore substrato di C per la crescita di microrganismi ed un ciclico rilascio di nutrienti rispetto alle altre due SU analizzate. Anche nel caso delle SU i composti identificati, appartenenti alla classe degli steroli derivano dall'idrolisi di biopolimeri quali cere e cutine di origine vegetale (tabella 7). I monomeri ligninici identificati in questo lavoro sono stati ritrovati in lignine di angiosperme e gimnosperme, il che sottolinea l'importanza dell'apporto vegetale nella diversa composizione e struttura delle SU analizzate (Grasset and Amblès, 1998).

In particolare la componente ligninica mostra la seguente distribuzione percentuale: SU-PEP (68%) > SU-CAR (65.1%) > SU-CAF (55.7%) > SU-PAS (55.4%). Questi valori sono dati dalla somma delle subunità p-cumariliche, guaiaciliche e siringiliche identificate. La presenza della forma aldeidica (G4 e S4) e della forma acida (G6 e S6) delle subunità ligniniche G ed S hanno permesso di calcolare gli indici strutturali G6/G4 e S6/S4, consentendo di ottenere informazioni sul grado di trasformazione bio-ossidativa della lignina (Vane et al., 2001). Si osserva che il rapporto G6/G4 mostra valori paragonabili e più alti nelle SU-PAS (13.8) e SU-PEP (13) rispetto a SU-CAF (6.7) e SU-CAR (5.8). Mentre i valori del rapporto S6/S4 sono maggiori in SU-PAS (48.9) e SU-CAF (21.2) rispetto a SU-PEP (16.6) e SU-CAR (8.9). Alti valori di entrambi gli indici strutturali in SU-PAS e SU-PEP indicano un avanzato stato di trasformazione della lignina.

Tabella 7: Classi di composti e rispettivi valori percentuali identificati da pirolisi di sostanze umiche estratte da compost da peperone (SU-PEP), pastazzo di limoni (SU-PAS), carciofo (SU-CAR) e caffè (SU-CAF)

	SU-PEP	SU-PAS %	SU-CAR	SU-CAF
FAME	9.2	10.5	10.1	10.3
Steroli	0.3	3.1	1.9	2.0
Alcoli	0.3	2.0	0.4	2.0
N	13.9	17.1	12.7	20.2
Aromatici	5.9	8.3	4.6	9.1
Alcani	0.2	0.2	0.1	-
Carboidrati	2.2	2.6	3.0	-
Lignina	68.0	55.4	65.1	55.7
Lig G6/G4	13.0	13.8	5.8	6.7
Lig S6/S4	16.6	48.9	8.9	21.2

Tabella 8: Contenuto percentuale delle diverse classi di FAME identificate mediante pirolisi TMAH in sostanze umiche estratte da compost da peperone (SU-PEP), pastazzo di limoni (SU-PAS), carciofo (SU-CAR) e caffè (SU-CAF)

	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C22	C24	C26	C28	C30
SU-PEP	0.36	-	3.88	0.42	2.23	0.14	0.34	0.07	0.10	0.07	0.03	0.02
SU-PAS	0.41	0.89	-	0.69	1.99	0.25	0.34	0.09	0.76	0.23	0.06	-
SU-CAR	-	3.12	2.12	0.57	1.60	-	0.13	0.34	0.38	0.22	0.34	0.36
SU-CAF	0.33	1.38	2.79	0.68	3.42	0.42	0.86	0.83	0.86	0.16	0.09	0.35

4.1.5 Attività antiossidante e contenuto fenolico totale in sostanze umiche da compost verdi

L'attività antiossidante è stata calcolata per le sostanze umiche estratte da compost, mediante saggio ABTS, che prevede la misura della riduzione dell'assorbanza del radicale ABTS^{•+} alla lunghezza d'onda (λ) di 734 nm. Il test del Folin-Ciocalteu è stato utilizzato per la stima del contenuto fenolico totale (TPC). Tutti i dati sono rientrati in un intervallo di confidenza del 95% ($p < 0.05$), calcolato mediante test statistico di Tukey. La capacità antiossidante totale (TAC), calcolata in rapporto alla concentrazione di Trolox utilizzato come standard, è stata riportata come TEAC ed espressa in millimoli equivalenti di Trolox su chilogrammo di campione (mmol eq. Trolox/kg campione). Il TPC è stato misurato come milligrammi equivalenti di acido gallico su

grammo di campione (mg acido gallico eq. /g campione), in rapporto alla concentrazione di acido gallico utilizzato per costruire la retta di calibrazione. I risultati di TAC e TPC sono rispettivamente mostrati in figura 8 e 9. Le lettere A, B e C riportate all'interno del grafico indicano la significatività delle differenze tra i vari campioni analizzati. Come si osserva in figura 8 i maggiori valori di attività antiossidanti sono stati registrati per SU-PAS (442.17 ± 29.9) seguiti da SU-CAR (383.8 ± 27.6) > SU-PEP (290.5 ± 13.2) > SU-CAF (227.5 ± 43.8).

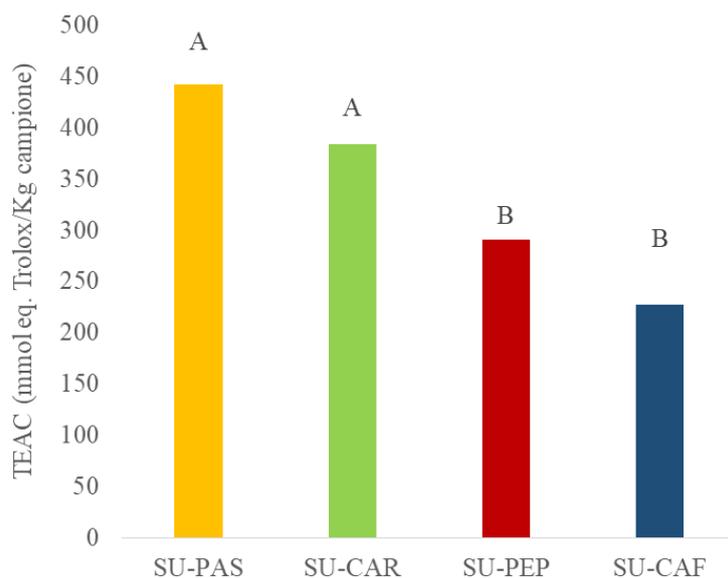


Figure 8: Attività antiossidante da saggio ABTS su sostanze uniche estratte da compost da pastazzo di limoni (SU-PAS), carciofo (SU-CAR), peperone (SU-PEP) e caffè (SU-CAF). I valori calcolati in riferimento al Trolox (standard) sono espressi come mmol eq. Trolox/kg di campione (TEAC). Le lettere in maiuscolo indicano le differenze significative tra le SU calcolate mediante test statistico di Tukey ($p < 0.05$)

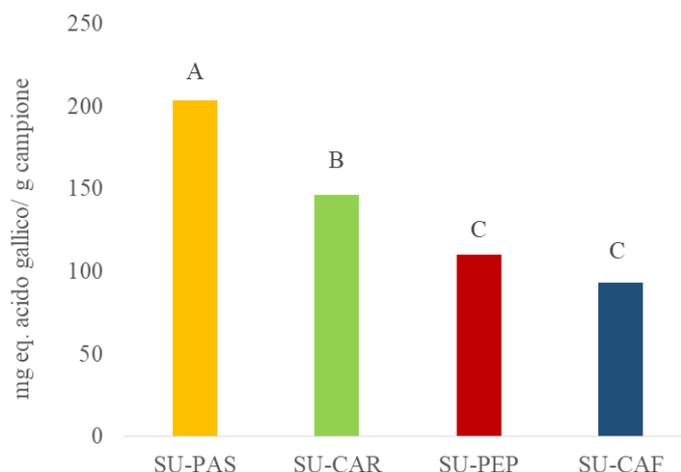


Figure 9: Contenuto fenolico totale (TPC) calcolato con il metodo Folin-Ciocalteu su sostanze uniche estratte da compost da pastazzo di limoni (SU-PAS), carciofo (SU-CAR), peperone (SU-PEP) e caffè (SU-CAF). I valori calcolati in riferimento alla concentrazione di acido gallico (standard) sono espressi come mg equivalenti di acido gallico su grammi di campione testato (mg eq. Acido gallico/g campione). Le lettere in maiuscolo indicano le differenze significative tra le SU calcolate mediante test statistico di Tukey ($p < 0.05$)

I valori di TPC, mostrati in figura 9, mostrano un andamento simile ai risultati ABTS secondo l'ordine: SU-PAS (256.9 ± 10.7) > SU-CAR (195.8 ± 18.3) > SU-PEP (158.9 ± 10.23) > SU-CAF (138.9 ± 1.85).

La correlazione tra le due analisi è stata valutata mediante il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson, il quale ha confermato la buona correlazione tra TPC e TEAC con un valore di $r = 0.916$. Pertanto, la maggiore attività antiossidante registrata nelle SU-PAS è da collegarsi al maggiore contenuto di composti fenolici totali, i quali sono da sempre considerati una risorsa antiossidante naturale impiegata nella prevenzione o nella riparazione dai danni causati dallo stress ossidativo che porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), altamente instabili e capaci di creare seri danni cellulari.

Tra le specie reattive più diffuse vi sono l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed il radicale idrossilico (OH^\cdot). Questi, in base alla loro origine, possono comportare la perossidazione dei lipidi con conseguente alterazione della struttura delle membrane cellulari o

agire a livello nucleare apportando danni irreversibili al DNA. Pertanto l'interesse nello studio di sistemi di prevenzione o di azione contro i ROS coinvolge a pieno il settore biologico, agronomico, medico ed ambientale.

L'elevata presenza di gruppi fenolici di origine non solo ligninica, contenuti all'interno delle sostanze umiche fanno sì che queste si comportino come accettori o donatori di elettroni sulla base dello stato redox del sistema (Aeschbacher et al., 2012; Nikolaev et al., 2008) e portano alla formazione di strutture simili a chinoni / idrossichinoni che hanno un elevato potere antiossidante (Riffaldi and Schnitzer, 1972). Il crescente interesse per l'attività antiossidante delle SU è nato anche in seguito al documentato effetto che queste hanno sulla salute umana. In particolare come applicazione esterna a diversi trattamenti (ematoma, flebiti, desmorresi, miogelosi, artrosi, poliartriti, osteoartriti, osteocondrosi) e come applicazione interna in diverse terapie (diarrea, gastriti, ulcere gastriche, coliti diabete mellito) (Zykova et al., 2018). Il potere antiossidante delle SU è dato dalla proprietà di rimozione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali anioni superossido (O_2^-) e radicali idrossilici (OH^*) (Zykova et al., 2018). I risultati ottenuti nel presente lavoro. Oltre a sottolineare la relazione tra componente fenolica e potere antiossidante delle SU, ne suggeriscono il futuro impiego nel settore nutraceutico o alimentari, in aggiunta all'applicazione che già hanno come biostimolanti e/o fertilizzanti naturali.

4.1.6 Test di germinazione con semi di mais

Il test di germinazione è stato condotto per valutare il potenziale effetto biostimolante di SU-CAR e SU-PAS. La scelta di effettuare il test solo con questi due materiali è collegata ai dati ottenuti dal saggio dell'attività antiossidante (ABTS), che hanno evidenziato un loro maggiore potere antiossidante. Lo scopo di questo saggio è stato quello di poter correlare ad una attività

antiossidante delle sostanze anche un positivo effetto biostimolante in pianta. Il test è stato condotto verificando l'effetto di cinque concentrazioni (10-25-50-100-200 ppm) di ciascuna SU analizzata.

I semi controllo, trattati con acqua deionizzata, sono stati posti a germinare nelle stesse condizioni di luce ed umidità dei trattamenti. I risultati sulla lunghezza media del coleotile e lunghezza media della radice primaria, espressa in centimetri (cm), sono riportati in figura 10 (A e B) per SU-CAR e 11 (A e B) per SU-PAS. Le misure sono state condotte mediante l'uso del software WinRhizo in seguito a scansione della plantula.

Tutti i semi di mais hanno mostrato un tasso di germinazione positivo ($\approx 100\%$), ma il diverso allungamento del coleotile e della radice primaria sono stati funzione del diverso trattamento e della diversa concentrazione applicati. I risultati del test con SU-CAR (figura 10 A) non hanno mostrato differenze significative nella lunghezza dell'epicotile rispetto al controllo. Per quanto riguarda l'allungamento della radice primaria (figura 10 B), si osserva un aumento della lunghezza della radice a 50 e 100 ppm rispetto al controllo. I risultati del trattamento alla concentrazione di 200 ppm non mostrano differenze significative rispetto al controllo.

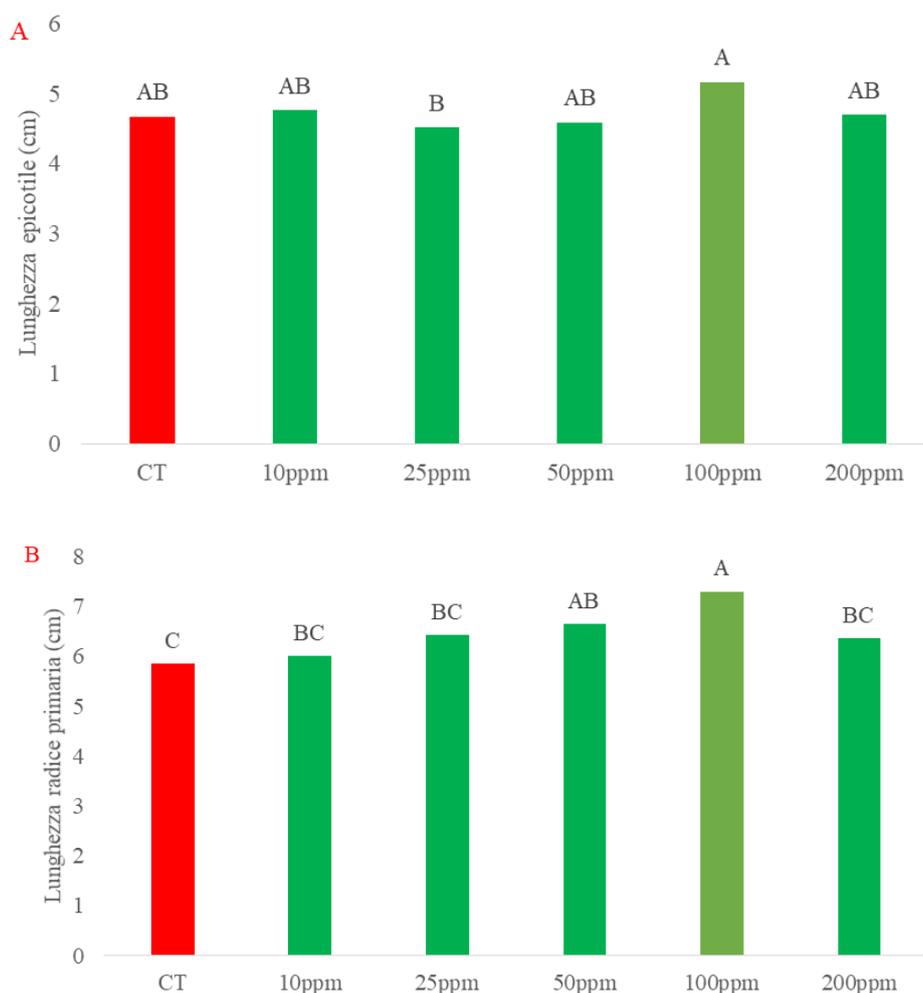


Figura 10: Media dei risultati del test di germinazione condotto su semi di mais con sostanze umiche estratte da compost da carciofo (SU-CAR). I risultati sono riportati come lunghezza media del coleotile (A) e lunghezza media della radice primaria (B). Le concentrazioni testate sono state 10-25-50-100-200 ppm, mentre i semi controllo (CT) sono stati trattati con solo acqua deionizzata. Il test è stato condotto utilizzando quattro repliche biologiche. Le lettere maiuscole riportate nel grafico indicano le differenze statistiche tra i vari trattamenti con valore di $p < 0.05$, calcolate mediante test LSD

I risultati della lunghezza dell'epicotile per i trattamenti con SU-PAS (figura 11 A) mostrano un effetto inibitorio sulla crescita rispetto al controllo alle concentrazioni di 100 e 200 ppm. Non sono state invece osservate differenze significative tra il controllo e le altre concentrazioni testate (10-25-50 ppm). Stesso andamento è mostrato nei risultati inerenti alla lunghezza della radice primaria (figura 11 B). Non sono state notate differenze significative rispetto al controllo per quanto riguarda la lunghezza della radice per i trattamenti a 10, 25 e 50 ppm, mentre si osservano invece effetti inibitori sulla crescita radicale alla concentrazione di 100 ppm.

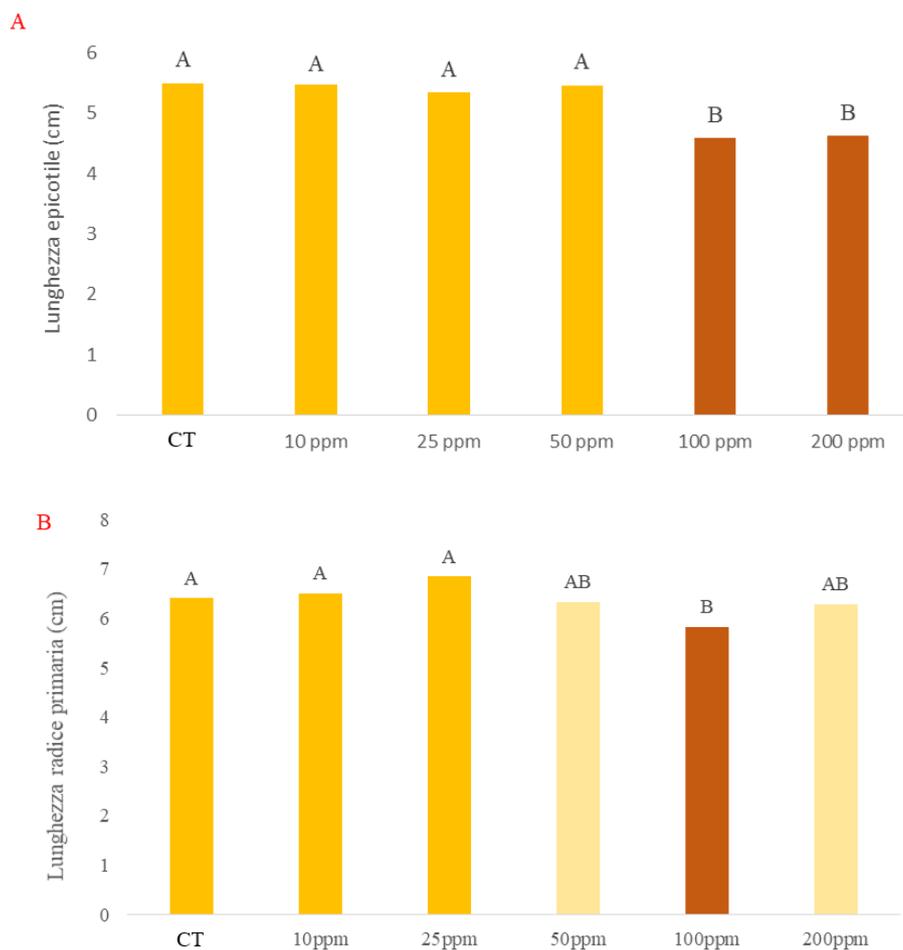


Figure 11: Media dei risultati del test di germinazione condotti su semi di mais con sostanze umiche estratte da compost da pastazzo di limoni (HS-PAS). I risultati sono riportati come lunghezza media del coleotile (A) e lunghezza media della radice primaria (B). Le concentrazioni testate sono 10-25-50-100-200 ppm, semi controllo (CT) sono stati trattati con acqua deionizzata. Il test è stato condotto utilizzando quattro repliche biologiche. Le lettere maiuscole riportate nel grafico indicano le differenze statistiche tra i vari trattamenti con valore di $p < 0.05$, calcolate mediante test LSD

I risultati hanno indicato un effetto biostimolante principalmente sull'allungamento della radice primaria in seguito a trattamenti con SU-CAR. Questo effetto può essere correlato alla composizione molecolare delle sostanze, in quanto tra le due sostanze testate quelle estratte da compost da carciofo presentano un maggiore contenuto di composti ligninici (tabella 7), confermato anche da valori leggermente maggiori di aromaticità (tabella 4) se paragonati alle SU-PAS. Alcuni studi hanno infatti dimostrato che il maggiore contenuto di composti aromatici, prevalentemente di

natura ligninica, favorisca soprattutto la crescita della radice (Monda et al., 2017). Pur trattandosi per entrambe le sostanze umiche di estrazioni da compost unicamente vegetali la diversa percentuale di materiale ligninico a livello delle SU-CAR è spiegabile sulla base della natura degli scarti utilizzati per il compostaggio. Infatti scarti della lavorazione dei carciofi consistono in steli, foglie e parti esterne delle infiorescenze che costituiscono la parte più coriacea della pianta e quindi quella maggiormente recalcitrante. Mentre gli scarti della lavorazione di limoni, essendo albedo e succo, sono maggiormente ricchi di zuccheri e pectine, cioè composti facilmente degradabili e privi di composti aromatici.

L'allungamento per distensione cellulare è spiegato anche dal comportamento auxino-simile delle SU, in quanto mediante l'acidificazione dell'apoplasto attivano una via di trasduzione del segnale che comporta l'allungamento della radice (Canellas et al., 2015). Tale azione non può essere però confermata con i risultati del presente lavoro in quanto non è sufficiente il test di germinazione, ma sono necessarie prove che prevedano anche la valutazione dell'architettura radicale.

4.1.7 Esperimento in vaso: valutazione delle biomassa e del contenuto di clorofilla di piante di lattuga

L'esperimento in vaso condotto con piante di lattuga ha previsto la valutazione degli effetti delle SU-CAR sia applicate da sole sia in miscela con diverse percentuali di umati di potassio (UK).

Gli UK sono il prodotto di estrazione da residui di lignite, con nota attività biostimolante in pianta. La scelta di utilizzare solo le SU-CAR come materiale da testare è stata determinata dai risultati ottenuti dal test di germinazione nei quali queste sostanze hanno mostrato un effetto biostimolante sulla crescita radicale maggiormente significativo rispetto al controllo (figura 10).

I risultati relativi ai valori medi di biomassa secca sono riportati in figura 12. Analizzando i trattamenti con il mix 1 si osserva un leggero aumento della biomassa alla concentrazione di 50 ppm, ma non vi sono grandi differenze tra il controllo ed i trattamenti a 10 e 100 ppm. Anche i trattamenti con il mix 2 a 50 ppm hanno mostrato un modesto aumento di biomassa ma non diversamente significativo rispetto al controllo e al mix 1. I trattamenti con il mix 3 hanno mostrato invece una riduzione della biomassa fogliare secca se paragonata al trattamento con 50 ppm del mix 2 e valori in peso molto più simili alle piante controllo (figura 12). I risultati mostrano che i trattamenti delle sole SU-CAR e UK hanno svolto un maggiore effetto biostimolante sulle piante rispetto al controllo ed ai trattamenti misti. Le piante trattate con 10 ppm di SU-CAR hanno evidenziato valori maggiori di biomassa fogliare rispetto al controllo ed ai precedenti trattamenti. Questi valori in peso si mantengono pressoché costanti anche in piante trattate con 50 e 100 ppm.

I trattamenti con UK a 50 e 100 ppm hanno dato risultati di biomassa paragonabili a quelli ottenuti con le SU-CAR ma più alti del controllo e dei trattamenti misti (figura 12).

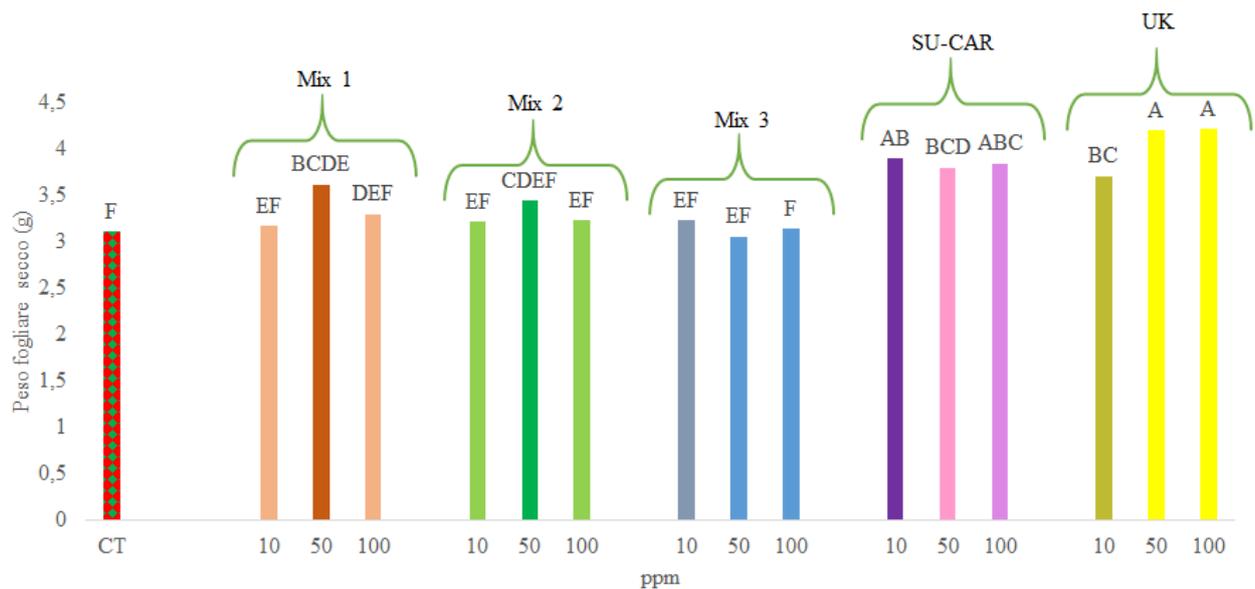


Figura 12: Valori medi di biomassa fogliare secca di piante di lattuga trattate con Mix 1 (75% HS-CAR+25%HS-K), Mix 2 (50% HS-CAR+50%HS-K), Mix 3 (25% HS-CAR+75%HS-K), SU-CAR ed UK. Le lettere maiuscole indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

* SU-CAR= sostanze umiche estratte da compost di carciofo; UK= umati di potassio estratti da lignite

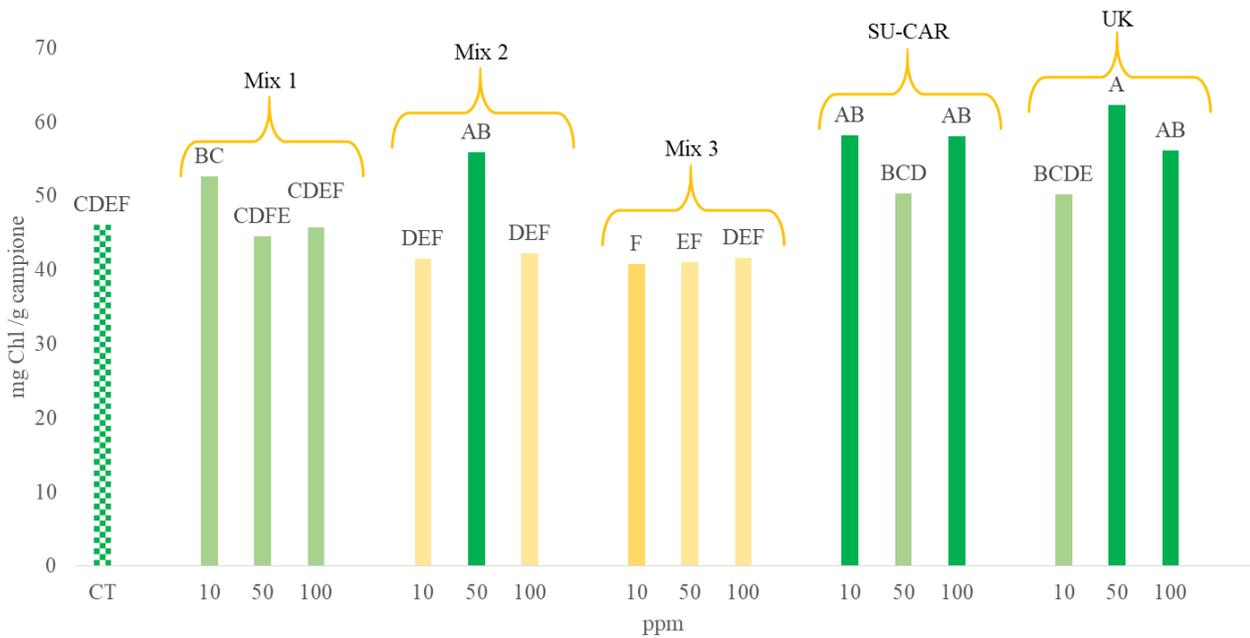


Figura 13: Valori medi di clorofilla (Chl) totale di piante di lattuga trattate con Mix 1 (75% HS-CAR+25%HS-K), Mix 2 (50% HS-CAR+50%HS-K), Mix 3 (25% HS-CAR+75%HS-K), SU-CAR ed UK. Le lettere maiuscole indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)
 * SU-CAR= sostanze umiche estratte da compost di carciofo; UK= umati di potassio estratti da lignite

L'effetto biostimolante dei diversi trattamenti è stato valutato anche sulla base del contenuto di clorofilla totale delle piante di lattuga. I risultati, espressi come milligrammi di clorofilla su grammi di foglia, sono riportati nel grafico in figura 13.

È noto che l'applicazione di sostanze ad effetto biostimolante può comportare un aumento del contenuto dei pigmenti fotosintetici in quanto attivano specifici enzimi nella via fotosintetica.

Studi riportano che uno dei principali cambiamenti a livello del metabolismo fotosintetico comportava in piante di mais, una riduzione del contenuto di amido seguita da un aumento di zuccheri solubili. Tale attività sembrava essere mediata da enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati (Ertani et al., 2011). Pertanto, la variazione di biomassa, osservata nel presente lavoro, collegata ad un relativo aumento nel contenuto di clorofilla potrebbe far ipotizzare, anche nel caso di piante di lattuga, un coinvolgimento delle sostanze umiche nell'attivazione di specifiche vie metaboliche.

Come si osserva dal grafico in figura 13, l'andamento del contenuto di clorofilla, in particolare della clorofilla totale, segue quello dei risultati di biomassa. Infatti, le piante trattate con 50 ppm del mix 2 hanno un contenuto di clorofilla totale significativamente maggiore rispetto al controllo e alle concentrazioni a 10 e 100 ppm e ai trattamenti con il mix 1. Le piante trattate con il mix 3 non mostrano differenze significative nel contenuto di clorofilla rispetto al controllo per tutte le concentrazioni testate.

I trattamenti con le sole SU-CAR alle concentrazioni di 10 e 100 ppm mostrano un contenuto di clorofilla maggiore del controllo e paragonabile alle piante trattate con 50 ppm del mix 2. Valori leggermente più bassi delle due precedenti concentrazioni, ma comunque significativamente maggiori rispetto alle miscele, sono stati osservati in piante trattate con 50 ppm di SU-CAR. Infine analizzando i risultati dei trattamenti con gli umati si hanno valori di clorofilla significativamente maggiori del controllo con i trattamenti a 50 e 100 ppm, ma questi dati non sono significativamente diversi da quelli ottenuti con i trattamenti delle sole SU.

Quindi come nel caso della biomassa, anche per il contenuto di clorofilla, l'azione combinata dei due materiali non consente un aumento del contenuto di pigmenti.

L'effetto biostimolante che le diverse sostanze, ed ancor più le diverse concentrazioni, esercitano sulla pianta trova spiegazione nella struttura molecolare dei materiali applicati.

Aver ottenuto dei risultati significativamente positivi rispetto al controllo con piante trattate con le sole SU-CAR o UK, fa ipotizzare che l'azione combinata dei due materiali, seppure in percentuali diverse, porti invece alla formazione di composti che risultano poco biostimolanti in quanto difficilmente assorbibili dalle piante. Infatti, le miscele potrebbero alterare la capacità idraulica delle piante, riducendo notevolmente l'assorbimento di acqua da parte delle radici, ma anche modificare la microflora del suolo creando delle alterazioni a livello rizosferico o formare dei composti stabili di difficile accesso da parte della pianta.

Gli effetti positivi esercitati dai trattamenti con i soli umati di potassio possono collegarsi alla struttura prevalentemente aromatica del materiale. Infatti gli UK sono costituiti da numerosi

anelli aromatici, gruppi poliaromatici, composti fenolici legati all'anello aromatico e composti carbossilici che conferiscono un effetto biostimolante in pianta (Ertani et al., 2011). L'azione biostimolante delle SU-CAR somministrate da sole è da collegarsi invece alla loro struttura supramolecolare costituita da monomeri ligninici, composti aromatici e molecole di piccole dimensioni. Queste ultime infatti, una volta rilasciate nella rizosfera possono influenzare i tessuti cellulari radicali ed esercitare un'azione ormone-simile con conseguente sviluppo della pianta (Canellas et al., 2008; Canellas et al., 2015; Nardi et al., 2007; Piccolo et al., 1996).

Tutte le variazioni osservate a livello fenologico in pianta sono collegate all'attivazione o meno di specifiche vie metaboliche in risposta a stimoli di natura fisica o chimica. Lo studio dei metaboliti secondari ha avuto come obiettivo quello di comprendere se c'è una correlazione tra l'aumento della biomassa aerea e del contenuto di clorofilla con l'attivazione di vie metaboliche secondarie in risposta ai diversi trattamenti.

4.1.8 Analisi metabolomica IT-TOF

La metabolomica, come tutte le scienze omiche, è la scienza che studia e misura tutto ciò che riguarda i metaboliti, permettendo l'identificazione e la quantificazione di singole molecole fino ad interi profili metabolici. Con il termine metaboloma si intende l'insieme di tutti i metaboliti presenti in un organismo che sono il prodotto della sua espressione genica. La metabolomica permette di avere un'immagine istantanea della fisiologia della cellula al momento in cui si effettua l'analisi.

Le tecniche per poter analizzare il metaboloma in pianta sono varie ed in questo lavoro abbiamo abbinato la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con la spettrometria di massa (MS) ed in particolare con uno spettrometro di massa corredato di trappola ionica (IT) e tempo di volo (TOF). La metabolomica è stata condotta su tutte le piante trattate con le singole sostanze SU-CAR e UK o con le loro miscele. L'analisi non ha previsto l'impiego di standard specifici e non

avendo a disposizione una banca dati di metaboliti l'identificazione è stata effettuata mediante studi bibliografici.

È stata condotta un'analisi metabolomica accurata includendo una scrematura dei dati grezzi al fine di permettere l'identificazione di classi di composti che potessero risentire dei trattamenti di piante con le SU. L'area di ciascun segnale è stata normalizzata sulla base dell'area dello standard interno (umbrelliferone). Per semplificare la lettura dei grafici ai diversi trattamenti sono state assegnate lettere (A=controllo, C=trattate con 50 ppm del mix 1, F=trattate con 50 ppm del mix 2, M= trattate con 10 ppm SU-CAR, N= 50 ppm SU-CAR, O= 100 ppm SU-CAR, P= 10 ppm UK, Q= 50 ppm UK, R= 100 ppm UK). Sulla base dei riferimenti bibliografici consultati (Viacava et al., 2018) sono stati identificati 35 metaboliti (tabella 9), appartenenti ad acidi fenolici, flavonoli, flavoni, cumarini, tannini idrolizzabili e derivati dei lignani.

I dati prodotti dall'analisi metabolomica sono stati analizzati mediante l'analisi multivariata delle componenti principali (PCA), che ha permesso di individuare graficamente differenze tra i campioni analizzati. Le prime due PC associate ad auto valori > 4 permettono di spiegare il 37.37 % della variabilità totale, con PC1 che spiega il 26.89% e PC2 il 10.48%. La significatività delle differenze osservate è stata confermata dal test statistico ANOVA ($p < 0.05$). La PC1 è fortemente e positivamente correlata ai metaboliti secondari contrassegnati con i seguenti ID: acido caffeoilmalico (4), quercetina exoso-glucuronide (16), quercetina-3-O-glucuronide (17), luteolina-7-O-glucoside (22), luteolina-7-O-glucuronide (23), luteolina-7-O-rutinoside (24), esculetina-6-O-glucoside (29), diidrossicumarina (30). Mentre la PC2 è correlata positivamente con: derivati dell'acido clorogenico (1), acido caffeoiltartarico (3), eriodictiolo-O-glucuronide (28), maloildiidrossicumarina (31), siringaresinolacetilesoso (34), dimetossi-esosilarciresinolo (35).

Il biplot in figura 14 mostra le relazioni che ci sono tra i trattamenti e le variabili evidenziate. In particolare, la variazione del derivato dell'acido clorogenico è fortemente correlata all'acido caffeoiltartarico (3), maloildiidrossicumarina (31), all'acido caffeoiltartarico (3) e all'eriodictiolo-O-glucuronide (28). Le quercetine (16 – 17) sono correlate all'esculetina (29) e alla

diidrossicumarina (30). Si può quindi osservare una prevalente separazione dei trattamenti in quattro gruppi non tutti però nettamente separati tra di loro (figura 14). Sono infatti molto vicini tra loro, come raggruppamento i trattamenti A – F – N – O – P, quelli R – M, e si separano da questi due gruppi i trattamenti C e Q.

In particolare, lungo la PC1 i gruppi C – F – N – R si separano da A – M – O – P – Q, mentre lungo la PC2 si ha la separazione dei trattamenti A – N – R da tutti gli altri. Il quadrante in alto a destra, che indica i valori positivi della PC1, include prevalentemente il trattamento N e parzialmente i trattamenti M e C. Il trattamento N è caratterizzato da una maggiore concentrazione dei metaboliti derivati dell'acido clorogenico (1), le quercetine (16 – 17), l'eriodictiolo-O-glucuronide (28) e il maloildrossicumarina (31). Tra il quadrante in alto a destra e quello in basso a destra, che indica i valori negativi della PC2 ed i positivi della PC1 sono posizionati i trattamenti C, F ed R caratterizzati dai metaboliti derivati dall'acido clorogenico (1) (maggiore in R), l'acido caffeoilmalico (4) (maggiore in C), la luteolina-7-O-glucoside (22) (il cui valore percentuale maggiore è ritrovato nel trattamento F), la luteolina-7-O-glucuronide (23) (maggiormente presente nei trattamenti nel seguente ordine $R > F > C$), la luteolina-7-O-ramnoside (24) (le cui percentuali nei trattamenti C e F sono paragonabili) e il siringoresinolacetilesoso (34). Nel quadrante in alto a sinistra che corrisponde ai valori negativi della PC1 e positivi della PC2 sono presenti i trattamenti A e Q. Pur non essendoci nessun metabolita che caratterizzi particolarmente questa area, il trattamento Q mostra valori maggiori di maloildrossicumarina (31) e valori più bassi dei metaboliti siringoresinolacetilesoso (34) e dimetossi-esosilarciresinolo (35). I restanti trattamenti sono posizionati nel quadrante in basso a sinistra del grafico PCA che corrisponde a valori negativi di PC1 e PC2. In quest'ultima sezione, non sono stati ritrovati metaboliti che hanno influenzato particolarmente la PCA, nonostante ciò l'analisi statistica ha mostrato un maggior contenuto del metabolita maloildrossicumarina (31) in M e di eriodictiolo-O-glucuronide (28) in O.

Per i metaboliti che non hanno mostrato variazioni si può concludere che non sono discriminanti dal tipo di trattamento applicato. I risultati della PCA hanno fornito le basi per poter

valutare la relazione tra la tipologia di trattamento effettuato e la risposta metabolica. È stato infatti osservato che piante con maggiore biomassa e maggior contenuto di clorofilla erano anche caratterizzate da una maggiore concentrazione di polifenoli. In particolare, le classi di polifenoli identificate sono coinvolte in meccanismi di adattamento della pianta a risposte di stress di tipo sia biotico che abiotico.

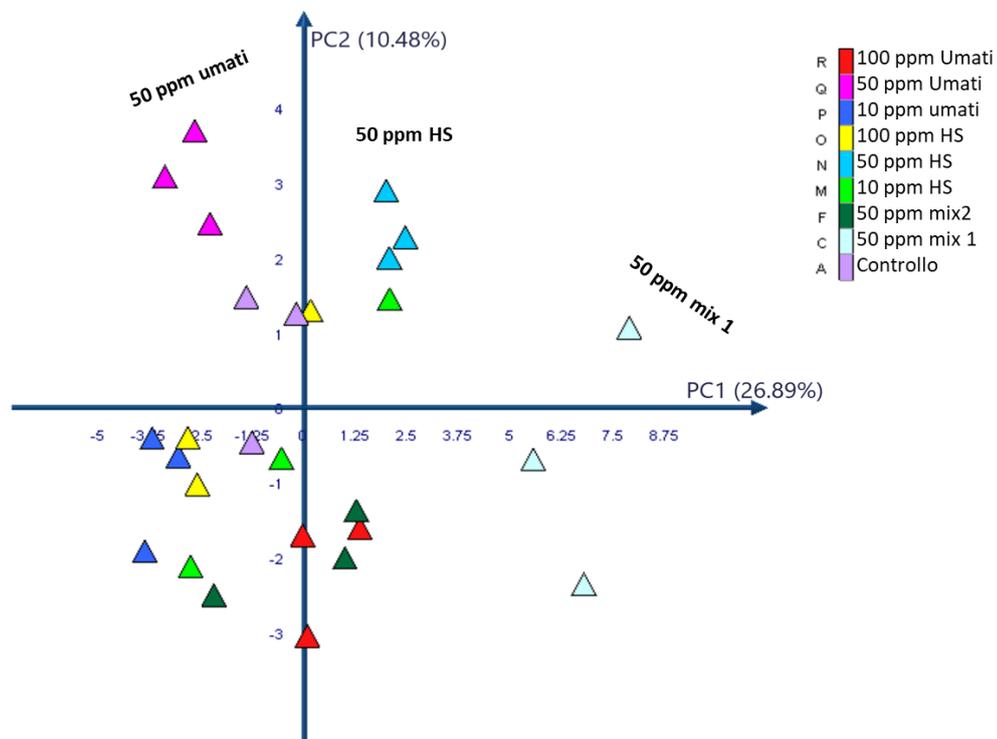
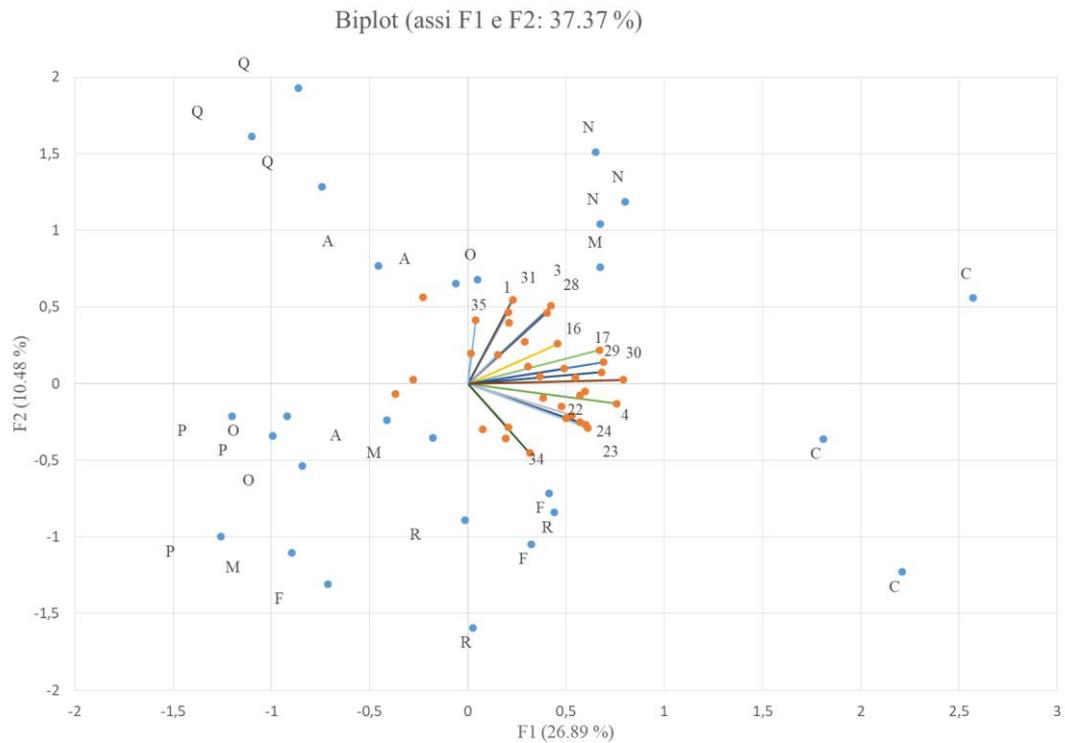


Figura 14: Biplot che indica la disposizione dei gruppi di variabili ottenuta in seguito all'analisi PCA condotta su dati di metabolomica di piante di lattuga. I trattamenti sono indicati dalle lettere: controllo (A), trattate con 50 ppm del mix 1 (B), trattate con 50 ppm del mix 2 (F), 10 ppm SU-CAR (M), 50 ppm SU-CAR (N), 100 ppm SU-CAR (O), 10 ppm UK (P), 50 ppm UK (Q), 100 ppm UK (R)

Tabella 9: Metaboliti identificati in piante di lattuga mediante LC-MS-IT-TOF. Sono state analizzate piante dell'esperimento con sostanze umiche da carciofo (SU-CAR) e umati di potassio estratti da lignite (UK) utilizzati sia singolarmente che in miscela a diverse concentrazioni. I metaboliti in rosso hanno fornito un contributo maggiore nella separazione delle variabili nell'analisi PCA. L'identificazione dei composti è avvenuta mediante comparazione dei pesi molecolari ottenuti dall'analisi LC-MS con quelli riportati in letteratura (Viacava et al., 2018)

* AF=acidi fenolici; Fl=flavonoidi; Fle=Flavone; Cum=cumarinico; TI=tannini idrolizzabili; Dlig=derivati dei lignani

		Massa osservata	Massa predetta	Formula	Diff. (ppm)
<i>Acidi fenolici</i>					
1	Derivati dell'acido caffeico	353,0865	353,0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-3,7
2	Derivati dell'acido p-cumaril-chinico	337,0918	337,0929	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	-3,2
3	Acido caffeoil-tartarico	311,0394	311,0409	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	-4,7
4	Acido caffeoil-malico	295,0447	295,0459	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	-4,2
5	Acido p-cumaroilcaffeoilchinico	499,1248	499,1246	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₁	0,4
6	Acido dicaffeoilchinico e acido caffeoil-chinico glicoside	515,1382	515,1406	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄	-4,7
7	Acido cicorico	473,0736	473,0725	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	2,2
8	Caffeoil-derivati	357,0612	357,0616	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	-1,1
9	Acido p-cumaric-esoside	325,0907	325,0929	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	-6,7
10	Acido diidrocaffeoico esoside	343,103	343,1035	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	-1,3
<i>Derivati acidi idrossibenzoici</i>					
11	Acido idrossibenzoico	137,0239	137,0244	C ₇ H ₆ O ₃	-3,8
12	Acido idrossibenzoic-esoside	299,0761	299,0772	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	-3,8
13	Acido di-idrossibenzoic-esoside	315,0701	315,0722	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	-6,5
<i>Derivati idrossifenilacetici</i>					
14	Acido 4-idrossifenilacetic-esoside	313,0909	3.130.929	C ₁₄ H ₁₈ O ₈	-6,4
<i>Flavonoidi</i>					
<i>Flavonoli</i>					
15	Quercetina-O-esoside	463,0866	463,0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-3,4
16	Quercetina esosoglucuronide	639,1204	639,1203	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₈	0,2
17	Quercetina-3-O-glucuronide	477,0667	477,0675	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	-1,6

		Massa osservata	Massa predetta	Formula	Diff. (ppm)
18	Quercetina-3-O-malonilglucoside	549,0885	549,0886	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	-0,2
19	Quercetina-3-O-(6''-O-malonil)-glucoside-7-O-glucuronide	725,1213	725,1207	C ₃₀ H ₃₀ O ₂₁	0,85
20	Quercetina-O-di-esoside	625,1431	625,141	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	3,32
21	Kamferolo	285,0388	285,0405	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-5,83
	<i>Flavoni</i>				
22	Luteolina 7-O-glucoside	447,0933	447,0933	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0,03
23	Luteolina 7-O-glucuronide	461,0716	461,0725	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	-2,06
24	Luteolina 7-O-rutinoside	593,1487	593,1512	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-4,2
25	Apigenina-glucuronide	445,0785	445,0776	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	1,94
26	Apigenina-glucoside	431,0973	431,0984	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-2,48
27	Luteolina	285,0399	285,0405	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-1,97
	<i>Flavononi</i>				
28	Eriodictiolo-O-glucuronide	463,0863	463,0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-4,1
	<i>Cumarine</i>				
29	Esculetina-6-O-glucoside	339,071	339,0722	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	-3,41
30	Diidrossicumarina	177,0196	177,0193	C ₉ H ₆ O ₄	1,51
31	Maloildiidrossi cumarina	293,0288	293,0303	C ₁₃ H ₁₀ O ₈	-5,09
	<i>Tannini idrolizzabili</i>				
32	Acido tri-4-idrossi-fenil-acetico glucoside	581,1662	581,1665	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₂	-0,43
	<i>Derivati dei lignani</i>				
33	Siringaresinolo	417,1562	417,1555	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	1,7
34	Siringaresinolo acetilesoso	621,2164	621,2189	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₄	-3,99
35	Dimetossi-esosilarciresinolo	581,2257	581,224	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	2,98

La conoscenza dei motivi per cui si ottiene un aumento di metaboliti di interesse permette il miglioramento di specie largamente utilizzate nell'alimentazione. Vegetali con alti contenuti di vitamine, polifenoli e altri composti antiossidanti giocano un ruolo molto importante nella dieta umana in quanto rispondono alla domanda del consumatore di avere un alimento di qualità ma che abbia anche un valore bioattivo (El-Nakhel et al., 2019). La quantità di flavonoidi assunti come cibo dipende molto da quanto sia varia la dieta e da quali siano le abitudini alimentari considerate, ma si può comunque affermare che il valore si aggiri intorno a 50 mg/g al giorno (Terahara, 2015).

La lattuga in particolare è uno degli alimenti maggiormente consumati al mondo, in quanto considerata fonte di vitamine e composti antiossidanti (Sun et al., 2018), ed è proprio l'interesse per quest'ultimi che spinge la ricerca ad uno studio sulle vie metaboliche della lattuga in risposta a diversi stimoli e adattamenti. In particolare il metabolismo secondario della lattuga varia molto non solo sulla base di fattori genetici ma soprattutto in base alle condizioni ambientali e di gestione, basti pensare che anche la diversa illuminazione ne modifica la crescita ed il metabolismo secondario (Sun et al., 2018). Sulla base delle pratiche agronomiche impiegate (coltivazioni in serra o in pieno campo) e delle condizioni di crescita, varia il metabolismo di composti appartenenti alle classi dei flavonoidi, molti dei quali identificati nel presente lavoro (Sun et al., 2018).

I flavonoidi sono metaboliti secondari delle piante comprendenti uno scheletro difenilpropanoico C6-C3-C6 che lega due anelli benzenici con 3 carboni (figura 15), sono sintetizzati a partire dalla fenilalanina attraverso la via biosintetica dello shikimato e dall'arogenato con il manolin-CoA mediante il ciclo degli acidi tricarbossilici. I flavonoidi sono strutturalmente classificati in: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavononoli, isoflavoni e flavanoli (catechine). In molte piante commestibili i flavonoidi sono presenti come O-glucosidi con zuccheri quali glucosio o ramnosio legati ai gruppi idrossilici dell'anello fenolico. Solo in casi come nel C-glucosilflavone, lo zucchero è direttamente legato allo scheletro carbonioso. Solitamente sono presenti come glucosidi basati su agliconi come il kamferolo e la quercetina. In particolare la rutina, la quercitrina,

isoquercitrina, l'apigenina e la luteolina sono tra i maggiori flavonoidi ritrovati in lattuga (Terahara, 2015).

L'interesse per i flavonoidi presenti negli alimenti non è solo collegato ad uno studio funzionale della pianta o ad un interesse agronomico, in quanto i metaboliti identificati, grazie alle loro proprietà antiossidanti sono coinvolti anche nella risposta a malattie allergeniche, cardiovascolari, intestinali, cancerogene. In particolare una volta ingeriti, questi vengono assorbiti da diversi tratti dello stomaco e dell'intestino, vengono trasformati dai batteri della flora intestinale e una volta in circolo esplicano la loro azione attraverso meccanismi di protezione contro i radicali liberi, chelando ioni metallici prodotti dai ROS e bloccando la perossidazione dei lipidi.

La perossidazione dei lipidi è un processo attraverso il quale acidi grassi insaturi sono convertiti in radicali liberi mediante la rimozione di atomi di idrogeno. Questa reazione si propaga attraverso i radicali lipidici e gli atomi di idrogeno ad altre molecole insature provocando una maggiore formazione di specie radicaliche. L'azione antiossidante dei flavonoidi è esplicita principalmente grazie a tre criteri che sono: la presenza di un gruppo idrossilico in posizione 5-7 dell'anello, di un gruppo idrossilico in posizione 4 dell'anello e del doppio legame tra il C2-C3 (Gupta et al., 2016).

I composti più abbondanti che si ritrovano in lattuga sono l'acido cicorico, seguito dall'acido clorogenico, il caffeoil-mesotartarico, l'acido caffeoiltartarico. Mentre l'acido cicorico è tipico delle asteracee, l'acido clorogenico è ritrovato in tutto il regno vegetale (El-Nakhel et al., 2019).

Metaboliti di grande interesse scientifico e commerciale sono in particolare i derivati dell'acido caffeico (Ke and Saltveit, 1988) quali l'acido caffeoil-tartarico, l'acido cicorico, l'acido clorogenico, e flavonoli (Hermann, 1976) quali la quercetina 3-O-(6-O-malonil-glucoside)-7-O-glucoside, la quercetina 3-O-glucuronide, la quercetina 3-O-glucoside (Ferrerres et al., 1997; Winter and Hermann, 1986).

La quercetina e i suoi derivati sono ritenuti tra i composti con il maggiore potere antiossidante, in quanto la sua struttura chimica presenta tutte e tre le condizioni sopracitate per le

quali un flavonoide è considerato un antiossidante (Gupta et al., 2016). Nel presente lavoro i derivati dell'acido clorogenico identificati sono stati ritrovati in concentrazioni maggiori nelle piante trattate con 50 ppm SU-CAR (M) e 50 ppm UK (R), le quali hanno mostrato anche i migliori risultati in termini di biomassa secca e contenuto di clorofilla.

I derivati dell'acido clorogenico sono localizzati prevalentemente a livello del parenchima cellulare e svolgono un'azione di protezione dei cloroplasti dai danni che possono essere causati dalle radiazioni ultraviolette (Yang et al., 2018). Questi metaboliti infatti sono da considerarsi punti cardine dei meccanismi di protezione cellulare in quanto coinvolti nell'attivazione di vie metaboliche in risposta a stress ossidativi (Romani et al., 2002).

Composti appartenenti ai flavonoidi, più precisamente ai flavonoidi glicosilati tra i quali rientrano le quercetine, il kamferolo e la luteolina hanno valori maggiori del controllo in tutte le piante trattate che hanno mostrato anche una maggiore crescita della biomassa aerea ed un più alto contenuto di clorofilla. La correlazione tra maggiore biomassa e alti livelli di composti polifenolici trova conferma in studi che hanno collegato il contenuto di tali composti non solo ad una maggiore sviluppo della pianta ma anche ad una stimolazione dei processi di lignificazione, in quanto tali metaboliti si ritrovano coinvolti nella biosintesi della lignina (Yang et al., 2018).

Anche le condizioni di crescita della pianta (DuPont et al., 2002, Romani et al., 2002), la diversa esposizione alla luce ed il tessuto considerato per il campionamento (Yang et al., 2018) influiscono sul contenuto di metaboliti ritrovati. Infatti, è stato dimostrato che i livelli di kamferolo variano notevolmente tra colture gestite in serra o in pieno campo (DuPont et al., 2002).

Il contenuto di polifenoli in lattuga varia anche sulla base del tessuto analizzato, infatti durante il campionamento è stato fondamentale prelevare per tutte le piante foglie interne ed in punti non vicini alla testa della lattuga.

Metaboliti quali la luteolina, ritrovati in percentuali maggiori in piante trattate con 50 ppm del mix 1 (C), sono di grande interesse scientifico in quanto implicati nelle risposte allelopatiche della pianta (Zhang et al 2018) e nella risposta allo stress idrico (Gharibi et al 2019).

Inoltre è stato dimostrato che la luteolina è coinvolta nella stimolazione alla crescita della pianta anche in risposta a trattamenti con microrganismi quali funghi micorrizici arbuscolari, *Tricoderma* e altri funghi (Saia et al., 2019).

Ritrovare nel presente lavoro metaboliti collegati prevalentemente all'adattamento a condizioni di stress fa ipotizzare che durante l'esperimento siano venute a crearsi condizioni di stress (che non possiamo precisamente definire con i risultati al momento a disposizione), per le quali i trattamenti con SU-CAR o UK hanno favorito un adattamento della pianta modificandone il metabolismo e favorendone una maggiore crescita rispetto a piante controllo. Infatti studi condotti da *Garcia* e collaboratori (2012) hanno confermato che le SU inducono un iniziale stress nella pianta che provoca un aumento della concentrazione di ROS. Variazione dei livelli di O_2^- e H_2O_2 in pianta porta all'attivazione di vie di trasduzione del segnale collegate poi all'esplicazione dell'azione auxino-simile delle sostanze, ad una maggiore richiesta di acqua a livello radicale e ad una crescita per distensione cellulare (García et al., 2012).

Non aver ottenuto risultati altrettanto positivi in termini di maggiore crescita e variazioni a livello del profilo metabolico in tutte le piante trattate con le miscele di SU-CAR e UK (ad eccezione dei trattamenti con 50 ppm del mix 1 e del mix 2) porta alla formulazione dell'ipotesi che la formazione di addotti tra molecole affini nelle miscele abbiano reso difficile l'accessibilità di metaboliti bioattivi alle piante ed abbiano perciò amplificato la condizione di stress creata dal trattamento ed impedito un successivo adattamento della pianta. Pertanto anche il profilo metabolico secondario è rimasto uguale al controllo.

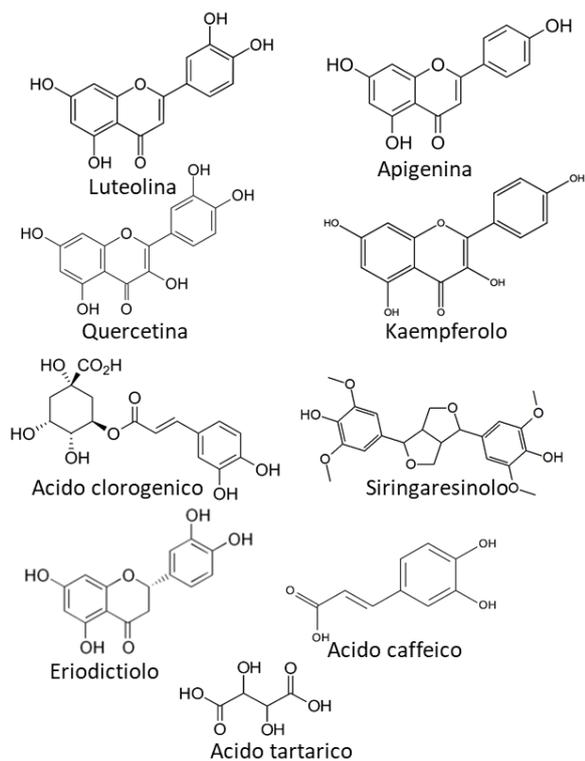


Figura 15: Struttura molecolare dei composti fenolici identificati mediante analisi di spettrometria di massa IT-TOF in piante di lattuga trattate con SU-CAR e UK

4.2 Estratti etanolici: caratterizzazione e valutazione dell'attività antiossidante e dell'effetto biostimolante

La caratterizzazione chimica di estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF) è stata condotta mediante pirolisi con idrossido di tetrametilammonio (TMAH) seguita da gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) e mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare allo stato solido (^{13}C -CPMAS-NMR).

4.2.1 Caratterizzazione chimica degli estratti in etanolo

In figura 16 A, B, C sono riportati, rispettivamente, i cromatogrammi GC-MS (Total Ion Chromatograms) degli estratti in etanolo da compost di CAR, PAS e CAF con i principali segnali dei metaboliti mentre in tabella 11 sono riportate le classi dei composti identificati con la loro percentuale relativa. I monomeri della lignina sono stati catalogati con le lettere G per la sub unità 3-metossi, 4-idrossifenil guaicile, S per il 3,5-dimetossi,4-idrossifenil siringile e P per p -idrossifenile (Vane et al., 2001).

L'elenco completo dei composti identificati mediante l'uso della libreria Nist e di riferimenti bibliografici, sono riportati in appendice (tabelle A3)

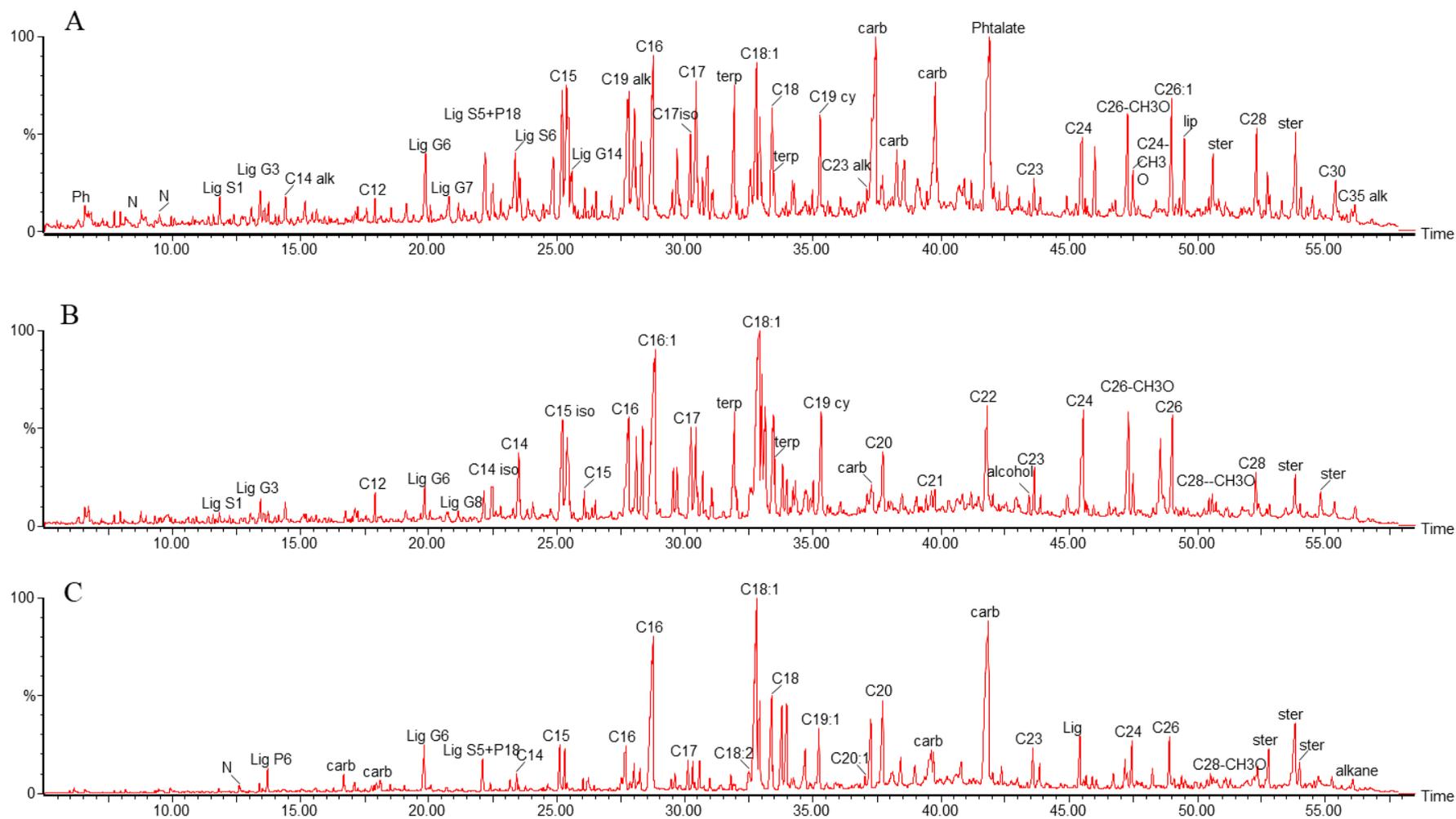


Figura 16: Cromatogrammi dei prodotti di pirolisi, analizzati mediante gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS), dagli estratti in etanolo da compost da carciofo (A), pastazzo di limoni (B) e caffè (C)

Le analisi dei tre cromatogrammi ha permesso l'identificazione di circa 100 composti appartenenti principalmente ad eteri ed esteri di composti naturali (tabella 10) (Spaccini et al., 2009). Le principali classi di composti identificati, derivati sia da piante sia da microrganismi presenti nel suolo, appartengono a: molecole ligniniche (Lig), esteri metilici degli acidi grassi (FAME), alcani, composti azotati (N), carboidrati (carb) e composti aromatici non di derivazione ligninica.

L'abbinamento della pirolisi e dell'analisi GC/MS è particolarmente adatto all'identificazione di composti lipidici ma non è altrettanto indicata per la caratterizzazione univoca dei carboidrati e delle proteine presenti all'interno del campione (Spaccini and Piccolo, 2009).

In relazione a quest'ultima classe di molecole è possibile identificare solo composti azotati derivati dalla degradazione termica delle proteine.

Negli estratti da CAR e PAS sono stati identificate soprattutto le forme ossidate del dimetossi-fenil-propano come la benzaldeide (G4), mentre l'acetofenone (G5) e l'acido benzoico (P6, G6, S6) sono stati individuati in tutti e tre gli estratti. Gli estratti da CAR mostrano una percentuale di monomeri ligninici totali del 13.3%, maggiore sia degli estratti da PAS e CAF (tabella 10) il cui ammontare corrisponde, rispettivamente, a 3.96 % e 5.15%, il che suggerisce una maggiore decomposizione delle componenti ligniniche negli estratti da CAR rispetto alle altre due classi di estratti (Monda et al., 2017).

Tabella 10: Elenco delle classi di composti nei pirogrammi ottenuti in seguito a pirolisi con TMAH, e percentuale relativa delle aree degli estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF)

%	PAS	CAR	CAF
FAME	68.51	40.41	58.94
N	0.21	1.73	1.24
Carboidrati	4.16	17.41	23.19
Alcani	3.92	7.85	0.79
Aromatici	1.44	1.98	0.50
Steroli	4.76	6.23	9.11
Alcoli	9.21	4.00	0.56
Lignina	3.96	13.33	5.15
Lig G6/G4	3.39	18.74	-

Tabella 11: Percentuale di FAME a diverso numero di atomi di carbonio identificati nei pirogrammi degli estratti da compost di pastazzo da limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF). Le somme percentuali sono state calcolate sulla base delle % delle aree relative al totale

	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19
	%							
PAS	0.47	0.24	1.48	4.78	18.62	6.75	16.40	4.62
CAR	0.32	-	0.52	4.53	5.48	5.66	6.99	2.50
CAF	0.07	-	0.50	2.75	12.63	3.16	24.73	2.53

Questi risultati concordano con i valori del rapporto ligninico (LR) ottenuto dagli spettri ¹³C-CPMAS-NMR, riportato in tabella 12, che risulta maggiore per gli estratti da CAR rispetto a PAS e CAF. Gli esteri metilici di acidi grassi (FAME) sia saturi che insaturi, sono i composti predominanti nei tre pirogrammi di figura 16. In particolare, sono maggiormente presenti gli acidi pentadecanoici (C15), esadecanoici (C16), eptadecanoici (C17) e ottadecanoici (C18), che sono i principali costituenti lipidici delle piante superiori (Amblés et al., 1994). L'elevata concentrazione di acidi dodecanoici (C12), tridecanoici (C13) e miristici, nonché di acidi pentadecanoici (C15) ramificati (iso/anteiso) e di acidi eptadecanoici (C17), suggerisce un elevato input di composti di natura

microbica (Spaccini et al., 2013). Il contenuto totale di FAME è del 68.5 % in PAS, 59% in CAF e di 40.4 % in CAR. La maggior parte dei FAME in PAS e CAF è rappresentato da omologhi saturi e insaturi di acidi grassi esa- e octadecanoici che sono composti ubiquitari della sostanza organica naturale, mentre in CAR questi acidi grassi FAME costituiscono solo il 6.4% del totale.

L'alto contenuto di monomeri C18 insaturi come composti principali suggerisce invece un prevalente apporto di lipidi provenienti da piante, come d'altronde è implicito per estratti da compost interamente vegetale. Questa osservazione è supportata anche dalla grande quantità in questi due estratti di alcani e alcoli i cui valori sono riportati in tabella 10, che potrebbero essere generati dalla degradazione delle cere vegetali (Spaccini and Piccolo, 2009). Differenze negli estratti sono state trovate anche per il contenuto di carboidrati e composti di natura azotata.

In particolare i carboidrati sono stati identificati in quantità maggiore in CAF (23.2%) rispetto agli estratti di CAR (17.4%) e PAS (4%). Infine, sono stati identificati composti appartenenti alla classe degli steroli derivanti da cere e cutine vegetali.

Il contenuto e la distribuzione delle molecole organiche maggiormente rappresentative e presenti nelle tre tipologie di estratti sono in linea con i risultati ottenuti dagli spettri ¹³C-CP-MAS-MNR. Quest'ultima tecnica fornisce un contributo aggiuntivo alla caratterizzazione degli estratti in esame in quanto permette di ottenere una distribuzione dei carboni presenti all'interno di campioni solidi e ne fornisce una valutazione semi quantitativa attraverso l'integrazione delle aree dei segnali presenti nello spettro NMR. Queste misure e confronti consentono di acquisire informazioni sulla struttura e l'origine dei composti presenti negli estratti (Al-Faiyz, 2017).

Ciascuno spettro NMR è stato diviso in sei intervalli di spostamento chimico: 0-45 ppm per i carboni alchilici (Alkyl-C), 45-60 ppm per i carboni metossilici (Methoxyl-C), 60-110 ppm per i carboni idrossialchilici (O-alkyl-C), 110-145 ppm per i carboni aromatici (Aromatic-C), 145-160 ppm per i carboni fenolici (Phenol-C), 160-190 ppm per i carboni carbossilici (Carboxyl-C) (Spaccini et al., 2019).

Gli spettri ^{13}C -CP-MAS-NMR sono mostrati in figura 17, mentre la distribuzione delle aree in base ai diversi segnali è riportata in tabella 12.

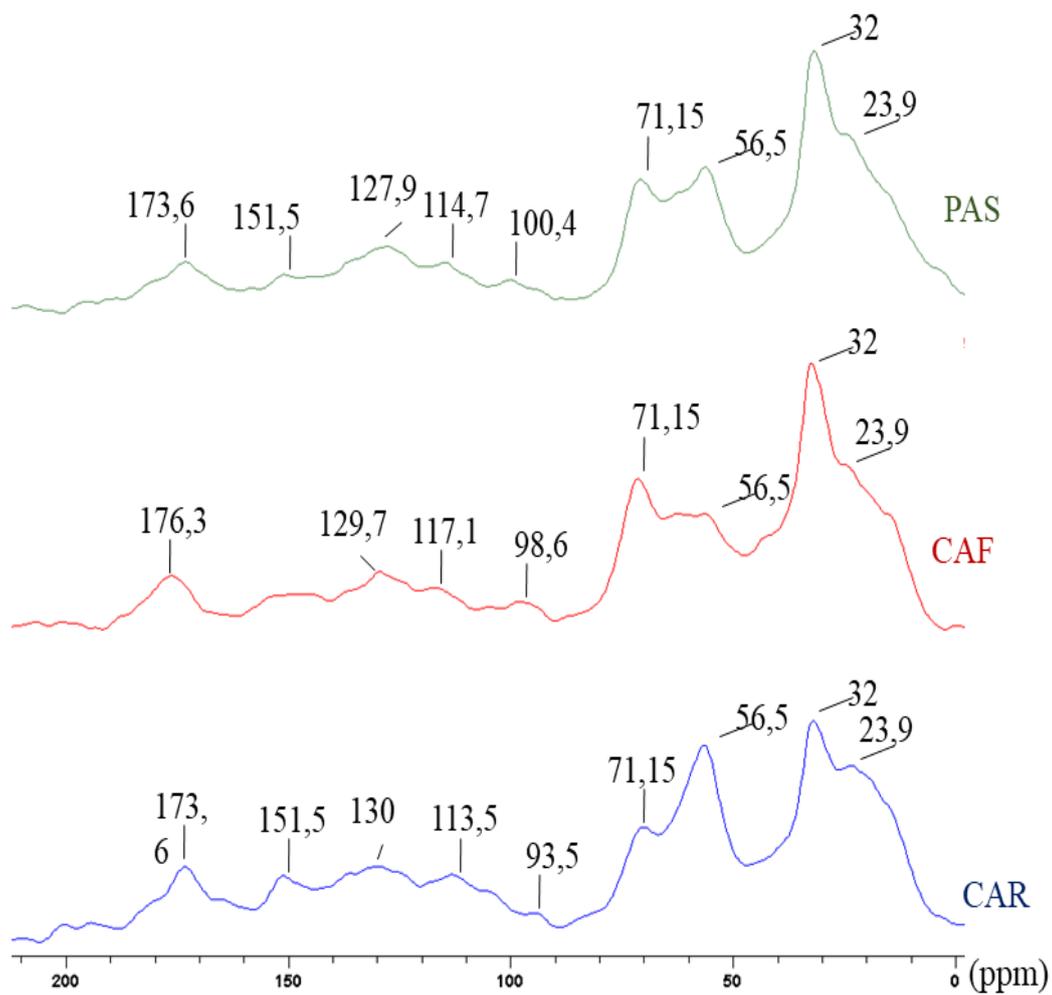


Figura 17: Spettri ^{13}C -CPMAS NMR di estratti in etanolo (70%) da compost da carciofo (blu), caffè (rosso) e pastazzo di limoni (verde)

Tabella 12: Distribuzione in percentuale relativa di carboni in spettri ^{13}C -CPMAS-NMR di estratti in etanolo (70%) da compost da carciofo (CAR), caffè (CAF) e pastazzo di limoni (PAS)

	ppm						HB/BI	LR	A/AO	ARM
	190-160 (Carboxyl-C)	160-145 (Phenol-C)	145-110 (AromaticC)	110-60 (O-alkyl-C)	60-45 (Methoxyl-C)	45-0 (Alkyl-C)				
CAR	6.6	4.4	9.4	14.5	20.6	44.5	3.7	4.7	3.1	12.0
CAF	7.6	4.0	10.9	20.9	9.7	46.8	2.5	2.4	2.2	14.2
PAS	7.7	3.9	13.2	17.3	12.4	45.6	3.0	3.2	2.6	13.3

Indice di idrofobicità (HB/BI): $[(0-45) + (45-60) + (110-145) + (145-160)] / [(60-110) + (160-190)]$

Rapporto alchilico/idrossialchilico (A/AO): $[(0-45) / (60-110)]$

Rapporto ligninico (LR): $[(45-60) / (145-160)]$

Indice di aromaticità (ARM) = $[(112-163) / (0-190)]$

Dalla valutazione dei tre spettri NMR si evince una prevalenza di segnali nella regione dei carboni alchilici. In particolare a 30 ppm si osserva un intenso segnale attribuibile ai CH_2 in lunghe catene alchiliche (Zhang et al., 2019). A 56 ppm ricade il segnale dei gruppi metossilici della lignina (Savy et al., 2017).

Nell'intervallo tra 60 e 110 ppm si evidenziano i segnali dei gruppi idrossi-alchilici di mono- e polisaccaridi (Spaccini and Piccolo, 2009) che sono i principali costituenti delle pareti cellulari e delle catene laterali della lignina (Savy et al., 2017). In particolare, i segnali tra 90 e 110 ppm sono collegati ai carboni anomerici degli zuccheri. Come si osserva dalla tabella 12, l'estratto etanolico da compost CAF mostrava la più alta percentuale di segnali legati a zuccheri ed in accordo con i risultati ottenuti con la pirolisi. Nella regione tra 110 e 160 ppm risuonano i carboni di composti aromatici e fenolici (Savy et al., 2017). In particolare, il segnale a 153 ppm è meno intenso per il campione PAS che per quelli CAR e CAF ed è associabile ai carboni delle sostituzioni guaiaciliche e siringiliche della lignina (Spaccini and Piccolo, 2008).

Nella regione tra 160 e 190 ppm vi è la risonanza dei carboni carbossilici ed esterei ed alcuni carboni ammidici maggiormente deschermati (Robert et al., 1998). In particolare, i segnali

di risonanza dei legami di tipo estere sono registrati nella regione tra 163 e 170 ppm (Wooten, 1995).

Gli spettri ^{13}C -CP-MAS-NMR permettono poi di calcolare degli indici strutturali (tabella 12) quali: 1) indice alchilico/idrossi-alchilico (A/OA), 2) indice di aromaticità (ARM), 3) indice di idrofobicità (HB/HI), 4) rapporto ligninico (LR). Gli indici A/OA, HB/HI and LR sono collegati alla stabilità biochimica delle sostanza organica umificata. L'accumulo di composti idrofobici è indice di un più elevato processo di stabilizzazione della materia organica (Spaccini and Piccolo, 2007), mentre il rapporto LR indica l'abbondanza di strutture di ligniniche. Infatti, il maggior valore di LR nel campione CAR (4.7) rispetto a quello per PAS (3.2) e poi per CAF (2.4) indica una progressiva diminuzione nell'estratto etanolo di composti ligninici non frammentati.

L'analisi degli indici HI e A/OA permette, rispettivamente, di avere indicazioni sul grado di umificazione e sulla stabilità biochimica dei composti estratti in etanolo. Infatti, ambedue gli indici suggeriscono una relazione tra un alto contenuto di composti idrofobici e la stabilità degli stessi alla degradazione microbica (Piccolo et al., 2018). I risultati riportati in tabella 12 mostrano per CAR valori maggiori per l'indice idrofobico e alchilico, i cui valori sono, rispettivamente, 3.7 e 4.7. Seguono poi con valori più bassi per PAS (3 per HI e 2.6 per A/OA) e per CAF (2.5 per HI e 2.2 per A/OA).

Gli indici di aromaticità riportati in tabella 12, calcolati come riportato da *Malcom* (1990) mostrano una maggiore quantità di componente aromatica nel campione CAF (14.2) seguita da PAS (13.3) e CAR (12). La natura della componente aromatica è attribuita non solo a derivati della lignina, ma anche alla degradazione di cutine, suberine, ed a composti di origine fenolica e/o polifenolica o, in minima quantità, da residui amminoacidici di tipo aromatico (Spaccini and Piccolo, 2008).

4.2.2 Contenuto di fenoli totali e attività antiossidante

Numerosi lavori scientifici prevedono l'estrazione di composti fenolici da biomasse vegetali in quanto ritenuti un ottimo indicatore dell'attività antiossidante del materiale analizzato. Infatti, per gli scarti della lavorazione di limoni le molecole antiossidanti si presentano diversamente concentrate a livello dei tessuti del frutto (albedo, flavedo) (Di Donato et al., 2018), mentre per gli scarti della lavorazione di carciofo, la maggior parte dei composti fenolici (costituiti da acido idrossi-cinnamico e polifenoli) sono contenuti all'interno delle parti esterne delle infiorescenze, steli e foglie, che costituiscono dal 65 al 80 % degli scarti della produzione. Questi composti sono largamente utilizzati nel settore medico e nutraceutico in quanto impiegati nel trattamento di diverse patologie epatiche e digestive, ma utilizzati anche per funzionalizzare gli alimenti. Infatti, alimenti quali succo di pomodoro, zuppa di pollo e pasta sono funzionalizzati con estratti fenolici da scarti di carciofo perché conferiscono una attività antiossidante maggiore degli alimenti controllo (Larossa et al., 2002; Llorach et al., 2005; Pasqualone et al., 2017).

Gli scarti di lavorazione del caffè, in particolare i fondi del caffè esausto, sono largamente studiati non solo perché mostrano un elevato contenuto di composti fenolici antiossidanti (quali acido idrossi-cinnamico, acido clorogenico, acido caffeico, acido ferulico e acido vanillico) (Gómez-Ruiz, Leake, & Ames, 2007), ma anche perché il loro riciclo riduce gli effetti negativi dovuti all'emissione di gas serra durante la loro mineralizzazione microbica (Zuorro, 2015).

Nel settore medico, i polisaccaridi, diterpeni e polifenoli ad alto valore antiossidante (Barbosa et al., 2014; Zuorro and Lavecchia, 2011; Passos and Coimbra, 2013) estratti da biomasse vegetali sono impiegati per ridurre il rischio di malattie degenerative collegate allo stress ossidativo (Vetrani et al., 2013). Poiché la sintesi industriale di molecole antiossidanti come i composti fenolici è un processo molto complesso e costoso, la loro estrazione da biomasse vegetali o compostate è da considerarsi una strategia alternativa, nell'ottica di una economia circolare, per riutilizzare tali scarti e recuperare dai composti un alto valore aggiunto. Inoltre è stato osservato che

la presenza di composti fenolici derivati da mono- e poli-idrossilati del benzene nelle SU conferisce un'attività antiossidante (Aeschbacher et al., 2012). In particolare, i maggiori effetti antiossidanti sono dati da tannini, che costituiscono il quarto gruppo di composti più importanti nei sistemi biochimici delle piante dopo la cellulosa l'emicellulosa e la lignina (Fahramand et al., 2014).

Questi composti sono presenti nelle sostanze umiche, le quali, infatti, quando applicate sulle piante ne migliorano il sistema antiossidante in seguito all'esposizione a stress (Canellas et al., 2008; Vasconcelos et al., 2009). Pertanto, è possibile ipotizzare che molecole ad attività antiossidante estratte da materiali compostati possono essere impiegate per regolare positivamente il metabolismo antiossidante nelle piante, e migliorarne la crescita.

Poiché in letteratura non vi sono molte informazioni in merito alla potenziale attività antiossidante di estratti in etanolo da materiali compostati, è stato condotto uno studio di correlazione tra il contenuto fenolico di questi scarti e la loro attività antiossidante. Il contenuto di fenoli totali negli estratti etanolic (TPC) è mostrato in figura 18 ed è stato calcolato come milligrammi equivalenti di acido gallico per grammo di campione analizzato. Le lettere maiuscole riportate sull'istogramma della figura indicano la significatività statistica delle differenze calcolata mediante test di Tukey ($p < 0.05$). Gli estratti da compost da pastazzo e da carciofo hanno mostrato un maggiore contenuto fenolico, fornendo valori di TPC pari, rispettivamente, a 4.3 e 3.7 mg equivalenti di acido gallico / g, mentre il contenuto fenolico degli estratti da compost da caffè è di 2.9 mg equivalenti di acido gallico / g (figura 18). La mancanza di correlazione tra i risultati del Folin-Ciocalteu e quelli ^{13}C -CPMAS-NMR per CAR si può spiegare in quanto nel caso della prima tipologia di saggio si parla di valori quantitativi assoluti mentre per l'analisi NMR ci si riferisce a dati solo semi-quantitativi riferiti ai valori dei rapporti di aree relative normalizzate.

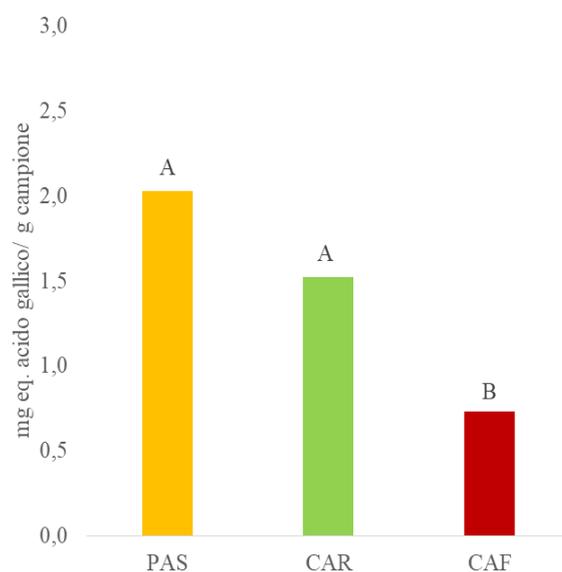


Figura 18: Risultati del saggio Folin-Ciocalteu condotto su estratti in etanolo (70%) da compost da pastazzo di limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF) riportati come contenuto fenolico totale (TPC). I valori sono espressi come milligrammi equivalenti di acido gallico su grammi di campione testato (mg eq.acido gallico/g campione). Le lettere maiuscole indicano le differenze significative calcolate mediante test di Tukey ($p < 0.05$)

I risultati dell'attività antiossidante degli estratti da compost di PAS, CAR, CAF sono riportati in figura 19. I valori sono: CAR $145 \pm 9 >$ CAF $121 \pm 7 >$ PAS 121 ± 4 mmol eq. Trolox/kg di campione. È da notare che non ci sono differenze di attività antiossidante tra gli estratti di PAS e CAF, mentre quella dell'estratto CAR è significativamente maggiore che per gli altri due estratti.

Il maggiore valore di TEAC in CAR può essere correlato all'elevata presenza di componenti fenolici e aromatici di origine non solo ligninica (Bhutto et al., 2018). Questo dato è in accordo con i risultati NMR per i quali CAR ha mostrato un contenuto percentuale di carbonio fenolico di 4.4 rispetto a 4.0 e 3.9 di PAS e CAF, rispettivamente.

Alti valori di attività antiossidante sono ascrivibili alla presenza di gruppi fenolici che fungono da elettroni-donatori o accettori sulla base del potenziale redox del sistema (Aeschbacher et al., 2012; Nikolaev et al., 2008). Valori maggiori di TEAC (tabella 13) in estratti da compost di carciofo fanno ipotizzare che materiale organico ligninico sia soggetto ad una lenta trasformazione e non solo contribuisca alla formazione dell'humus nel suolo, ma anche conferisca una spiccata proprietà antiossidante.

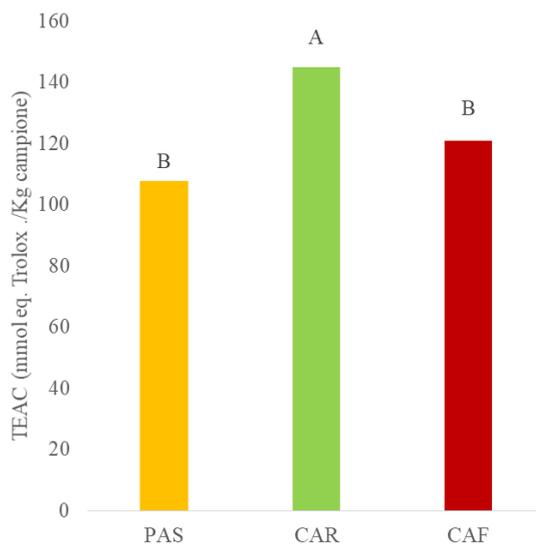


Figura 19: Risultati dell'attività antiossidante (TEAC), valutata mediante test ABTS, degli estratti in etanolo (70%) da compost da pastazzo di limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF). I valori sono espressi come millimoli equivalenti di Trolox su chilogrammi di campione (mmol eq. Trolox./kg campione). Le lettere maiuscole (A e B) indicano le differenze significative calcolate mediante test di Tukey ($p < 0.05$)

	TEAC	TPC
PAS	107.7 (± 4)	4.3 (± 0.3)
CAR	145 (± 9)	3.7 (± 0.1)
CAF	121 (± 7)	2.9 (± 0.5)

Tabella 13: Attività antiossidante (TEAC) e del contenuto di fenoli totali (TPC) degli estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF)

Poiché in letteratura non vi sono lavori che fanno riferimento alla valutazione dell'attività antiossidante di composti fenolici estratti in etanolo da biomasse compostate, come riferimento sono stati consultati i risultati di attività antiossidante di estratti ottenuti dalle stesse materie non compostate. Infatti diversi lavori discutono dei valori di attività antiossidante positivi per estratti da

scarti di biomasse vegetali (quali limone, carciofo e caffè) (Putnik et al., 2017; Jiménez-moreno et al., 2019; Gómez-Ruiz et al., 2007).

4.2.3 Test di germinazione

L'applicazione di compost come fertilizzante organico o delle sostanze umiche come biostimolanti è ormai accertato, ma non sono presenti studi che prevedano l'uso come biostimolanti di estratti in etanolo da biomasse compostate. Pertanto il test di germinazione condotto con semi di *Lepidium sativum* è stato effettuato al fine di valutare non solo l'attività antiossidante, ma anche l'assenza di fitotossicità degli estratti.

Il test di germinazione ed allungamento radicale è stato impiegato fin dal 1952 (Hunter, 1952) e permette di ottenere una buona riproducibilità dei risultati (Ratsch, 1983).

Questi test consentono di valutare l'eventuale tossicità di un campione misurando sia l'inibizione della germinazione sia l'allungamento radicale di semi germinati in condizioni controllate e confrontati con appositi controlli (in assenza dell'estratto).

Per il test di questa tesi sono stati utilizzati i semi di *Lepidium sativum*, una pianta erbacea diffusa in Italia, generalmente utilizzata per la determinazione della fitotossicità del compost (Nappi and Consiglio, 1986). L'esperimento è stato allestito in condizioni controllate come riportato in materiali e metodi. Sono state testate cinque concentrazioni (1-10-25-50-100 ppm) per ciascun estratto da compost da pastazzo di limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF) i cui risultati sono stati confrontati con trattamenti controllo effettuati con acqua deionizzata.

I risultati di ciascun test, riportati in tabella 15, mostrano i valori degli indici di germinazione (**IG**), germinazione relativa (**GR**) e lunghezza relativa (**LR**). Per i semi controllo (CT) i suddetti indici sono da considerarsi pari al 100%. I risultati IG per tutti i trattamenti hanno mostrato valori superiori al 50%, il che fa escludere l'effetto fitotossico degli estratti

(APHA;AWWA;WEF; 1995). In particolare, semi trattati con PAS alla concentrazione di 10 ppm mostravano un incremento del 37 % dei valori di LR e IG rispetto al controllo, mentre le concentrazioni di 25 e 50 ppm indicavano un aumento del 21% rispetto al controllo (tabella 15).

Analizzando l'effetto di CAR è possibile osservare che la concentrazione di 1 ppm mostra il minore valore di IG (68%), il quale aumenta rispettivamente a 102% e 113% nei trattamenti con 10 e 25 ppm (tabella 15). A partire dalla concentrazione di 50 ppm si ha un riduzione dei valori di IG e LR che diventano ancora più bassi nei trattamenti con 100 ppm di estratto (tabella 14).

I risultati di CAR mostrano un aumento del valore LR collegato ad un aumento delle concentrazioni testate (tabella 14) fino alla concentrazione di 50 ppm, infatti i valori sono: 77% per 1 ppm, 107% per 10 ppm, 112% per 25 ppm e 123% per 50 ppm. A 100 ppm si è osservato una riduzione di ambedue i valori di LR e IG, sia rispetto al controllo sia alle altre concentrazioni testate (tabella 14). Malgrado le variazioni di valori nei risultati degli estratti da CAR, le differenze osservate non sono statisticamente significative. Dai risultati riportati in figura 20 e 21 per CAR e PAS si osserva che le concentrazioni rispettivamente di 25 e 10 ppm di estratto inducono una maggiore crescita della radice. È possibile affermare che l'applicazione di concentrazioni alte di estratto esercitano un effetto inibitorio sulla crescita radicale, mentre in seguito all'uso di concentrazioni intermedie (10 e 25 ppm) si osservano degli effetti positivi significativi.

Questo risultato può essere collegato a lavori nei quali è stato dimostrato che l'effetto delle sostanze umiche, seppure dose dipendente, permette di ottenere risultati positivi in un intervallo di concentrazioni basse (Chen and Aviad, 1990).

Tabella 14: Saggio di fitotossicità acuta condotto con semi di *Lepidium sativum* utilizzando estratti in etanolo (70%) da compost di pastazzo di limoni (PAS), carciofo (CAR) e caffè (CAF). I valori rappresentano le percentuali (%) riferite al controllo espresso come 100 %

Campioni	Concentrazione testata (ppm)	GR	LR	IG
CAR	1	60	68	68
CAR	10	100	102	102
CAR	25	100	113*	113
CAR	50	100	105	105
CAR	100	100	93	93
PAS	1	100	117	117
PAS	10	100	137*	137*
PAS	25	100	121	121
PAS	50	100	121	121
PAS	100	96	117	113
CAF	1	100	77	88
CAF	10	118	107	73
CAF	25	121	112	83
CAF	50	117	123	86
CAF	100	100	99	70

* indica differenze significative rispetto al controllo

GR= indice di germinazione relativa, LR= lunghezza relativa, IG= indice di germinazione.

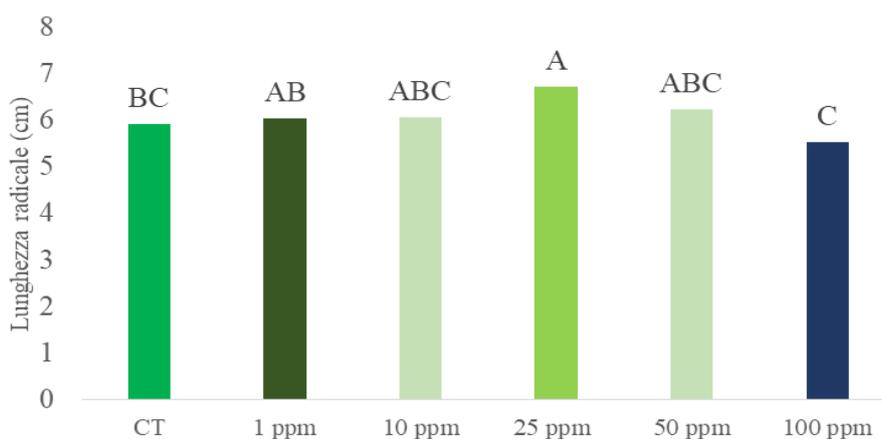


Figura 20: Media dei risultati del test di germinazione condotto su semi di *Lepidium sativum* trattati con estratti in etanolo (70%) da compost da carciofo. Le lettere sugli istogrammi indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

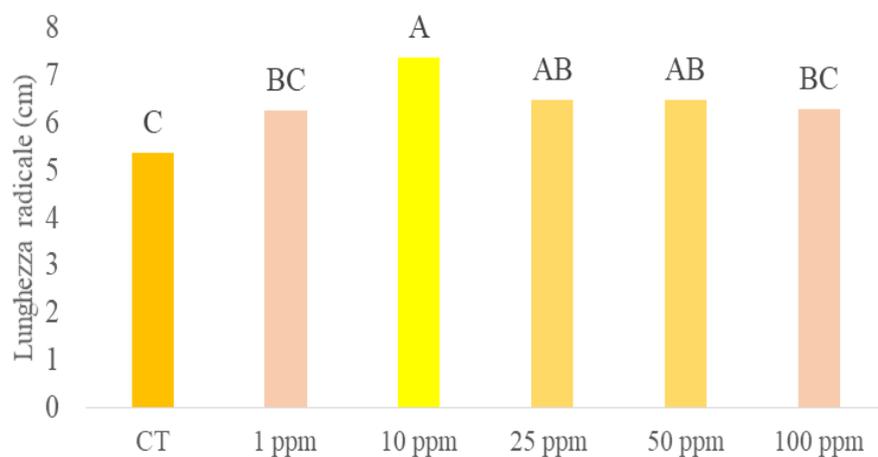


Figura 21: Media dei risultati del test di germinazione condotto su semi di *Lepidium sativum* trattati con estratti in etanolo (70%) da compost da pastazzo di limoni. Le lettere sugli istogrammi indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

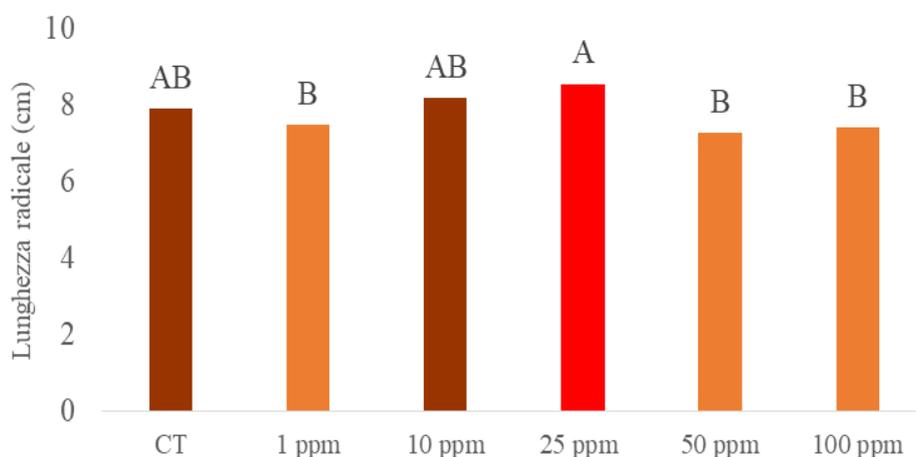


Figura 22: Media dei risultati del test di germinazione condotto su semi di *Lepidium sativum* trattati con estratti in etanolo (70%) da compost da caffè. Le lettere sugli istogrammi indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

4.2.4 Prove in vaso con estratti in etanolo mediante applicazione fogliare

In base ai risultati ottenuti dal test di germinazione, sono stati scelti gli estratti in etanolo da compost da pastazzo e da carciofo per essere testati, mediante applicazione fogliare, su piante di lattuga. Le piante sono state cresciute in serra per l'intera durata dell'esperimento terminato dopo 60 giorni dall'invasamento della pianta. Al termine del test le piante sono state campionate ed è stato valutato il peso secco della biomassa aerea, il contenuto di clorofilla A, B e totale ed infine eventuali variazioni nel profilo metabolico primario mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$.

I risultati di biomassa e di clorofilla (Chl) espressi come mg di Chl su grammi di campione sono riportati rispettivamente in figura 23 e 24 per gli estratti da carciofo, ed in figura 25 e 26 per gli estratti da pastazzo. Le differenze significative, valutate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$) sono indicate con le lettere maiuscole poste in cima agli istogrammi. Il grafico ad istogrammi in figura 23 mostra i dati dei valori medi di biomassa aerea secca di piante di lattuga trattate con CAR alle concentrazioni 0, 1, 10, 25, 50 e 100 ppm. Si osserva, anche facendo riferimento alle barre di errore, che non ci sono differenze significative tra i diversi trattamenti se paragonati al controllo.

Anche analizzando il contenuto di clorofilla A, B e totale (figura 24) non si evidenziano differenze significative tra il controllo e le varie concentrazioni testate.

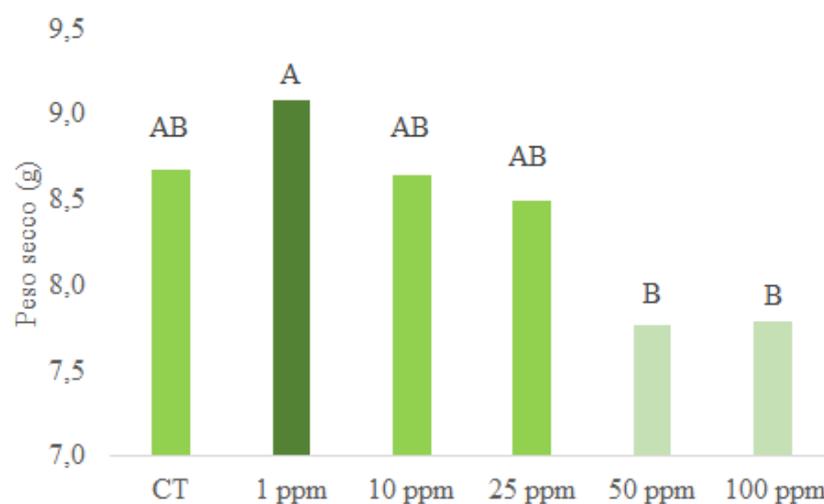


Figura 23: Peso secco (g) di biomassa fogliare secca di piante di lattuga sotto trattamento fogliare con estratti da compost da carciofo alle concentrazioni di 1-10-25-50 e 100 ppm. Le piante controllo (CT) sono state trattate con acqua. Le lettere sugli istogrammi indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

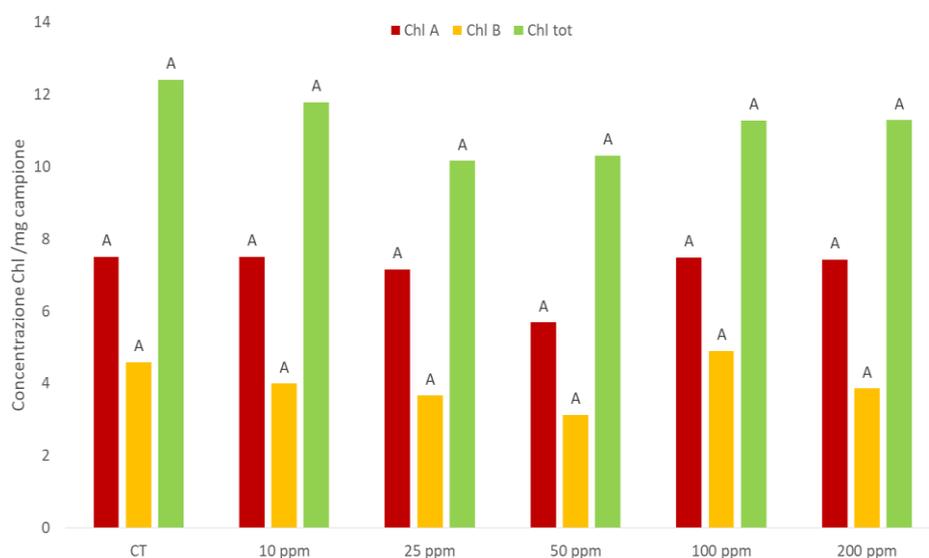


Figura 24: Contenuto di clorofilla (Chl) A, B e totale in piante di lattuga sotto trattamento fogliare con estratti in etanolo da compost da carciofo alle concentrazioni di 1-10-25-50-100 ppm, mediante applicazione fogliare. Le piante controllo (CT) sono state spruzzate con acqua. Le lettere sugli istogrammi indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

Così come per i trattamenti con CAR, anche quelli condotti utilizzando gli estratti da compost di PAS alle concentrazioni di 0, 1, 10, 25, 50 e 100 ppm non si evidenziano differenze statisticamente significative rispetto al controllo né in termini di biomassa aerea (figura 25) secca né come contenuto di Chl A, B e totale (figura 26).

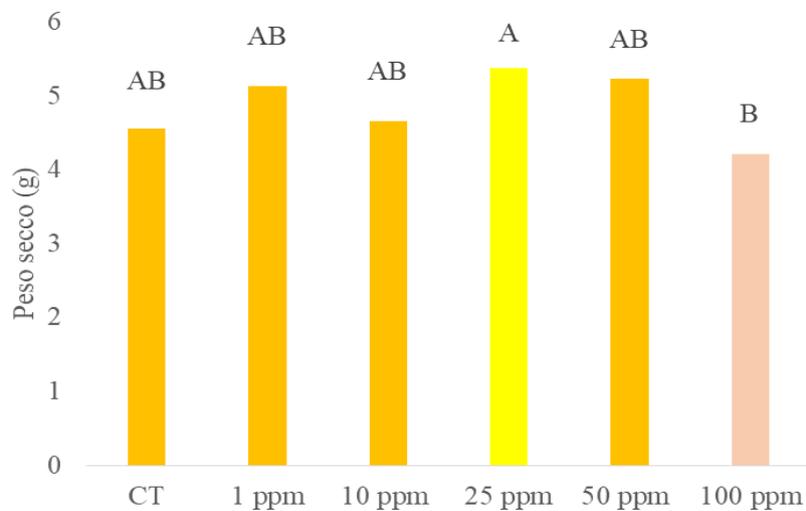


Figura 25: Peso secco (g) di biomassa fogliare secca di piante di lattuga sotto trattamento fogliare con estratti da compost da pastazzo di limoni alle concentrazioni di 1-10-25-50 e 100 ppm. Le piante controllo (CT) sono state trattate con acqua. Le lettere sugli istogrammi indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

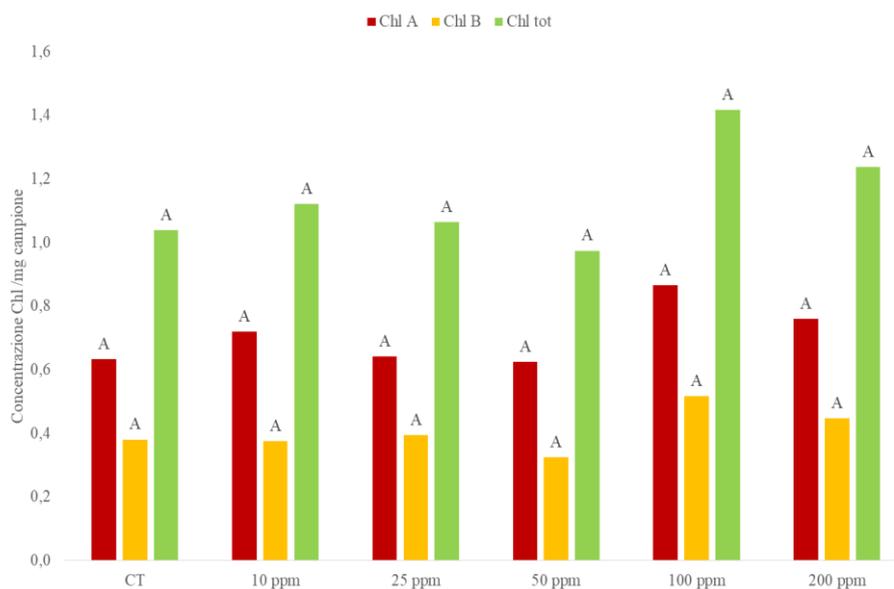


Figura 26: Contenuto di clorofilla (Chl) A, B e totale in piante di lattuga trattate con estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni alle concentrazioni di 1-10-25-50-100 ppm, mediante applicazione fogliare. Le piante controllo (CT) sono state spruzzate con acqua. Le lettere sugli istogrammi indicano le differenze significative calcolate mediante test statistico LSD ($p < 0.05$)

A differenza di quanto preannunciato con i test di fitotossicità con *Lepidium sativum*, in merito ad una stimolazione della crescita radicale in seguito ai trattamenti con gli estratti, i test in vaso su lattuga non hanno mostrato alcun effetto significativamente diverso rispetto al controllo.

Malgrado alcuni lavori di letteratura riportino l'effetto biostimolante su pianta in seguito ad applicazione fogliare di formulati biostimolanti quali: acido salicilico e jasmonico (Ghassemi-Golezani and Farhangi-Abri, 2018), batteri promotori della crescita (Olivares et al., 2015), formulati contenenti potassio (Saa et al., 2015), acidi umici (Abdelgawad et al., 2018; Young and Chen 1997; Shahein et al., 2015), l'applicazione mediante la suddetta modalità utilizzata per estratti in etanolo da biomasse compostate non riporta gli stessi effetti.

Dati gli acclarati effetti biostimolanti in piante trattate con compost e SU applicate al suolo (Calvo et al., 2014; Canellas et al., 2015; Hernandez et al., 2014), ed essendo i risultati di caratterizzazione degli estratti non eccessivamente diversi da questi materiali, possiamo ipotizzare che il motivo per cui non siano stati registrati effetti biostimolanti degli estratti sia collegato alla

modalità di applicazione. Saranno pertanto, condotti ulteriori futuri studi che prevedano l'impiego degli estratti mediante applicazione al suolo e la successiva valutazione dell'effetto sulla pianta.

4.2.5 Analisi metaboliti primari mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ degli estratti in etanolo

Mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ è stata condotta l'analisi del metaboloma primario delle piante di lattuga trattate con gli estratti in etanolo. In figura 27 e 28 sono riportati rispettivamente gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei diversi trattamenti condotti con estratti da compost di carciofo e pastazzo alle seguenti concentrazioni: controllo (CT), 1 ppm (A), 10 ppm (B), 25 ppm (C), 50 ppm (D) e 100 ppm (E). Il valore di 0 ppm riportato nello spettro è da assegnare allo standard interno utilizzato per l'analisi (sale di sodio dell'acido 3-(trimetilsilil) = TMSPA). L'analisi è stata condotta utilizzando quattro repliche biologiche e due repliche tecniche per ciascun trattamento per un totale di 48 analisi per materiale testato. Al fine di escludere variazioni a livello del profilo metabolico dovute alla diversa età delle foglie, l'estrazione è stata condotta utilizzando la terzultima foglia di ciascuna pianta campionata. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'analisi metabolomica può essere diviso in tre macro regioni, la prima da 0 a 3 ppm che riguarda prevalentemente la regione amminoacidica, la seconda da 3 a 5.7 ppm che contiene i segnali appartenenti alla maggior parte degli zuccheri ed infine la regione da 6 a 8 ppm che riguarda principalmente i segnali appartenenti a composti aromatici (Kim and Verpoorte, 2010).

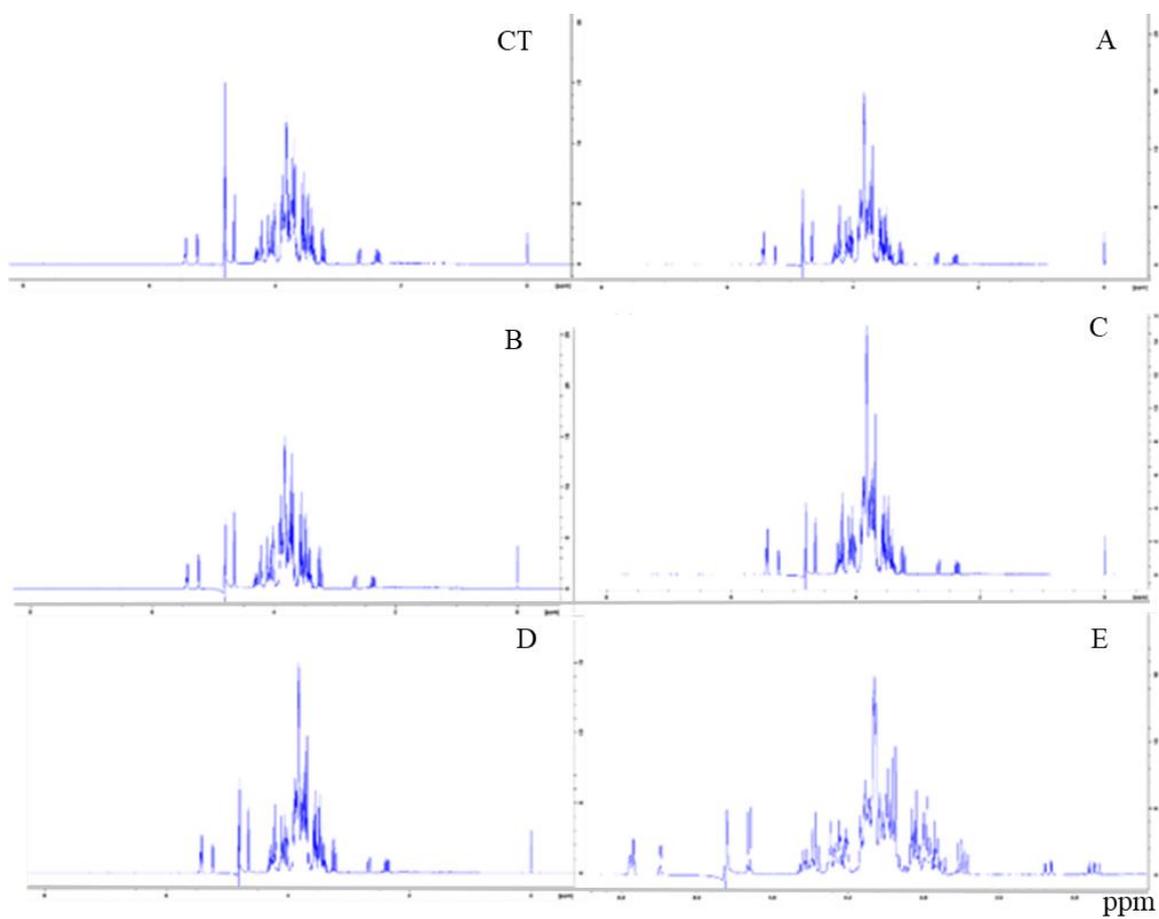


Figura 27: Spettri $^1\text{H-NMR}$ di piante di lattuga trattate con estratti in etanolo da compost da carciofo (CAR) alle concentrazioni di: 1 ppm (A), 10 ppm (B), 25 ppm (C), 50 ppm (D) e 100 ppm (E). Il controllo (CT) ha previsto l'applicazione di acqua

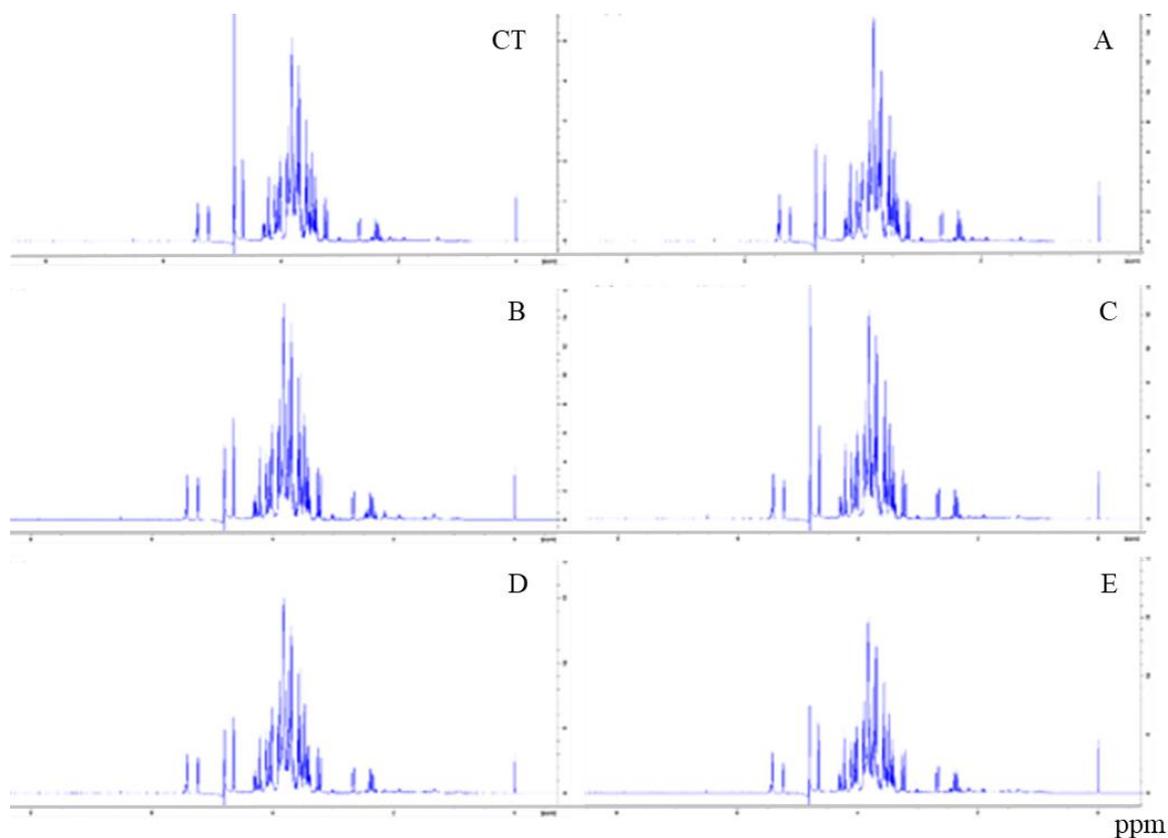


Figura 28: Spettri $^1\text{H-NMR}$ di piante di lattuga trattate con estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni (PAS) alle concentrazioni di: 1 ppm (A), 10 ppm (B), 25 ppm (C), 50 ppm (D) e 100 ppm (E). Il controllo (CT) ha previsto l'applicazione di acqua

Dall'analisi degli spettri non è stato possibile osservare grandi variazioni nell'intensità dei segnali.

I diversi set di dati sono stati valutati mediante l'analisi delle componenti principali (PCA).

La PCA rappresenta un metodo analitico utilizzato nell'ambito della statistica multivariata che permette una semplificazione dei dati di origine, riducendo l'elevato numero di variabili. Il risultato dell'analisi PCA consiste in un *plot* in cui i diversi simboli evidenziano le differenze o le similarità esistenti tra i campioni, dovute alle variabili (nel nostro caso i metaboliti) responsabili delle suddette variazioni. Non ottenendo una separazione dei dati analizzando insieme tutti i trattamenti, sia per CAR che PAS, sono state condotte PCA di due coppie di trattamenti alla volta.

In particolare, è stata valutata la separazione delle variabili comparando il controllo a ciascuna delle cinque concentrazioni testate.

Non tutti i confronti hanno mostrato una netta separazione delle variabili pertanto si è scelto di analizzare e commentare le PCA che hanno mostrato una maggiore separazione delle variabili, confermata anche dalla analisi statistica condotta mediante il test ANOVA ($p < 0.05$). L'identificazione dei metaboliti è stata possibile grazie all'uso di riferimenti bibliografici (Sobolev et al., 2005).

I risultati dell'esperimento condotto con estratti in etanolo da compost da carciofo ha permesso l'identificazione di 7 metaboliti (tabella 15). In particolare sono stati identificati: per la classe dei carboidrati il β -D-fructofuranosio, il saccariosio e l'inulina; per la classe degli acidi organici è stato identificato l'acido malico; tra gli aminoacidi è stato possibile identificare l'asparagina, la glutammina, e la colina.

	¹ H (ppm)		¹ H (ppm)
<i>Carboidrati</i>		<i>Coline</i>	
β -D-fructofuranosio	4.1	Colina	3.22
	3.86	<i>Acidi organici</i>	
Saccariosio	5.42	Acido malico	4.3
	3.86	<i>Aminoacidi</i>	
	3.82	Asparagina (Asn)	4.02
Inulina	5.46	Glutammina (Gln)	3.78
	4.26		
	4.22		

Tabella 15: Metaboliti identificati mediante spettroscopia ¹H-NMR in piante di lattuga trattate con estratti in etanolo da compost da carciofo

Le differenze valutate mediante PCA, tra i vari trattamenti hanno permesso di evidenziare differenze significative dovute solo ad una parte dei metaboliti identificati. In particolare, la PCA

del confronto tra il controllo ed il trattamento A (1ppm) (figura 29) permette di spiegare il 19.3% della variabilità totale, mostrando una separazione dei trattamenti lungo la PC3 e la PC5.

L'ANOVA ($p < 0.05$) ha permesso di evidenziare una differenza statisticamente significativa dovuta soprattutto a metaboliti di saccarosio e inulina maggiormente presenti nel trattamento A, mentre l'amminoacido asparagina risulta più concentrato in piante dell'esperimento CT.

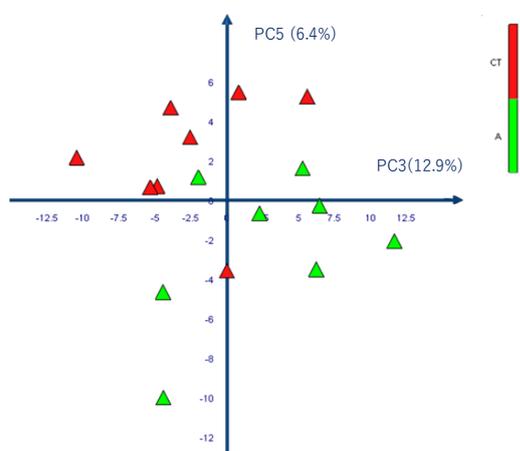


Figura 29: Score plot della PCA di dati da spettri $^1\text{H-NMR}$ di estratti da piante di lattuga controllo (CT) e trattate con estratti in etanolo da compost da carciofo alla concentrazione di 1 ppm (A)

Dalla PCA tra il controllo ed il trattamento a 25 ppm (C) si nota una separazione delle variabili principalmente lungo la PC4, che permette di spiegare solo il 9.20 % della variabilità totale (figura 30). Questa separazione è dovuta principalmente ai metaboliti β -D-fructofuranosio, inulina, acido malico e glutammina maggiormente presenti in piante trattate con 25 ppm di estratto (C).

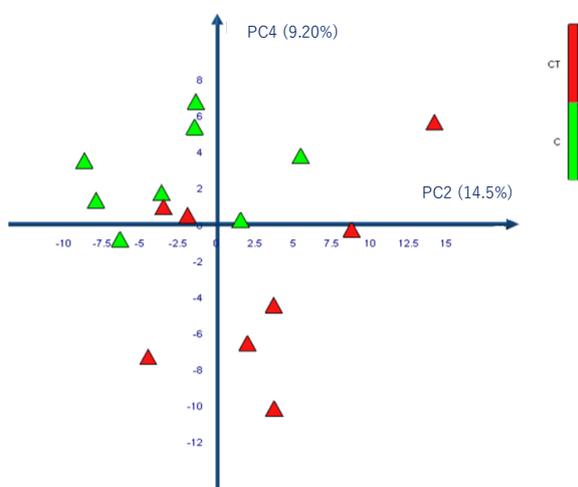


Figura 30: Score plot della PCA basata sull'analisi $^1\text{H-NMR}$ di piante di lattuga controllo (CT) e piante trattate con estratti in etanolo da compost da carciofo alla concentrazione di 25 ppm (C)

La PCA per piante controllo e trattate con 50 ppm (D) mostra una separazione delle variabili soprattutto lungo la PC2 fornendo una spiegazione del 15.3% della variabilità totale (figura 31).

Questa separazione è dovuta soprattutto ad una maggiore concentrazione di inulina, saccarosio, β -D-fructofuranosio, acido fumarico e glutammina nel trattamento D, mentre i valori di colina sono statisticamente maggiori a livello delle piante controllo.

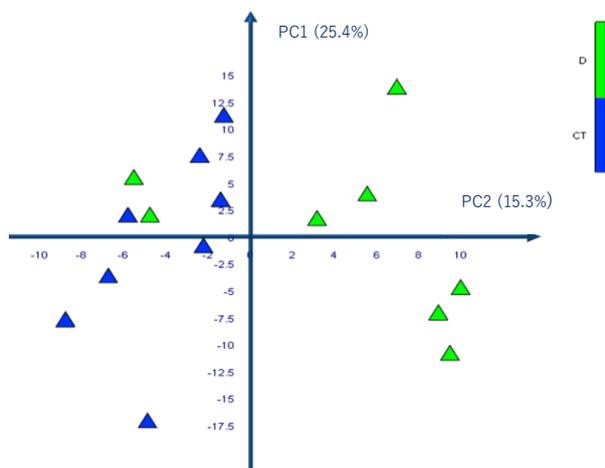


Figura 31: Score plot della PCA basata sull'analisi $^1\text{H-NMR}$ di piante di lattuga controllo (CT) e piante trattate con estratti in etanolo da compost da carciofo alla concentrazione di 50 ppm (D)

La PCA del controllo e del trattamento a 100 ppm (E) (figura 32) mostra una separazione delle variabili soprattutto lungo la PC4, che spiega solo l'8.64% della variabilità totale.

La separazione è dovuta soprattutto ai metaboliti inulina e saccarosio maggiormente concentrati nelle piante trattate con 100 ppm di estratto rispetto al controllo.

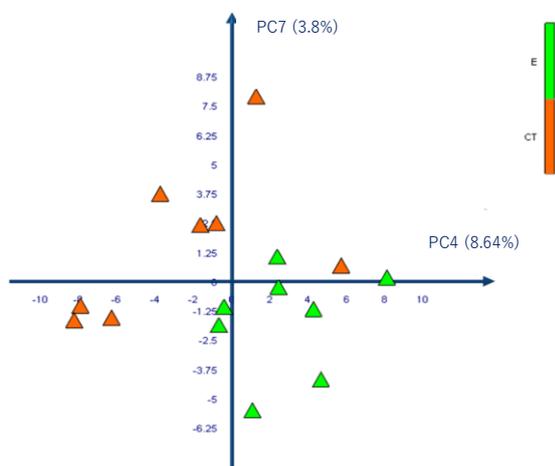


Figura 32: Score plot della PCA basata sull'analisi $^1\text{H-NMR}$ di piante di lattuga controllo (CT) e piante trattate con estratti in etanolo da compost da carciofo alla concentrazione di 100 ppm (E)

Non sono state osservate differenze significative nel contenuto di tutti gli altri metaboliti primari fisiologicamente presenti in piante di lattuga in seguito all'applicazione fogliare di estratti in etanolo da compost da carciofo.

Si può pertanto concludere che la maggior parte della variazione sperimentale riguarda il metabolismo degli zuccheri, quali β -D-fruttofuranosio, saccarosio ed inulina, in piante trattate con 25 – 50 e 100 ppm di estratto. L'inulina è un oligosaccaride formato da una unità di glucosio e da due a quattro unità di fruttosio, ed è collegato ad una serie di benefici per la salute umana in quanto stimola l'attività di bifido batteri intestinali. Esistono due forme di questo oligosaccaride (I e II), ma a causa della sovrapposizione nella regione spettrale NMR non è stato possibile separare le due forme. Vi è una scarsità di informazioni in merito ai livelli di inulina in lattuga, ma sulla base dei presenti risultati è possibile affermare che rappresenta un biomarcatore di un intenso catabolismo di mono- e di-saccaridi.

Come per i trattamenti con CAR, gli spettri $^1\text{H-NMR}$ di piante di lattuga trattate con PAS non mostrano grandi differenze con il controllo nell'intensità dei segnali (figura 28). Anche in questo caso, i dati sono stati analizzati via PCA mediante un confronto del trattamento controllo con ciascuna delle concentrazioni testate. I risultati ottenuti dall'analisi PCA sono stati poi sottoposti a test ANOVA per valutare differenze statisticamente significative tra le variabili analizzate.

I risultati di quest'analisi hanno permesso di identificare solo 4 metaboliti che hanno mostrato una variazione nella concentrazione nei diversi trattamenti rispetto al controllo.

I metaboliti identificati in questo esperimento sono riportati in tabella 16.

	¹ H (ppm)
<i>Carboidrati</i>	
Inulina	5.46
Saccarosio	4.22
<i>Amminoacidi</i>	
Alanina (Ala)	4.02
<i>Acidi organici</i>	
Acido aspartico	2.78

Tabella 16: Metaboliti identificati mediante spettroscopia ¹H-NMR in piante di lattuga trattate con estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni

Non sono state osservate separazioni delle variabili lungo le PCA dal confronto tra il trattamento controllo e le concentrazioni di 1 - 10 - 25 - 50 ppm PAS. L'unica separazione delle variabili è stata osservata dall'analisi PCA tra i trattamenti controllo e 100 ppm di estratto da pastazzo. Le variabili relative ai due trattamenti si separano prevalentemente lungo la PC4 (8%) e la PC5 (6.6%), le quali permettono di spiegare tuttavia una variabilità totale solo del 14.6% (figura 33).

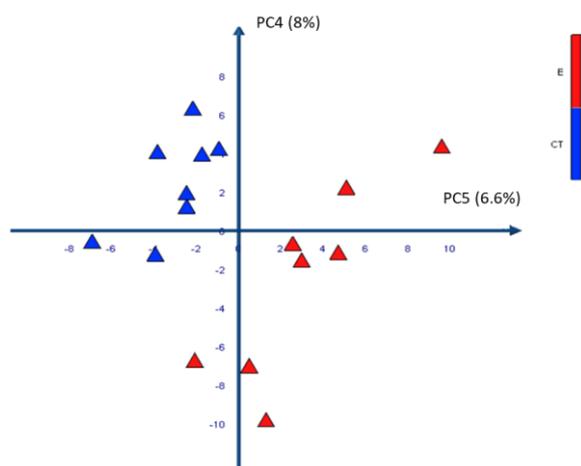


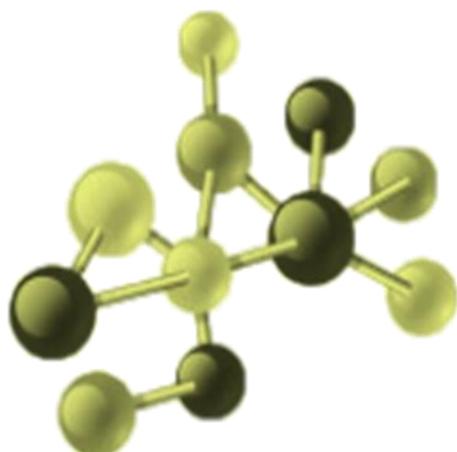
Figura 33: Score plot della PCA basata sull'analisi ¹H-NMR di piante di lattuga controllo (CT) e piante trattate con estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni alla concentrazione di 100 ppm (E)

I segnali che hanno mostrato una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) appartengono a metaboliti quali: inulina (5.43 ppm), saccarosio (4.22 ppm), acido aspartico (2.78 ppm), alanina (1.50 ppm) e sono; maggiormente concentrati nelle piante trattate con 100 ppm di estratto.

Data la scarsità di informazioni in letteratura in merito alle variazioni che possono avvenire a livello del metabolismo di lattuga e data anche la poca significatività dei risultati ottenuti in questo esperimento non è possibile fare ulteriori osservazioni. Pertanto il presente lavoro può considerarsi un punto di partenza per ulteriori analisi.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI



5.1 Conclusioni

Attraverso il lavoro di ricerca argomentato in questa tesi sono state evidenziate le caratteristiche molecolari e gli effetti biologici sia di sostanze umiche, sia di estratti etanolici ottenuti da scarti verdi compostati.

È stato possibile mettere in risalto l'importanza di approcciarsi scientificamente al crescente pensiero di economia circolare, volto non solo alla rivalorizzazione degli scarti, ma visto anche come chiusura virtuosa di un ciclo produttivo.

Utilizzando la combinazione di diverse tecniche di caratterizzazione molecolare è stato possibile osservare differenze significative nella composizione molecolare delle quattro sostanze umiche analizzate. Differenze collegate all'eterogeneità degli scarti vegetali utilizzati per ottenere i compost.

Sono state analizzate variazioni in termini di composizione molecolare anche tra i compost e le rispettive sostanze umiche, risultato che sottolinea come attraverso la procedura di estrazione si possano ottenere sostanze con un contenuto chimico diverso dai materiali di origine.

In particolare, è stato osservato un aumento dell'indice di aromaticità e di idrofobicità delle sostanze da carciofo sia rispetto alle altre sostanze analizzate sia in confronto al compost di origine.

Questo maggiore contenuto aromatico, collegato anche ad un alto apporto ligninico ha permesso di affermare che le sostanze estratte da compost da carciofo sono anche quelle che mostrano un maggiore effetto biologico, sia esso di natura antiossidante sia biostimolante, favorendo la crescita radicale in semi di mais, il maggiore sviluppo delle biomassa aerea ed un aumento del contenuto di clorofilla in piante di lattuga.

Quest'ultimi effetti collegati, ai test in pianta, sono paragonabili ai risultati ottenuti trattando piante di lattuga con concentrazioni crescenti di sostanze umiche estratte da lignite (umati di potassio). Il che permette di affermare che attraverso un processo ecosostenibile, quale il riutilizzo di scarti vegetali che termina con il processo di compostaggio, si possano ottenere prodotti che

vantano lo stesso effetto di materiali la cui estrazione richiede uno sfruttamento delle risorse naturali, quali i depositi geochimici di leonardite.

Anche l'analisi del metaboloma secondario, condotto mediante spettrometria di massa IT-TOF ha permesso di sottolineare ancora di più l'effetto dei trattamenti con le sole sostanze da carciofo, confermando l'induzione di uno stress medio in pianta ed un successivo adattamento collegato ad una variazione del profilo metabolico secondario.

Infatti, è stato osservato un maggiore contenuto di flavonoidi (luteolina, apigenina, quercetina, kamferolo, acido clorogenico, acido caffeico, acido tartarico ed i loro derivati) di cui è riportato il collegamento a risposte indotte da stress ossidativi causati da eccessivo irraggiamento solare, variazioni del potenziale osmotico, riduzione e/o eccessivo apporto idrico.

Inoltre, i flavonoidi identificati nel presente lavoro di tesi, oltre ad essere importanti per la protezione della pianta, sono anche di interesse farmacologico in quanto impiegati nel trattamento di un crescente numero di patologie croniche. È possibile quindi ipotizzare l'impiego di sostanze umiche estratte da compost verdi non solo nel settore agronomico, ma anche in campo medico.

La seconda parte del lavoro di ricerca ha previsto l'analisi di estratti etanolici dagli stessi compost verdi, la cui caratterizzazione molecolare ha evidenziato una diversa componente molecolare degli estratti sia in relazione alle sostanze umiche sia ai compost di origine. Anche in questo caso gli estratti da compost da carciofo hanno mostrato un marcato effetto antiossidante collegato ad un elevato contenuto fenolico.

Malgrado l'assenza di fitotossicità degli estratti da compost da caffè, carciofo e pastazzo e l'effetto sull'allungamento della radice di *Lepidium sativum* da parte di questi ultimi due, non sono state osservate differenze significative in termini di biomassa e contenuto di clorofilla se utilizzati mediante applicazione fogliare in piante di lattuga.

Le analisi del metaboloma primario delle foglie di lattuga trattate hanno permesso di osservare delle piccole variazioni nel contenuto di alcuni carboidrati, acidi organici e amminoacidi.

Tuttavia, la maggiore comprensione di tali variazioni sono richiesti ulteriori studi di approfondimento.

In conclusione, i risultati ottenuti con questo lavoro di tesi sono di particolare interesse per sottolineare l'importanza della caratterizzazione molecolare delle sostanze uniche estratte da biomasse agro-industriali riciclate, al fine di comprendere la relazione tra la composizione molecolare e i loro effetti biologici. Per questo fine, sono altresì importanti i risultati dei saggi eseguiti sulle colture vegetali prescelte.

Inoltre, questa tesi ha evidenziato la possibilità di sfruttare il riciclaggio di biomasse vegetali come biostimolanti di una produzione agraria sostenibile in un'ottica di economia circolare.

CAPITOLO 6

BIBLIOGRAFIA



6.1 Bibliografia

- Abdelgawad, K. F., Mhmoud, A. A. & Mohamed, H. F. Y. (2018). Foliar spraying with some biostimulants improves growth , chemical constituents , and yield of head lettuce plant. *Middle East Journal of Agriculture Research*. 7 (4), 1268–1277
- Achard F.K. (1786). Chemische untersuchung des torfs. *Crell's Chem Ann* 2, 391–403
- Adani, F., Genevini, P. L., Gasperi, F. & Zorzi, G. (1997). Organic matter evolution index (omei) as a measure of composting efficiency. *Compost Science and Utilization*, 5(2), 53–62.
<https://doi.org/10.1080/1065657X.1997.10701874>
- Adil A. (2012). Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African Journal of Agricultural Research*, 7(7).
<https://doi.org/10.5897/ajar10.274>
- Aeschbacher, M., Graf, C., Schwarzenbach, R. P. & Sander, M. (2012). Antioxidant Properties of Humic Substances. *Environmental Science and Technological Science and Technology*.46 (9), 4916-4925 <https://doi.org/10.1021/es300039h>
- Al-Faiyz, Y. S. S. (2017). CPMAS ¹³C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S839–S853.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.018>
- Almendros, G., Lankes, U., Dorado, J., González-Vila, F. J. & Blanco, M. J. (2000). C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 793–804
- Amblès, A., Parlanti, E., Jambu, P., Mayoungou, P. & Jacquesy, J. C. (1994). n-Alkane oxidation in soil. Formation of internal monoalkenes. *Geoderma*, 64 (1–2), 111–124.
[https://doi.org/10.1016/0016-7061\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0016-7061(94)90092-2)

- Amble's, A., Halim, M., Jacquesy, J.C., Vitorovic, D. & Ziyad, M. (1994). Characterization of kerogen from Timahdit shale (Y-layer) based on multistage alkaline permanganate degradation. *Fuel* 73(1), 17–24
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F. & Duarte, A. P. (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 165–167. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.01.009>
- Aquino, A.J.A., Tunega, D., Schaumann, G.E., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H. & Lischka, H. (2009). Stabilizing capacity of water bridges in nanopore segments of humic substances: a theoretical investigation. *J. Phys. Chem. C* 113, 16468–16475
- Aulakh, D., Liu, L., Varghese, J. R., Xie, H., Islamoglu, T., Duell, K. & Wriedt, M. (2019). Direct Imaging of Isolated Single-Molecule Magnets in Metal-Organic Frameworks [Research-article]. *Journal of the American Chemical Society*, 141(7), 2997–3005. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11374>
- Barbosa, H. M. A., De Melo, M. M. R., Coimbra, M. A., Passos, C. P. & Silva, C. M. (2014). Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids*, 85, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.011>
- Bellamy, J. (1975). The infrared spectra of complex molecules. *Chapman and Hall, London. Book*
- Belzile, N., Joly, H.A. & Li, H. (1997). Characterization of humic substances extracted from Canadian lake sediments. *Canadian Journal of Chemistry*. 75, 14-27
- Bhutto, A. A., Kalay, Ş., Sherazi, S. T. H. & Culha, M. (2018). Quantitative structure–activity relationship between antioxidant capacity of phenolic compounds and the plasmonic properties of silver nanoparticles. *Talanta*, 189(June), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.080>

- Brunow, G. (2001). Methods to Reveal the Structure of Lignin. In: *Hofrichter, M. and Steinbüchel, A., Eds., Biopolymers: Lignin, Humic Substances and Coal, 1*, Wiley-VCH, Weinheim, 89-116
- Calderín García, A., Guridi Izquierdo, F. & Berbara, R. L. L. (2014). Effects of Humic Materials on Plant Metabolism and Agricultural Productivity. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Biological Techniques*, 1(July), 449–466.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800876-8.00018-7>
- Calvo, P., Nelson, L. & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1–2), 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Campitelli, P. & Ceppi, S. (2008). Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids. *Geoderma* 144, 325–333
- Canellas, L. P., De Araújo Santos, G., Rumjanek, V. M., Moraes, A. A. & Guridi, F. (2001). Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 36(12), 1529–1538.
<https://doi.org/10.1590/s0100-204x2001001200010>
- Canellas, L. P., Teixeira, L. R. L., Dobbss, L. B., Silva, C. A., Medici, L. O., Zandonadi, D. B. & Façanha, A. R. (2008). Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, 153(2), 157–166. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00249.x>
- Canellas, L. P. & Olivares, F. L. (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P. & Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Cao, Y., Chang, Z., Wang, J., Ma, Y., Yang, H. & Fu, G. (2014). Potential use of anaerobically digested manure slurry to suppress Phytophthora root rot of chilli pepper. *Sci. Hortic.* 168, 124–131

- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R. & Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*, 13(4), 843–852. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.843>
- Castaldi, P., Alberti, G., Merella, R. & Melis, P. (2005). Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Management*, 25(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2004.12.011>
- Chen, Y. & Stevenson, F.J. (1986). Soil organic matter interactions with trace elements, in: Y. Chen, Y. Avnimelech (Eds.), *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*, 73–116
- Chen, Y. & Aviad, T. (1990). Effects of humic substances on plant growth. In: *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings* (MacCarthy P., Clapp C., Malcolm R.L., Bloom P.R., eds). *Am Soc Agron, Madison, WI, USA*. 161-186
- Chen, Y., Li, X. & Shen, Z. (2004). Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere*, 57(3), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.044>
- Christl, I., Milne, C.J., Kinniburgh, D.G. & Kretzschmar, R. (2001). Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 2. Metal binding, *Environmental Science and Technology*. 35(12), 2512–2517
- Cihlář, Z., Vojtová, L., Conte, P., Nasir, S. & Kučerík, J. (2014). Hydration and water holding properties of cross-linked lignite humic acids. *Geoderma* 230–231, 151–160
- Conte, P. & Piccolo, A. (1999). Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environmental Science and Technology*, 33(10), 1682–1690. <https://doi.org/10.1021/es9808604>
- Cozzolino, A., Conte, P. & Piccolo, A. (2001). Conformational changes of humic substances induced by some hydroxy-, keto-, and sulfonic acids. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4–5), 563–571. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00196-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00196-6)

- Savy, D., Mazzei, P., Nebbioso, A., Drosos, M., Nuzzo, A., Cozzolino, V., Spaccini, R. & Piccolo, A. (2016). Molecular Properties and Functions of Humic Substances and Humic-Like Substances (HULIS) from Biomass and Their Transformation Products. In *Analytical Techniques and Methods for Biomass*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41414-0>
- Davies, P. J. (1995). The Plant Hormone Concept: Concentration, Sensitivity and Transport. *Plant Hormones*, 13–38. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9_2
- Dewanto, V., Wu, X. & Liu, R. H. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4959–4964. <https://doi.org/10.1021/jf0255937>
- Di Donato, P., Taurisano, V., Tommonaro, G., Pasquale, V., Jiménez, J. M. S., de Pascual-Teresa, S. & Nicolaus, B. (2018). Biological Properties of Polyphenols Extracts from Agro Industry's Wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 9(9), 1567–1578. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9939-4>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Duer, M. J. (2002). Solid-state NMR spectroscopy. 1st ed, Blackwell Science, Oxford, <https://doi.org/10.1039/b618332h>
- DuPont, M. S., Mondin, Z., Williamson, G. & Price, K. R. (2000). Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 3957–3964
- El-Nakhel, C., Petropoulos, S. A., Pannico, A., Kyriacou, M. C., Giordano, M., Colla, G. & Roupael, Y. (2019). The bioactive profile of lettuce produced in a closed soilless system as configured by combinatorial effects of genotype and macrocation supply composition. *Food Chemistry*, 309(April), 125713. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125713>

- Ertani, A., Francioso, O., Tugnoli, V., Righi, V. & Nardi, S. (2011). Effect of commercial lignosulfonate-humate on *Zea mays* L. metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 11940–11948. <https://doi.org/10.1021/jf202473e>
- Fahramand, M., Moradi, H., Noori, M. & Sobhkhizi, A. (2014). Influence of humic acid on increase yield of plants and soil properties. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(3), 339–341. Retrieved from www.ijfas.com
- Ferrari, E., Francioso, O., Nardi, S., Saladini, M., Dal Ferro, N. & Morari, F. (2011). DRIFT and HR MAS NMR characterization of humic substances from a soil treated with different organic and mineral fertilizers. *Journal of Molecular Structure*. 998; 216–224
- Ferrerres, F., Gil, M. I., Castaner, M. & Tomas-Barberan, F. A. (1997). Phenolic metabolites in red pigmented lettuce. Changes with minimal processing and cold storage. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4249–4254
- Filley, T. R., Hatcher, P. G., Shortle, W. C. & Praseuth, R. T. (2000). The application of ¹³C-labeled tetramethylammonium hydroxide (¹³C-TMAH) thermochemolysis to the study of fungal degradation of wood. *Organic Geochemistry*, 31(2–3), 181–198. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(99\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(99)00159-X)
- Francioso, O., Sanchez-Cortes, S., Casarini, D., Garcia-Ramos, J.V., Ciavatta, C. & Gessa, C. (2002). Spectroscopic study of humic acids fractionated by means of tangential ultrafiltration. *Journal of Molecular structure*, 609(1-3), 137-147
- García, A. C., Santos, L. A., Izquierdo, F. G., Sperandio, M. V. L., Castro, R. N. & Berbara, R. L. L. (2012). Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*, 47, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.06.011>

- García, A. C., Santos, L. A., de Souza, L. G. A., Tavares, O. C. H., Zonta, E., Gomes, E. T. M. & Berbara, R. L. L. (2016). Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *Journal of Plant Physiology*, 192, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.008>
- García, A. C., van Tol de Castro, T. A., Santos, L. A., Tavares, O. C. H., Castro, R. N., Berbara, R. L. L. & García-Mina, J. M. (2019). Structure–Property–Function Relationship of Humic Substances in Modulating the Root Growth of Plants: A Review. *Journal of Environment Quality*, 48(6), 1622–1632. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0027>
- Gharibi, S., Sayed Tabatabaei, B.E., Saeidi, G., Talebi, M. & Matkowski, A. (2019). The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* *Phytochemistry*, 162, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.03.004>
- Ghassemi-Golezani, K. & Farhangi-Abri, S. (2018). Foliar sprays of salicylic acid and jasmonic acid stimulate H⁺-ATPase activity of tonoplast, nutrient uptake and salt tolerance of soybean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.059>
- Ghisellini, P., Cialani, C. & Ulgiati, S. (2016). A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *Journal of Cleaner Production*, 114, 11–32. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.007>
- Gómez-Ruiz, J. Á., Leake, D. S. & Ames, J. M. (2007). In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6962–6969. <https://doi.org/10.1021/jf0710985>
- González-Vila, F.J., Lankes, U. & Demann H.D.L. (2001). Comparison of the information gained by pyro-lytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 58-59:349–59

- Grasset, L. & Amblès, A. (1998). Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 47(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(98\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(98)00084-9)
- Gupta, A., Birhman, K., Raheja, I., Sharma, S. K. & Kar, H. K. (2016). Quercetin: A wonder bioflavonoid with therapeutic potential in disease management. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(3), 248–252. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)61024-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61024-6)
- Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: Historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, 116(6), 483–505. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0110-x>
- Hatcher, P. G. (1987). Chemical structure studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance. *Org. Geochem.* 11(1), 31-39
- Hatcher, P. G., Nanny, M. A., Minard, R. D., Dible, S. D. & Carson, D. M. (1995). Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxydation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic. Geochemistry*, 23(10), 881 - 888.
- Hermann, K. (1976). Flavonols and flavones in food plants: a review. *Journal of Food Technology*, 11, 433–448
- Hernandez, O. L., Calderín, A., Huelva, R., Martínez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N. O. & Canellas, L. P. (2014). Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 225–232. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0221-x>
- Jacomini, C., Maria, A. D., Fantone, D., Giansanti, P., Griselli, B., Nappi, P., Barberis R. & Pugliese, R. (2004). *Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici A cura di: Pina Nappi (ARPA Piemonte) APAT Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i Servizi Tecnici*. Retrieved from <http://www.sinanet.anpa.it>

- Jackson, T.A. (1995). Effect of clay, minerals, oxyhydroxides and humic matter on microbial communities of soil, sediment and water. In: Huang, P.M., Berthelin, J., Bollag, J.M., McGill, W.B., Page, A.L, *Environmental Impact of Soil Component Interactions. Metals, Other Inorganics, and Microbial Activities*, 2 CRC Lewis Publishers Inc., Boca Raton, FL, 165-200
- Jardin, D. (2012). The Science of Plant Biostimulants—A bibliographic analysis. Adhoc Study Report to the European Commission DG ENTR. http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/files/fertilizers/final_report_bio_2012en.pdf
- Jiménez-moreno, N., Cimminelli, M. J., Volpe, F., Ansó, R., Esparza, I., Mármol, I. & Ancín-azpilicueta, C. (2019). Phenolic composition of artichoke waste and its antioxidant capacity on differentiated Caco-2 cells. *Nutrients*, 11(8).1723 <https://doi.org/10.3390/nu11081723>
- Jimoh, M. O., Afolayan, A. J. & Lewu, F. B. (2019). Antioxidant and phytochemical activities of *Amaranthus caudatus* L. harvested from different soils at various growth stages. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49276-w>
- Jindo, K., Martim, S. A., Navarro, E. C., Pérez-Alfocea, F., Hernandez, T., Garcia, C. & Canellas, L. P. (2012). Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant and Soil*, 353(1–2), 209–220. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1024-3>
- Jindo, K., Soares, T. S., Peres, L. E. P., Azevedo, I. G., Aguiar, N. O., Mazzei, P. & Canellas, L. P. (2016). Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179(2), 206–214. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500228>
- Kauffman, G. L., Kneivel, D. P. & Watschke, T. L. (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Science*, 47(1), 261–267. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0171>

- Ke, D. & Saltveit, M. E. Jr. (1988). Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiology*, 88, 1136–1140
- Kim, H. K., & Verpoorte, R. (2010). Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*, 21(1), 4–13. <https://doi.org/10.1002/pca.1188>
- Köchy, M., Hiederer, R. & Freibauer, A. (2015). Global distribution of soil organic carbon – Part 1 : Masses and frequency distributions of SOC stocks for the tropics , permafrost regions , wetlands , and the world. *Soil*, 1. 351–365. <https://doi.org/10.5194/soil-1-351-2015>
- Kučerík, J., Bursáková, P., Průšová, A., Grebíková, L. & Schaumann, G.E. (2012). Hydration of humic and fulvic acids studied by DSC. *J. Therm. Anal. Calorim.* 110, 451–459
- Ladan Moghaddam, A. R. & Soleimani, A. (2012). Compensatory effects of humic acid on physiological characteristics of pistachio seedlings under salinity stress. *Acta Horticulturae*, 940, 253–256. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.940.35>
- Larrosa, M.; Llorach, R.; Espín, J.C. & Tomás-Barberán, F.A. (2002) Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *LWT Food Science and Technology*, 35(6), 532–542
- Lavecchia R., Z. A. (2011). Polyphenols and energy recovery from spent coffee grounds. *Chemical Engineering Transactions*, 25, 285–290
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll Fluorescence Signatures of Leaves during the Autumnal Chlorophyll Breakdown. *Journal of Plant Physiology*, 131(1–2), 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80271-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80271-7)
- Liu, K. & Price, G.W. (2011). Evaluation of three composting systems for the management of spent coffee grounds. *Bioresource. Technology*, 102 (17), 7966–7974
- Llorach, R., Tomás-Barberán, F.A. & Ferreres, F. (2005). Functionalisation of commercial chicken soup with enriched polyphenol extract from vegetable by-products. *European. Food Research and Technology*, 220, 31–36

- Loffredo, E., Berloco, M., Casulli, F. & Senesi, N. (2007). In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum*. *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), 759–769.
- Loffredo, E. & Senesi, N. (2009). In vitro and in vivo assessment of the potential of compost and its humic acid fraction to protect ornamental plants from soil-borne pathogenic fungi. *Scientia Horticulturae*. 122(3) , 432–439
- Lu, X. Q., Hanna, J. V. & Johnson, W. D. (2000). Source indicators of humic substances: an elemental composition, solid state ¹³C CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Applied Geochemistry*. 15(1), 1019–1033
- Lucas García, J. A., Barbas, C., Probanza, A., Barrientos, M. L. & Gutierrez Mañero, F. J. (2001). Low molecular weight organic acids and fatty acids in root exudates of two *Lupinus* cultivars at flowering and fruiting stages. *Phytochemical Analysis*, 12(5), 305–311.
<https://doi.org/10.1002/pca.596>
- Maietta, M., Colombo, R., Lavecchia, R., Sorrenti, M., Zuorro, A. & Papetti, A. (2017). Artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) waste as a natural source of carbonyl trapping and antiglycative agents. *Food Research International*, 100(1), 780–790.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.007>
- Magdoff, F. & Weil, R.R. (2004) Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture. *Book.Editor-in-Chief*
- Malcolm R.L. (1990). The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Analytica Chimica Acta*, 232,:19-30
- Mazzei, P. & Piccolo, A. (2015). Interactions between natural organic matter and organic pollutants as revealed by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 53(9), 667–678.
<https://doi.org/10.1002/mrc.4209>
- Mehta, C.M., Palni, U., Franke-Whittle, I.H. & Sharma, A.K. (2014). Compost: its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management*. 34(3), 607–622

- Monda, H., Cozzolino, V., Vinci, G., Spaccini, R. & Piccolo, A. (2017). Molecular characteristics of water-extractable organic matter from different composted biomasses and their effects on seed germination and early growth of maize. *Science of the Total Environment*, 590–591, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.026>
- Monda, H., Cozzolino, V., Vinci, G., Drosos, M., Savy, D. & Piccolo, A. (2018). Molecular composition of the Humeome extracted from different green composts and their biostimulation on early growth of maize. *Plant and Soil*, 429(1–2), 407–424. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3642-5>
- Muhlack, R. A., Potumarthi, R. & Jeffery, D. W. (2018). Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management*, 72, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>
- Muscolo, A., Sidari, M., Attinà, E., Francioso, O., Tugnoli, V. & Nardi, S. (2007). Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal*, 71(1), 75–85. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0055>
- Muscolo, A., Sidari, M., Francioso, O., Tugnoli, V. & Nardi, S. (2007). The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. *Journal of Chemical Ecology*, 33(1), 115–129. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9206-9>
- Nappi, P. & Cosiglio, M., 1986 - Saggi di fitotossicità: risultati delle ricerche per l'elaborazione di una metodica. Atti del Simposio “*Fanghi di depurazione in agricoltura*” Torino, 19-20 Novembre
- Nardi, S., Arnoldi, G. & Agnola, G. D. (1988). Release Of Tiie Hormone-Like Activities From//Olobophora Rosea (Sav.) And Allolobophora Caliginosa (Sav.) Feces. *Canadian Journal of Soil Science*, 68(3), 563–567., <https://doi.org/10.4141/cjss88-054>

- Nardi, Serenella, Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spaccini, R. & Piccolo, A. (2007). Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 3138–3146. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.006>
- Nardi, Serenella, Pizzeghello, D., Muscolo, A. & Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527–1536. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8)
- Nebbioso, A., Piccolo, A., Lamshöft, M. & Spiteller, M. (2014). Molecular characterization of an end-residue of humeomics applied to a soil humic acid. *RSC Advances*, 4(45), 23658–23665. <https://doi.org/10.1039/c4ra01619j>
- Nebbioso, A. & Piccolo, A. (2011a). Basis of a humeomics science: Chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules*, 12(4), 1187–1199. <https://doi.org/10.1021/bm101488e>
- Nebbioso, A. & Piccolo, A. (2011b). Basis of a humeomics science: Chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules*, 12(4), 1187–1199. <https://doi.org/10.1021/bm101488e>
- Nebbioso, A. & Piccolo, A. (2012). Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*, 720, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.027>
- Nebbioso, A., Vinci, G., Drosos, M., Spaccini, R. & Piccolo, A. (2015). Unveiling the molecular composition of the unextractable soil organic fraction (humin) by humeomics. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0991-y>
- Niemeyer, J., Chen, Y. & Bollag, J.M. (1992). Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Soil Science. Society of America. Journal Abstract*. 56(6),135–140

- Nikolaev, I., Klein, O., Kulikova, N., Stepanova, E. & Koroleva, O. (2008). Development and Validation of Antioxidant Capacity Assessment Protocol for Humic and Humic-Like Substances. *Molecular Understanding to Innovative Applications of Humic Substances; Proceedings of the 14th International Meeting of the International Humic Substances Society, September 14-19, Moscow - Saint Petersburg, Russia, Editors: Perminnova I.V., Kulikova N.A.*, 441–444
- Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C. & Canellas, L. P. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.012>
- Page, J. C., Arruda, N. P. & Freitas, S. P. (2017). Crude ethanolic extract from spent coffee grounds: Volatile and functional properties. *Waste Management*, 69, 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.043>
- Panuccio, M. R., Muscolo, A. & Nardi, S. (2001). Effect of humic substances on nitrogen uptake and assimilation in two species of pinus. *Journal of Plant Nutrition*, 24(4–5), 693–704. <https://doi.org/10.1081/PLN-100103663>
- Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, T., Lerma, S. & Lynch, J.M. (2002). Effectiveness of municipal waste compost and its humic fraction in suppressing *Pythium ultimum*. *Microbial Ecology*. 44(1), 59–68
- Pasqualone, A., Punzi, R., Trani, A., Summo, C., Paradiso, V.M., Caponio, F. & Gambacorta, G. (2017). Enrichment of fresh pasta with antioxidant extracts obtained from artichoke canning by-products by ultrasound-assisted technology and quality characterisation of the end product. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 2078–2087
- Passos, C. P. & Coimbra, M. A. (2013). Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.088>

- Peacock, A. D., Macnaughton, S. J., Cantu, J. M., Dale, V. H. & White, D. C. (2001). Soil microbial biomass and community composition along an anthropogenic disturbance gradient within a long-leaf pine habitat. *Ecological Indicators*, 1(2), 113–121. [https://doi.org/10.1016/s1470-160x\(01\)00013-9](https://doi.org/10.1016/s1470-160x(01)00013-9)
- Piccolo, A., Nardi, S. & Concheri, G. (1992). Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4), 373–380. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90197-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90197-6)
- Piccolo, A., Nardi, S. & Concheri, G. (1996a). Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *European Journal of Soil Science*, 47(3), 319–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1996.tb01405.x>
- Piccolo A., Pietramellara G. & Mbagwu J. (1996b). Effects of coal derived humic substances on water retention and structural stability of Mediterranean soils. *Soil Use and Management*, 12, 209-213
- Piccolo, A., Nardi, S. & Concheri, G., (1996). Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere* 33, 595-660
- Piccolo, A., Conte, P. & Cozzolino, A. (1999). Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *European Journal of Soil Science*, 50(4), 687–694. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1999.00276.x>
- Piccolo, A. & Mbagwu, J. S. C. (1999). Role of hydrophobic components of soil organic matter in soil aggregate stability. *Soil Science Society of America Journal*, 63(6), 1801–1810. <https://doi.org/10.2136/sssaj1999.6361801x>
- Piccolo, A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 166(11), 810–832. <https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00007>
- Piccolo, A., Conte, P., Trivellone, E., Van Lagen, B. & Buurman, P. (2002). Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by Pyr-GC-MS and ¹H-NMR spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 36(1), 76–84. <https://doi.org/10.1021/es010981v>

- Piccolo, A. & Spaccini R. (2008). Spectroscopic Characterization of Compost at Different Maturity Stages. *Clean - Soil Air Water*, 36(2), 152–157. <https://doi.org/10.1002/clen.200720012>
- Piccolo, A., Spaccini, R., Drosos, M., Vinci, G. & Cozzolino, V. (2018). The molecular composition of humus carbon: Recalcitrance and reactivity in soils. *The Future of Soil Carbon: Its Conservation and Formation*.87-124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811687-6.00004-3>
- Pierret, A., Doussan, C., Capowiez, Y., Bastardie, F. & Pagès, L. (2007). Root functional architecture: A framework for modeling the interplay between roots and soil. *Vadose Zone Journal*, 6(2), 269–281. <https://doi.org/10.2136/vzj2006.0067>
- Pörschmann, J., Plugge, J. & Toth, R. (2001). In situ derivatisation using pressurized liquid extraction to determine phenols, sterols and carboxylic acids in environmental samples and microbial biomasses. *Journal of Chromatography A*, 909(1), 95–109. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00888-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00888-8)
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A. & Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes - A review. *Molecules*, 22(5), 680. <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V. & Nardi, S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55(398), 803–813. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh085>
- Ratsch H.C. (1983) - Interlaboratory Root Elongation testing of toxic substances on selected plant species. *Environmental Protection Agency, carvallis Environmental Research Laboratory, Coevallis, OR.EPA. 600/3-83-051*
- Ray, R. & Weil, F. M. (2004). Soil Organic Matter In Sustainable Agriculture. *CRC Press*

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237
- Riffaldi, R. & Schnitzer, M. (1972). Electron Spin Resonance Spectrometry of Humic Substances1. *Soil Science Society of America Journal*, 36(2), 301.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1972.03615995003600020028x>
- Robert, L.W., Kay, R.K. & James, E.H. (1998). Use of ¹³C NMR and FTIR for elucidation of degradation pathways during natural litter decomposition and composting plant. *Davies, G., Ghabbour, E.A. (Eds.), Humic Substances: Structures, Properties, and Uses. Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 29–45
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A. & Heimler, D. (2002). Polyphenols in greenhouse. *Food Chemistry*, 79(3), 337–342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X)
- Saa, S., Olivos-Del Rio, A., Castro, S. & Brown, P. H. (2015). Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb). *Frontiers in Plant Science*, 6(February), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00087>
- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K. & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
- Saia, S., Colla, G., Raimondi, G., Di Stasio, E., Cardarelli, M., Bonini, P. & Rouphael, Y. (2019). An endophytic fungi-based biostimulant modulated lettuce yield, physiological and functional quality responses to both moderate and severe water limitation. *Scientia Horticulturae*, 256(March), 108595. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108595>

- Saiz-Jimenez, C. (1996). The chemical structure of humic substances: Recent advances. In *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. A. Piccolo (ed.). Elsevier, Amsterdam, 1–44
- Savy, D., Mazzei, P., Drosos, M., Cozzolino, V., Lama, L. & Piccolo, A. (2017). Molecular Characterization of Extracts from Biorefinery Wastes and Evaluation of Their Plant Biostimulation. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(10), 9023–9031. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01928>
- Saxena, J., Choudhary, S., Pareek, S., Choudhary, A.K. & Iquebal, M.A. (2015). Recycling of organic waste through four different composts for disease suppression and growth enhancement in mung beans. *Clean - Soil Air Water* 43(7), 1066–1071
- Schmidt, M. W. I. & Noack, A. G. (2000). Black carbon in soils and sediments: analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogeochemical Cycles* 14, 777–794
- Schulten H.-R. & Schnitzer M. (1998). The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 26, 1-15
- Serpen, A., Gökmen, V. & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.027>
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O. & Nardi, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 36(6), 662–669. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9790-6>
- Shahein, M.M., Afifi M.M. & Algharib, A.M. (2015). Study the effects of humic substances on growth, chemical constituents, yield and quality of two lettuce cultivars (cv.s. Dark Green and Big Bell). *Journal of Materials and Environmental Science*. 6(2): 473-486.
- Sobolev, A. P., Brosio, E., Gianferri, R. & Segre, A. L. (2005). Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 625–638. <https://doi.org/10.1002/mrc.1618>

- Spaccini, R., Piccolo, A., Haberrhauer, G. & Gerzabek, H. M. (2000). Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by ^{13}C distribution and CPMAS-NMR spectra. *European Journal of Soil Science*, 51(December), 583–594
- Spaccini, R. & Piccolo, A. (2007). Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity. 2. Thermochemolysis-GC-MS and ^{13}C -CPMAS-NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2303–2311. <https://doi.org/10.1021/jf0625407>
- Spaccini, R. & Piccolo, A. (2008). Spectroscopic Characterization of Compost at Different Maturity Stages. *Clean*, 36(2), 152-157. <https://doi.org/clen.200720012>
- Spaccini, R., Sannino, D., Piccolo, A. & Fagnano, M. (2009). Molecular changes in organic matter of a compost-amended soil. *European Journal of Soil Science*, 60(2), 287–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01108.x>
- Spaccini, R. & Piccolo, A. (2009). Molecular characteristics of humic acids extracted from compost at increasing maturity stages. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1164–1172. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.026>
- Spaccini, R., Song, X. Y., Cozzolino, V. & Piccolo, A. (2013). Molecular evaluation of soil organic matter characteristics in three agricultural soils by improved off-line thermochemolysis: The effect of hydrofluoric acid demineralisation treatment. *Analytica Chimica Acta*, 802, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.031>
- Spaccini, R., Cozzolino, V., Di Meo, V., Savy, D., Drosos, M. & Piccolo, A. (2019). Bioactivity of humic substances and water extracts from compost made by ligno-cellulose wastes from biorefinery. *Science of the Total Environment*, 646, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.334>
- Spigno, G., Tramelli, L. & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>

- Stevenson FJ. (1994). *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. Wiley, New York
- Sun, J., Zhang, M., Kubzdela, N., Luo, Y., Harnly, J. M. & Chen, P. (2018). Determination of Variance of Secondary Metabolites in Lettuces Grown Under Different Light Sources by Flow Injection Mass Spectrometric (FIMS) Fingerprinting and ANOVA–PCA. *Journal of Analysis and Testing*, 2(4), 312–321. <https://doi.org/10.1007/s41664-018-0072-6>
- Tadini, A. M., Pantano, G., de Toffoli, A. L., Fontaine, B., Spaccini, R., Piccolo, A. & Bisinoti, M. C. (2015). Off-line TMAH-GC/MS and NMR characterization of humic substances extracted from river sediments of northwestern São Paulo under different soil uses. *Science of the Total Environment*, 506–507, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.012>
- Tahir, M.M., Khurshid, M., Khan, M.Z., Abbasi, M.K. & Kazmi, M.H. (2011). Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. *Pedosphere*, 21, 124–131
- Terahara, N. (2015). Flavonoids in foods: A review. *Natural Product Communications*, 10(3), 521–528. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000334>
- Termorshuizen, A.J., Rijn, E.V., Gaag, D.J.V.D., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlof, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Ramert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C. & Zmora-Nahum, S. (2006). Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: variability in pathogen response. *Soil Biology. Biochemistry*. 38, 2461–2477
- van Bergen P. F., Flannery M. B., Poulton P. R. & Evershed R. P. (1998). Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments. III: Nitrogen-containing macromolecular moieties in soil organic matter from Geescroft Wilderness in: Nitrogen-containing macromolecules in the bio- and geosphere. *Stankiewicz B. A., van Bergen P. F. ed. , ACS Symposium Series, 707, Oxford University Press, New York, 321-338*
- Vane, C. H., Martin, S. C., Snape, C. E. & Abbott, G. D. (2001). Degradation of lignin in wheat straw during growth of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide and solid-state ¹³C NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2709–2716. <https://doi.org/10.1021/jf001409a>

- Vane, C. H., Drage, T. C. & Snape, C. E. (2003). Biodegradation of oak (*Quercus alba*) wood during growth of the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): A molecular approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 947–956. <https://doi.org/10.1021/jf020932h>
- Vasconcelos, A. C. F. de, Zhang, X., Ervin, E. H. & Kiehl, J. de C. (2009). Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. *Scientia Agricola*, 66(3), 395–402. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162009000300015>
- Vaughan, D. & Ord, B. G. (1981). Uptake and incorporation of ¹⁴C-labelled soil organic matter by roots of *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany*, 32(4), 679–687. <https://doi.org/10.1093/jxb/32.4.679>
- Vetrani, C., Costabile, G., Di Marino, L. & Rivellesse, A. A. (2013). Nutrition and oxidative stress: A systematic review of human studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(3), 312–326. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.738651>
- Viacava, G. E., Roura, S. I., López-Márquez, D. M., Berrueta, L. A., Gallo, B. & Alonso-Salces, R. M. (2018). Polyphenolic profile of butterhead lettuce cultivar by ultrahigh performance liquid chromatography coupled online to UV–visible spectrophotometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 260(March), 239–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.151>
- Vinci, G., Mazzei, P., Bridoux, M., Drosos, M. & Piccolo, A. (2019). Molecular characterization of organic matter in two calcareous soils: the effects of an acid decarbonation treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(20), 5243–5253. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01903-1>
- Wendakoon, C. & Gagnon, D. (2012). Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants* 1(2), 60–68. <https://doi.org/10.7275/R5GH9FV2>
- Winter, M. & Hermann, K. (1996). Esters and glucosides of hydroxy- cinnamic acid in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 616–620

- Wood, S. A., Tirfessa, D. & Baudron, F. (2018). Soil organic matter underlies crop nutritional quality and productivity in smallholder agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 266(July), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.07.025>
- Wooten, J.B. (1995). ¹³C CPMAS NMR of bright and burley tobaccos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 2858-2868
- Young, C.C. & Chen, L.F. (1997). Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce seedlings. *Plant and Soil*. 195(1), 143-194
- Yang, X., Wei, S., Liu, B., Guo, D., Zheng, B., Feng, L. & Huang, D. (2018). A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa*. L) varieties. *Horticulture Research*, 5(1), 1–14 <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0050-1>
- Yates, L.M. & von Wandruszka, R. (1999) Decontamination of polluted water by treatment with a crude humic acid blend. *Environmental. Science and. Technology*. 33(12), 2076–2080
- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P. & Façanha, A. R. (2007). Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225(6), 1583–1595. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0454-2>
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Dobbss, L. B., Olivares, F. L., Canellas, L. P., Binzel, M. L. & Façanha, A. R. (2010). Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 231(5), 1025–1036. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1106-0>
- Zhang, X. & Schmidt, R.E. (1997). The impact of growth regulators on the tocopherol status in water-stressed *Poa pratensis*. *International. Turfgrass Society. Research. Journal*. 8, 1364–1371
- Zhang, S.Z., Meiners, S.J., Kong, C. H., Yang, X. F., Li, Y. H., Xia, Z. C. & Wang, P. (2018). Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. *Nature. Communications*. 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018- 06429-1>

- Zhang, J., Chi, F., Wei, D., Zhou, B., Cai, S., Li, Y. & Kuang, E. (2019). Impacts of Long-term Fertilization on the Molecular Structure of Humic Acid and Organic Carbon Content in Soil Aggregates in Black Soil. *Scientific Reports*, 9, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48406-8>
- Zuorro, A. (2015). Optimization of polyphenol recovery from espresso coffee residues using factorial design and response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 152, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.08.016>
- Zykova, M. V., Schepetkin, I. A., Belousov, M. V., Krivoshchekov, S. V., Logvinova, L. A., Bratishko, K. A. & Quinn, M. T. (2018). Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules*, 23(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules23040753>

CAPITOLO 7

APPENDICE



7.1 Appendice

Tabelle A1: Elenco dei composti ottenuti in seguito a pirolisi con TMAH, identificate mediante l'uso della libreria Nist dei composti da caffè, carciofo, pastazzo di limoni e peperone

*Lig = derivato ligninico, G = unità guaiaciliche, S = unità siringiliche, P = unità p-idrossifeniliche, N=azoto, FAME =esteri metilici di acidi grassi lineari, mic = acidi grassi di origine microbica

Compost da caffè

RT	Libreria Nist	Origine
6.37	N derivato	N
6.75	2-metossi-fenolo	fenolo
6.84	metossi-benzene	Lig P1
6.90	3,4-metossipropilsuccinammide	N
7.09	4-metil-fenolo	fenolo
7.25	4-metil-fenolo 1	fenolo
7.84	1,4-dimetossi-benzene	carboidrato
8.07	metossi-piridina	N
8.15	1-etenil-4-CH ₃ O-benzene	Lig P3
8.36	2,4-dimetilfenolo	fenolo
8.59	fenolo 3,5-dimetil-metilcarboidratoamato	fenolo
9.07	1,2-di-metossi-benzene	Lig G1
9.79	4-ammino-1-metil-5-nitropirazolo	N
9.98	3-(α -idrossietil)-anilina	N
10.31	2,6-dimetossi-fenolo	carboidrato
10.46	3-metossi-fenolo	fenolo
11.00	metil 1H-indole	N
11.21	4-etil-2-om-fenolo	fenolo
11.34	o-metossi- α -metilbenzil alcol	fenolo
11.80	derivato dei carboidrati	carboidrato
12.02	indole	N
12.31	2-metossi-4-vinilfenolo	fenolo
12.51	m/z 128	N
13.16	N derivato	N
13.34	2-dimetossi-fenolo	fenolo
13.63	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
13.80	1,2,3-trimetossibenzene	Lig S1
13.99	acido benzoico,4-metossi-metil estere	Lig P6
14.22	2-acido proenoico, 3-fenolonil-, metil estere (e)	lipide
14.48	2-metil indole	proteina
14.57	1,3,5-trimetossi- benzene	carboidrato
14.88	N derivato	N
15.05	N derivato	N
15.39	m/z 128	N
15.70	2H-2-one, 1,3-diidro-1metil indole	N
15.88	1H-5-metossi-2.metil indole	N

16.10	2-metossi-4-(1-propenil)-(eugenol) fenolo	Lig G
16.95	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.08	dimetil indole	N
17.78	2-(3,4-dimetil.fenolin)-1-CH3O etilene	iso Lig G7-G8
18.10	C13 iso FAME	mic
18.25	acido benzenepropanoico, 4-metossi-metil estere	Lig P12
18.36	1,2,3,4-tetrametossi benzene	carboidrato
19.31	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5
20.02	acido benzoico, 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
20.23	3,4,5-trimetossi benzaldeide	Lig S4
20.94	trans-2-(3,4-di-CH3O fenolonil)-1-CH3O etilene	Lig G8
21.29	2,5-dimetossi-4-etil-benzaldeide	iso Lig G7-G8
22.35	etanone, 1-(3,4,5-trimetossi fenolonil)-2-acido propenoico, 3-(4-metossifenolonil), metil estere	Lig S5 + Lig P18
23.00	3,4-diome acetofenolonone	Lig G5
23.43	acido benzoico, 3,4,5-trimetossi-metil estere	Lig S6
23.60	C14 iso FAME	mic
23.99	trans-1-(3,4-di-CH3O fenolonil)-3- CH3O -1-propene	Lig G13
24.70	2,3-diidro-1-fenolonil-4(1H)-quinazolinone	aromatico
24.89	cis-1-(3,4,5-tri-CH3O fenolonil)-2-CH3O etilene	Lig S7
25.26	1,2,3-trimetossi-1-(3,4-dimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig G14
25.40	trans-1-(3,4,5-tri-CH3O fenolonil)-2-CH3O etilene	Lig S8
25.45	C15 iso FAME	mic
25.65	1,2,3-trimetossi-1-(3,4-dimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig G15
25.91	1-(1-idrossiesil)-2,5-dimetossi-benzene	aromatico
26.16	C15 ante-iso FAME	mic
26.40	N derivato	N
27.54	trans-1-(3,4,5-tri- CH3O fenolonil)-3-CH3O-1-propene	Lig G16
27.73	acido propenoico trans-3-(3,4-di- CH3O fenolonil)-3me	Lig G18
27.77	C16 FAME	mic
28.01	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S14
28.09	C16:1 FAME	mic
28.16	C16:1 FAME	mic
28.31	1-(3,4,5 tri CH3O fenolonil)-1,2,3-tri-CH3O propano (treo/eritro)	Lig S15
28.39	11-acido esadecanoico, metil estere	lipide
28.75	C16 iso FAME	mic
29.68	N derivato	N
30.22	C17 iso FAME	mic
30.41	C17 ante-iso FAME	mic
30.51	C17 cy FAME	mic
30.70	metil 9,10-metilene-esadecanoato	mic
30.88	cis-1-(3,4,5-tri- CH3O fenolonil)-1,3-di CH3O prop-1-ene	Lig s16
31.08	C17 n-FAME	mic
31.50	N derivato	N
31.80	benzene, (1,2-dimethoxyethyl)	aromatico
32.03	C18 iso FAME	mic
32.80	C18:1 FAME	mic
32.92	C18:1 FAME	lipide
33.40	C18 FAME	lipide
33.79	isomero podocarpo-7en-3-one dimetile	terpenoide

35.25	cy C19 FAME	mic
36.20	β -metossi- α -fenolonil-fenoloetil-alcol	Lig
36.32	1,2-dimetossietil- benzene	aromatico
36.49	acido benzoico 3-(3,4-dimetossifenolonossi)-4-metossi	Lig
36.81	C16, 8(9,10)-16 di- CH3O, FAME	mic
37.14	C24 alcano	alcano
37.26	derivato dei carboidrati	carboidrato
37.63	alcol	alcol
37.72	C20 FAME	mic
38.26	C18:1, 18 CH3O, FAME	mic
38.68	[1,2-a] pirazine-1,4-dione, esaidro-3-(fenolonilmetil) pirrolo	N
39.19	tetrapentacontane	alcano
39.27	2,2'-metilenebi[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil- fenolo	fenolo
41.14	alcano	alcano
41.42	alcano	alcano
41.70	C22 FAME	mic
42.92	alcol	alcol
43.04	C26 alcano	alcano
43.58	C23 FAME	mic
43.77	alcol	alcol
43.84	alcol	alcol
44.87	C27 alcano	alcano
45.41	C24 FAME	lipide
45.91	C22, 22- CH3O, FAME	lipide
46.65	C28 alcano	alcano
46.78	squalene	squalene
47.16	1-hexacosanolo	alcol
47.40	C24, 2- CH3O, FAME	mic
48.36	C29 alcano	alcano
48.87	C26 FAME	lipide
48.98	sterolo	sterolo
49.13	sterolo	sterolo
49.36	C24, 24- CH3O, FAME	lipide
50.01	alcano	alcano
50.13	sterolo	sterolo
50.51	C28- CH3O	alcol
50.76	sterolo	sterolo
51.1	sterolo	sterolo
51.63	alcano	alcano
52.13	C28 FAME	lipide
52.72	sterolo	sterolo
53.20	alcano	alcano
53.66	sterolo	sterolo
53.89	sterolo	sterolo
54.73	alcano	alcano
55.23	C30 FAME	lipide
56.25	alcano	alcano

Compost da carciofo

RT	Libreria Nist	Origine
6.95	2-metossi-fenolo	fenolo
7.59	bis-(2-metossietil)ammina	N
9.15	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
9.50	m/z 128	N
9.70	n,n-2-trietil-propenamide	N
9.80	isopropilimidazolo-2-tione	N
10.59	aromatico	aromatico
11.42	fenolo	fenolo
13.07	m/z 98	N
13.87	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
13.98	1,2,3-trimetossi-benzene	Lig S1
14.16	acido benzoico, 4-metossi-metil estere	Lig P6
15.30	m/z 128	N
15.88	1,3-diidro-1-metil-2H-indol-2-one	N
17.16	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.60	aromatico	aromatico
19.52	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5
20.26	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
20.49	3,4,5-trimetossi-benzaldeide	Lig S4
21.22		
21.58	2,5-dimetossi-4-etil-benzaldeide	iso Lig G7-G8
21.82	1,2,3-trimetossi-5-(2-propenil)-benzene	aromatico
22.59	etanone, 1-(3,4,5-trimetossi fenolonil)-2-acido propenoico, 3-(4-metossifenolonil), metil estere	Lig S5 + Lig P18
23.71	acido benzoico, 3,4,5-trimetossi	Lig S6
24.29	trans-1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O-1-propene	Lig G13
25.17	cis-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O-etilene	Lig S7
25.59	1,2,3-trimetossi-1-(3,4-dimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig G14
25.69	trans-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O etilene	Lig S8
25.81	C15 FAME	mic
25.92	1,2,3-trimetossi-1-(3,4-dimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig G15
26.22	cis-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-1-CH ₃ O prop-1-ene	Lig S10
27.86	trans-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O-1-propene	Lg S13
27.97	acido propenoico trans-3-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3CH ₃ O	Lg G18
28.04	cis-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-1-CH ₃ O propene	Lig G16
28.17	C16 iso FAME	mic
28.32	1-(3,4,5 tri CH ₃ O fenolonil)-1,2,3-tri CH ₃ O propano	Lig S14
28.60	1-(3,4,5 tri CH ₃ O fenolonil)-1,2,3-tri CH ₃ O propano	Lig S15
28.77	11-acido esadecanoico-metil-estere	lipide
29.10	C16 FAME	mic
30.12	C17 iso FAME	mic

30.62	C17 ante-iso FAME	mic
30.81	C17 FAME	mic
30.91	C17 cy FAME	mic
31.13	acido propenoico trans-3-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃	Lig S18
31.21	cis-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-1,3-di-CH ₃ O prop-1-ene	Lig S16
32.09	benzene	aromatico
33.18	C18:1 FAME	mic
33.31	C18:1 FAME	lipide
33.81	C18 FAME	mic
33.91	FAME	lipide
34.19	isomero podocarpo-7en-3-one dimetile	terpeni
34.41	C16. 16 CH ₃ O FAME	biopolimero
34.66	C19 FAME	mic
35.46	alcano	alcano
35.69	cy C19 FAME	mic
37.25	C16, 8-(9,10)-16 di-CH ₃ O FAME	mic
37.33	derivato dei carboidrati	carboidrato
37.60	C23 alcano	alcano
37.68	derivato dei carboidrati	carboidrato
38.07	C18:1. 18 CH ₃ O FAME	mic
38.15	C18 FAME	mic
39.54	alcano	alcano
39.65	C24 alcano	alcano
39.93	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.06	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.21	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.31	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.52	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.69	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.79	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.09	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.29	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.52	alcano	alcano
41.63	C25 alcano	alcano
42.16	C22 FAME	mic
42.48	derivato dei carboidrati	carboidrato
42.70	C20.CH ₃ O FAME	mic
43.53	C26 alcano	alcano
44.07	C23 FAME	mic
45.37	C27 alcano	alcano
45.76	acido dioico	acido dioico
45.91	C24 FAME	mic
46.42	C22. CH ₃ O FAME	bipoliestere
47.15	C28 alcano	alcano
47.30	squalene	squalene

47.92	C24 CH3O FAME	mic
48.80	FAME	lipide
48.88	C29 alcano	alcano
49.40	C26 FAME	mic
49.90	C24. CH3O FAME	lipide
50.55	alcano	alcano
50.69	sterolo	sterolo
50.90	sterolo	sterolo
51.56	fitosterolo	sterolo
51.67	sterolo	sterolo
52.17	alcano	alcano
52.69	C28 FAME	mic
52.88	sterolo	sterolo
53.77	alcano	alcano
54.95	sterolo	sterolo
55.82	C30 FAME	lipide

Compost da pastazzo di limoni

RT	Libreria Nist	Origine
6.47	N derivato	N
7.00	2-metossi-fenolo	fenolo
7.09	N derivato	N
7.19	4-methyl fenolo	fenolo
7.34	1-CH ₃ O benzene	Lig P1
8.12	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
8.39	1-etil-4-CH ₃ O-benzene	Lig P3
8.69	3,5-dimetil-metilcarboidratoamate-fenolo	fenolo
8.86	N derivato	N
8.94	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
9.30	2-metossi-4-metil-fenolo	fenolo
10.41	2,3-dimetossi-toluene	fenolo
11.01	CH ₃ O benzaldeide	Lig P4
11.28	acido benzoico, 4-metossi-metil estere	Lig P6
11.49	4-etil-2-metossi-fenolo	fenolo
11.62	4-isopropil-tio-fenolo	fenolo
12.07	alcano	alcano
12.59	2-metossi-4-vinil-fenolo	fenolo
12.90	m/z 128	N
13.30	m/z 98	N
13.61	3,4-dimetossi-fenolo	fenolo
14.07	1,2,3-tri-CH ₃ O benzene	Lig S1
14.23	acido benzoico, 4-metossi-metil estere	Lig P6
14.51	C10 FAME	mic
15.13	2-metossi 4,1-propenil-fenolo (e)	fenolo
15.96	5-metossi-2-metil 1H-indole	N
16.42	2-metossi-4-(1-propenil)-fenolo	Lig G
17.27	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.77	alcano	alcano
18.43	C12 FAME	mic
19.65	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5
19.94	3,4-dimetossifenolinl-acetone	fenolo
20.36	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
20.59	3,4,5-trimetossi-benzaldeide	Lig S4
21.28	cis-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O-etilene	Lig G7
21.64	trans-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O-etilene	Lig G8
22.30	etanone, 1-(3,4,5-trimetossi fenolonil)-2-acido propenoico, 3-(4-metossifenolonil), metil estere	Lig S5 + Lig P18
23.80	acido benzoico, 3,4,5-trimetossi	Lig S6
23.99	C14 FAME	mic
24.37	trans-1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O-1-propene	Lig G13
25.23	cis-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O-etilene	Lig S7
25.65	C15 iso FAME	mic

25.75	trans-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O etilene	Lig S8
25.84	C15 ante-iso FAME	mic
26.58	C15 FAME	mic
28.07	acido propenoico trans-3-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-me	Lig G18
28.20	C16 iso FAME	mic
28.55	C16:1 FAME	mic
28.8	C16:1 FAME	mic
29.17	C16 FAME	mic
30.15	C17 iso FAME	mic
30.64	C17 ante-iso FAME	mic
30.83	C17 FAME	mic
31.11	C17 cy FAME	mic
31.51	C17 n-FAME	mic
32.17	1,2-dimetossietil-benzene	aromatico
32.44	C18 :1FAME	mic
33.00	C18 iso FAME	mic
33.22	C18:1 FAME	mic
33.34	C18:1 FAME	mic
33.84	C18 FAME	mic
34.22	2,2',5,5'-tetrametossibifenolonil	fenolo
34.68	C19 iso FAME	mic
34.75	C19 FAME	mic
35.47	alcano	alcano
35.70	cy C19 FAME	mic
37.61	C23 alcano	alcano
37.70	derivato dei carboidrati	carboidrato
38.16	C18 CH ₃ O FAME	mic
38.97	FAME	lipide
39.54	alcano	alcano
39.65	C24 alcano	alcano
40.06	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.21	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.31	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.09	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.53	alcano	alcano
41.63	C25 alcano	alcano
41.81	fenolo	fenolo
42.17	C22 FAME	lipide
42.71	C20, CH ₃ O, FAME	mic
43.53	C26 alcano	alcano
44.07	C23 FAME	mic
45.30	fenolo	fenolo
45.91	C24 FAME	lipide
46.41	C22,CH ₃ O, FAME	bipoliestere
47.29	squalene	squalene

47.91	C24, 2-CH3O, FAME	mic
49.39	C26 FAME	lipide
49.88	C24, CH3O, FAME	lipide
50.18	sterolo	sterolo
50.68	sterolo	sterolo
51.03	fitosterolo	sterolo
51.16	fitosterolo	sterolo
51.31	sterolo	sterolo
51.66	sterolo	sterolo
52.14	alcano	alcano
52.66	C28 FAME	mic
52.83	sterolo	sterolo
53.28	sterolo	sterolo
54.22	sterolo	sterolo
55.79	C30 FAME	mic

Compost da peperone

RT	Libreria Nist	Origine
5.94	2-idrossi-3-metil-2-ciclopenten-1-one	alcol
6.50	N derivato	N
7.04	2-metossi-fenolo	fenolo
7.77	alchene	alchene
8.12	1,2-di-CH ₃ O benzene	aromatico
9.38	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
10.16	C10 alcano	alcano
10.48	2,3-dimetossi-toluene	fenolo
10.68	2-metossi-fenolo	fenolo
11.55	4-etil-2-metossi-fenolo	fenolo
12.67	2-metossi-4-vinil-fenolo	fenolo
12.99	aromatico	aromatico
13.28	3,4-dimetossi-fenolo	fenolo
13.71	2,6-dimetossi-fenolo	fenolo
14.04	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
14.14	1,2,3-tri-CH ₃ O benzene	Lig S1
14.33	acido benzoico 4-metossi-metil estere	Lig P6
14.59	derivato dei carboidrati	carboidrato
14.98	metil-iso-euglenolo	aromatico
15.17	4,1-propenil 2-metossi fenolo (e)	fenolo
15.72	C10 FAME	lipide
16.51	2-metossi-4-(1-propenil)-fenolo (euglenolo)	Lig G
17.45	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.76	1,2-dimetossi-4-(1-propenil)-benzene	aromatico
18.14	2,4,6-trimetossistirene	aromatico
18.97	1-(4-isopropossi-3-metossifenolonil)-propan-2-one	aromatico
19.89	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5
20.18	3,4-dimetossifenolonil-acetone	fenolo
20.56	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
20.74	3,4,5-trimetossi-benzaldeide	Lig S4
21.31	3-(3,4-dimetossifenolonil)-acido propinoico	fenolo
21.41	cis-2-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-1-CH ₃ O etilene	Lig G7
21.78	trans-2-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-1-CH ₃ O etilene	Lig G8
22.46	cis-1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O 1-propene	Lig G9
22.70	cis-1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O 1-propene	Lig G11
22.77	1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-etanone	Lig S5
23.26	3-(3,4-dimetossifenolonil) acido propinoico	fenolo
23.52	2,6-dimetossi-4-(2-propenil)-fenolo	fenolo
23.89	acido benzoico 3,4,5-tri-CH ₃ O me	Lig S6
24.53	trans-1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O-1-propene	Lig G13
25.32	cis-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O-etilene	Lig S7
25.68	C15 ante FAME	mic

25.74	aromatico	aromatico
25.83	cis-1-(3,4,5-tri-CH3O fenolonil)-2-CH3O-etilene	Lig S7
26.08	aromatico	aromatico
26.60	C15 iso FAME	mic
26.92	aromatico	aromatico
27.35	aromatico	aromatico
28.00	cis-1-(3,4,5-tri-CH3O fenolonil)-1-CH3O propene	Lig G16
28.14	acido propenoico trans-3-(3,4-di-CH3O fenolonil)-3CH3O	Lig G18
28.20	C16 iso FAME	mic
28.44	N derivato	N
28.56	C16:1 FAME	mic
28.83	C16:1 FAME	mic
29.16	C16 FAME	mic
30.16	C17 ante FAME	mic
30.65	C17 iso FAME	mic
30.83	C17 ante-iso FAME	mic
31.07	2,2'-diamino-5,5'-dimetossi-bifenolonil	N
31.53	C17 FAME	mic
33.03	C18:2 FAME	lipide
33.22	C18:1 FAME	lipide
33.35	C18:1 FAME	lipide
33.57	3,3'-dimetossi-benidine	N
33.85	C18 FAME	lipide
34.30	isomero podocarpo-7en-3-one dimetile	terpeni
35.48	C16.CH3O. FAME	alcol
35.71	cy C19 FAME	mic
36.16	2,2',5,5'-tetrametossybifenolonil	aromatico
37.62	C23 alcano	alcano
38.17	C20 FAME	lipide
38.23	aromatico	aromatico
38.90	FAME	lipide
39.00	FAME	lipide
39.11	3,3'.4,4'-tetrametossistilbene	aromatico
39.18	fenolo	fenolo
40.68	aromatico	aromatico
42.18	C22 FAME	lipide
44.07	C23 FAME	lipide
44.63	sterolo	sterolo
45.39	sterolo	sterolo
45.80	sterolo	sterolo
45.92	C24 FAME	lipide
46.53	sterolo	sterolo
47.06	sterolo	sterolo
47.30	squalene	alchene
47.67	C24. 2-CH3O FAME	alcol

48.86	alcano	alcano
48.97	α -(3,4-dimetossifenolonil) tetraidro-3-idrossi-4-veratril-3-furanmetanolo	alcol
49.39	C26 FAME	lipide
49.88	C24. 24-CH3O. FAME	alcol
51.03	C28-CH3O	alcol
51.32	sterolo	sterolo
51.66	sterolo	sterolo
52.14	C31 alcano	alcano
52.66	C28 FAME	lipide
53.13	sterolo	sterolo
54.22	C32 alcano	alcano
54.48	sterolo	sterolo
55.79	C30 FAME	lipide

Tabella A2: Elenco dei composti ottenuti in seguito a pirolisi con TMAH, identificate mediante l'uso della libreria Nist delle sostanze uniche estratte da compost da caffè, carciofo, pastazzo di limoni e peperone

*Lig = derivato ligninico, G = unità guaiaciliche, S = unità siringiliche, P = unità p-idrossifeniliche, N=azoto, FAME =esteri metilici di acidi grassi lineari, mic = acidi grassi di origine microbica

Sostanze uniche estratte da compost da caffè

RT	Libreria Nist	Origine
5.73	1-metossi 4-metil benzene	Lig P2
5.88	acido butanedioico dimetil estere	aromatico
6.04	2-dodecil-1-metil-pirrolidina	N
7.06	fenolonol-3methyl	fenolo
8.18	2,4-dimetil-fenolo	fenolo
8.42	1-etenil-4 CH ₃ O-benzene	Lig P3
8.64	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
9.84	m/z 128	N
10.09	N derivato	N
10.92	mequinolo	fenolo
11.08	metossi benzaldeide	Lig P4
11.33	5-metil-indolizina	N
11.53	1,4-etil 2-metossi-fenolo	fenolo
11.76	4-(2-acetilfuran-5-il)-2-tiazolammina	N
12.33	1,2,3-tri-CH ₃ O benzene	aromatico
12.93	m/z 128	N
13.19	acido benzoico 4-metossi metil estere	Lig P6
13.37	m/z 98	N
13.65	2-dimetossi fenolo	fenolo
13.94	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
14.08	1,2,3-tri-CH ₃ O benzene	Lig S1
14.25	acido benzoico 4-metossi metil estere	Lig P6
14.52	2-acido propenoico 3-fenolonil-metil estere (e)	lipide
14.83	1,2,3-metossi 5-metil-benzene	Lig S2
15.02	N derivato	N
15.43	N derivato	N
15.68	N derivato	N
16.00	1-3-diidro-1-metil 2H indol-2one	N
16.18	5-metossi-2-metil 1H indole	N
17.28	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
18.29	C12 FAME	lipide
18.42	2,3,5-trimetil 1H indole	N
18.53	acido benzenepoico 4-metossi metil estere	Lig P12
19.63	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5

20.32	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
20.54	3,4,5-trimetossi-benzaldeide	Lig S4
21.22	2,5-dimetossi-n,n-dimetilbenzilammina	iso Lig G7-G8
21.58	m/z 98	N
21.78	1,2,3-trimetossi-5-(2-propenil)-benzene	Lig S
22.63	acido propenoico 1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-2,3-(4-metossifenolonil)-metil estere	Lig S5 + Lig P18
23.41	alcol	alcol
23.71	acido benzoico 3,4,5-trimetossi metil estere	Lig S6
23.77	C14 FAME	mic
24.26	cis-1-(3,4-di-CH3O fenolonil)-3-CH3O 1-propene	Lig G9
25.15	cis-2-(3,4-di-CH3O fenolonil)-1-CH3O etilene	Lig G7
25.42	C15 iso FAME	mic
25.50	N derivato	N
25.64	acido benzoico 4-[(trimetilsilil)oxi]-metil estere	aromatico
25.85	1-(3,4-di-CH3O fenolonil)-1,2,3-tri CH3O propano (treo/eritro)	Lig G14
25.97	3-metil-6-(fenolonilmetil)-2,5-piperazinedione	N
26.14	1-(1-idrossiesil)-2,5-dimetossi benzene	aromatico
26.37	C15 FAME	mic
27.78	cis-1-(3,4,5-tri-CH3O fenolonil)-1-CH3O propene	Lig G16
28.04	acido propenoico trans-3-(3,4-di-CH3O fenolonil)-3CH3O	Lig G18
28.22	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S15
28.49	3-(4'-metossi-1,1'-bifenolonil-4-il) butanenitrile	N
28.88	C16 FAME	mic
28.46	[1,2-a]-pirazine-1,4-dione, esaidro-3-(2-metilpropil)- pirrolo	N
30.29	trans 2-acido propenoico-3-(3,4,5-trimetossifenolinil)-metil estere	Lig S18
30.37	C 17ante FAME	mic
30.56	C 17 iso FAME	mic
31.12	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-prop-1-ene	Lig S16
31.24	N derivato	N
32.92	C18:1 FAME	mic
33.06	C18:1 FAME	mic
33.55	C18 FAME	lipide
35.40	cy C19 FAME	mic
37.26	m/z 98	N
37.85	C20 FAME	lipide
38.06	N derivato	N
39.18	[1,2-a] pirazina-1,4-dione,esaidro-3-(fenolinmetil) pirrolo	N
39.29	N derivato	N
41.81	C22 FAME	lipide
43.69	C23 FAME	lipide
45.04	3,3',4,4'-tetrametossistilbene	aromatico
45.49	C24 FAME	lipide
46.03	sterolo	sterolo
46.85	squalene	sterolo

47.23	C26 Ome	alcol
47.48	C24 2-CH3O FAME	mic
47.64	aromatico	aromatico
47.80	alcol	alcol
48.00	sterolo	sterolo
48.93	C26 FAME	lipide
49.08	sterolo	sterolo
49.21	sterolo	sterolo
49.43	sterolo	sterolo
50.21	sterolo	sterolo
50.43	sterolo	sterolo
50.54	C28-CH3O	alcol
50.70	sterolo	sterolo
51.17	sterolo	sterolo
51.50	sterolo	sterolo
52.16	C28 FAME	lipide
52.37	sterolo	sterolo
52.78	fitosterolo	sterolo
53.71	fitosterolo	sterolo
53.95	sterolo	sterolo
54.57	sterolo	sterolo
54.73	sterolo	sterolo
54.93	alcol	alcol
55.24	C30 FAME	lipide

Sostanze uniche da compost da carciofo

RT	Libreria Nist	Origine
7.01	fenolo	fenolo
7.24	metossi benzene	Lig P1
8.40	1-etenil-4 CH ₃ O-benzene	Lig P3
8.61	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
8.95	dimetossi benzene	carboidrato
9.74	m/z 128	N
9.88	N derivato	N
10.03	N derivato	N
10.39	3,4-dimetossi toluene	Lig G2
10.70	2,6-dimetossi fenolo	carboidrato
11.07	metossi benzaldeide	Lig P4
11.28	1-metil-1H-indole	N
12.31	1,2,3-tri-CH ₃ O benzene	Lig S1
12.56	1-(4-metossifenolonil)-etanone	Lig P5
12.87	m/z 128	N
13.23	m/z 98	N
13.56	dimetossi fenolo	carboidrato
13.90	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
14.02	1,2,4-trimetossi benzene	carboidrato
14.20	acido benzoico 4-metossi metil estere	Lig P6
14.49	2-acido propenoico, 3-fenolonil-metil estere (e)	lipide
14.80	1,2,3-metossi 5-metil-benzene	Lig S2
15.35	m/z 128	N
15.61	m/z 128	N
15.95	1,3-diidro-1-metil-2H-indol-2-one	N
16.10	5-metossi-2-metil-1H-indole	N
16.37	N derivato	N
17.25	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.59	1,2-dimetossi-4-(1-propenil) benzene	Lig G21
18.00	2,5-dimetossi-n,n-dimetilbenzilammina	iso Lig G7 -G8
18.49	acido benzenopropanoico, 4-metossi, metil estere	Lig P12
18.58	1,2,3,4-tetrametossi benzene	carboidrato
19.59	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5
20.35	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
20.53	3,4,5-trimetossi-benzaldeide	Lig S4
21.00	m/z 98	N
21.22	cis-1-metossi-2-(3,4-dimetossifenolonil) etilene	Lig G7
21.56	trans-1-metossi-2-(3,4-dimetossifenolonil) etilene	Lig G8
21.77	trans-1-metossi-1-(3,4-dimetossifenolonil)-1-propene	Lig G11
22.61	2-acido propenoico, 3-(4-metossifenolonil)-metil estere	Lig P18
22.61	1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-etanone	Lig S5
23.76	acido benzoico, 3,4,5-trimetossi-metil estere	Lig S6
24.25	trans-3-metossi-1-(3,4-dimetossifenolonil)-1-propene	Lig G13

25.14	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-2-metossi etilene	Lig S7
25.43	C15 iso FAME (C14, 13 metil, FAME)	mic
25.49	1-(3,4-di-CH3O fenolonil)-1,2,3-tri CH3O propano (treo/eritro)	Lig G14
25.64	C15 ante iso FAME (C14, 12 metil, FAME)	mic
25.64	trans-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-2-metossi etilene	Lig S8
25.84	1,2,3-trimetossi-1-(3,4-dimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig G15
26.13	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1-metossi-1-propene	Lig S10
27.76	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-1-propene	Lig G16
27.98	acido propenoico trans-3-(3,4-di-CH3O fenolonil)-3CH3O	Lig G18
28.21	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S14
28.32	C16:1 FAME	mic
28.48	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S15
28.88	C16 FAME	lipide
28.98	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-prop-1-ene	Lig S16
30.29	trans 2-acido propenoico-3-(3,4,5-trimetossifenolinil)-metil estere	Lig S18
30.37	C17 iso FAME (C16, 15 metil, FAME)	mic
30.56	C17 ante iso FAME (C16, 14 metil, FAME)	mic
31.10	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-prop-1-ene	Lig S16
32.90	C18:1 FAME	lipide
33.04	C18:1 FAME	lipide
33.53	C18 FAME	lipide
33.76	isomero podocarpo-7-en 3-one dimetil	lipide
34.02	isomero podocarpo-7-en 3-one dimetil	lipide
36.69	sterolo	sterolo
37.82	C20 FAME	lipide
37.98	N derivato	N
39.16	N derivato	N
39.92	N derivato	N
40.05	sterolo	sterolo
41.79	C22 FAME	lipide
43.66	C23 FAME	lipide
45.00	3,3',4,4'-tetrametossistilbene	aromatico
45.48	C24 FAME	lipide
46.84	squalene	sterolo
47.22	C26-Ome	alcol
47.6	aromatico	aromatico
48.38	alcano	alcano
48.93	C26 FAME	lipide
49.43	C24, 24-CH3O, FAME	lipide
50.54	C28-CH3O	alcol
52.17	C28 FAME	lipide
54.42	sterolo	sterolo
55.25	C30 FAME	lipide

Sostanze umiche estratte da compost da pastazzo di limoni

RT	Libreria Nist	Origine
6.75	2-metossi fenolo	fenolo
7.24	1-metossi 4-metil benzene	Lig P2
7.87	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
8.13	1-etenil-4 CH ₃ O-benzene	Lig P3
8.34	dimetossi benzene	carboidrato
8.53	3,4-dimetossi fenolo	fenolo
9.01	2,3-dimetossi fenolo	fenolo
9.42	m/z 128	N
9.74	4-ammino-1-metil-5-nitropirazolo	N
9.88	2,6-dimetossi fenolo	carboidrato
10.13	3,4-dimetossi toluene	Lig G2
10.42	polisaccaride	carboidrato
10.99	1-metil 1H-indole	N
12.03	1,2,3-tri-CH ₃ O benzene	Lig S1
12.24	1-(4-metossifenolonil)-etanone	Lig P5
12.33	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
12.60	m/z 128	N
13.02	m/z 98	N
13.30	dimetossi fenolo	carboidrato
13.63	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
13.91	acido benzoico 4-metossi metil estere	Lig P6
14.21	2-acido propenoico, 3-fenolonil, 1-metil estere	biopolimero
15.11	m/z 128	N
15.27	1,3-(2H)-dione,2-metil 1H-isoindole	aromatico
15.38	m/z 128	N
15.84	1-metossi, 2-metil 1H-indole	N
16.06	N derivative	N
16.90	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.32	1,2-dimetossi-4-(1-propenil) benzene	Lig G21
17.75	2,5-dimetossi-n,n-dimetilbenzilammina	iso Lig G7 -G8
18.09	C12 FAME	mic
18.22	acido benzenepropanoico, 4-metossi, metil estere	Lig P12
19.30	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5
20.05	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
20.22	3,4,5-trimetossi-benzaldeide	Lig S4
20.93	cis-1-metossi-2-(3,4-dimetossifenolonil) etilene	Lig G7
21.30	trans-1-metossi-2-(3,4-dimetossifenolonil) etilene	Lig G8
21.52	trans-1-metossi-1-(3,4-dimetossifenolonil)-1-propene	Lig G11
22.33	2-acido propenoico, 3-(4-metossifenolonil)-metil estere	Lig P18
22.35	1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-etanone	Lig S5
22.61	C14 FAME ramificato (non è nota la posizione del doppio legame)	mic
23.52	acido benzoico, 3,4,5-trimetossi-metil estere	Lig S6
23.62	C14 FAME	mic

24.01	trans-3-metossi-1-(3,4-dimetossifenolonil)-1-propene	Lig G13
24.90	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-2-metossi etilene	Lig S7
25.27	tre/eritro 1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-1,2,3-tri CH ₃ O propano	Lig G14
23.43	2-amino-5-isopropil-8-metil-1-azulenecarboidrato nitrile	aromatico
25.45	C15 ante-iso FAME (C14,12 metil, FAME)	mic
25.66	1,2,3-trimetossi-1-(3,4-dimetossifenolonil) propano (tre/eritro)	Lig G15
25.79	1-(1-idrossiesil)-2,5-dimetossi benzene	aromatico
25.92	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1-metossi-1-propene	Lig S10
26.18	C15 FAME	mic
26.46	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-1-propene	Lig G16
27.20	acido propinoico 3-(4,5-metilenediossibifenolonil-2-il)	fenolo
27.53	trans-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O-1-propene	Lig S13
27.78	acido propenoico trans-3-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3CH ₃ O	Lig G18
28.04	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S14
28.16	11-acido esadecenoico, metil estere	lipide
28.30	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S15
28.74	C16 FAME	mic
28.84	aromatico	aromatico
30.22	C17 FAME	mic
30.41	C17 ante-iso FAME	mic
30.79	trans 2-acido propenoico-3-(3,4,5-trimetossifenolinil)-metil estere	Lig S18
30.87	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-prop-1-ene	Lig S16
31.95	terpene	terpene
32.76	C18:1 FAME	mic
32.90	C18:1 FAME	lipide
33.03	fitolo	alcol
33.39	C18 FAME	lipide
33.50	polifenolo	polifenolo
33.79	isomero podocarpo-7-en 3-one dimetil	lipide
33.98	C18:1 FAME	mic
34.22	C19 FAME	mic
34.31	C19 iso FAME	mic
35.01	C16	mic
35.25	alcol	alcol
35.97	1-metil-4-(4-fenolonilcicloesil) piperazina	aromatico
37.12	C23 alcano	alcano
37.69	C20 FAME	mic
43.58	C23 FAME	mic
45.41	C24 FAME	mic
45.91	C22 FAME	mic
47.16	1-esacosanolo	alcol
48.85	C26 FAME	mic
49.36	C24 FAME	mic
50.01	alcano	alcano
50.51	alcol	alcol

50.62	sterolo	sterolo
51.10	sterolo	sterolo
51.59	alcano	alcano
52.13	C28 FAME	mic
52.72	sterolo	sterolo
53.18	alcano	alcano
53.67	sterolo	sterolo

Sostanze umiche estratte da compost da peperone

RT	Libreria Nist	Origine
6.46	N derivato	N
6.73	2-metossi fenolo	fenolo
6.79	metossi benzene	Lig P1
7.07	N derivato	N
7.23	N derivato	N
7.85	1,4-dimetossi benzene	carboidrato
8.11	1-etenil-4 CH ₃ O-benzene	Lig P3
8.32	2,4-dimetossi fenolo	fenolo
8.64	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
9.29	m/z 128	N
9.64	4-ammino-1-metil-5-nitropirazolo	N
10.33	2,6-dimetossi fenolo	carboidrato
10.47	3-metossi fenolo	fenolo
10.95	metil 1H-indole	N
11.72	derivato dei carboidrati	carboidrato
11.97	1,2,5-tri-CH ₃ O benzene	carboidrato
12.18	2-metossi-4-vinil fenolo	fenolo
12.52	m/z 128	N
12.89	m/z 98	N
13.18	2,6-dimetossi fenolo	carboidrato
13.30	1-(4-metossifenolonil)-etanone	Lig P5
13.59	4-etenil-1,2-dimetossi-benzene	Lig G3
13.70	1,2,3-trimetossi benzene	Lig S1
13.88	acido benzoico 4-metossi metil estere	Lig P6
14.16	2-acido propenoico, 3-fenolonil, metil estere (e)	biopolimero
14.82	1,3,5-trimetossi benzene	carboidrato
15.02	m/z 128	N
15.27	m/z 128	N
15.55	1,3-diidro-1-metil 2H-indol-2-one	N
15.76	5-metossi-2-metil 1H-indole	N
15.79	4-metossi-2-metil-1-(metiltio) benzene	aromatico
15.99	2-metossi-4-(1-propenil) fenolo (euglenolo)	Lig G
16.10	acido benzoico, 3,4,5-trimetossi	Lig S
16.86	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.29	1,2-dimetossi-4-(1-propenil) benzene	Lig G21
17.34	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.69	2,5-dimetossi-n,n-dimetilbenzilammina	iso Lig G7 -G8
17.96	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6
18.05	C13 iso FAME	mic
18.17	acido benzenepropanoico, 4-metossi, metil estere	Lig P12
18.26	1,2,3,4-tetrametossi benzene	carboidrato
19.26	1-(3,4-dimetossifenolonil)-etanone	Lig G5
20.08	acido benzoico 3,4-dimetossi-metil estere	Lig G6

20.22	3,4,5-trimetossi-benzaldeide	Lig S4
20.40	m/z 98	N
20.81	acido acetico, 2-(3,4-dimetossifenolonil)-metil estere	Lig G24
20.89	cis-1-metossi-2-(3,4-dimetossifenolonil) etilene	Lig G7
20.92	trans-1-metossi-2-(3,4-dimetossifenolonil) etilene	Lig G8
21.26	2,5-dimetossi-4-etil benzaldeide	iso Lig G7-G8
21.33	cis-1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O-1-propene	Lig G9
21.51	trans-1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3-CH ₃ O-1-propene	Lig G10
22.00	trans-3-metossi-1-(3,4-dimetossifenolonil)-1-propene	Lig G13
22.29	etanone 1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-2-acido propenoico, 3-(4-metossifenolonil)-metil estere	Lig S5+ Lig P18
23.24	n,n,9-trimetil 9H-purin-6-amine	aromatico
23.43	acido benzoico, 3,4,5-trimetossi-metil estere	Lig S6
23.59	C14 iso FAME	mic
23.97	trans-3-metossi-1-(3,4-dimetossifenolonil)-1-propene	Lig G13
24.51	acido propinoico 3-(2,3,4-trimetossifenolonil)	Lig S12
24.65	2,3-diidro-1-fenolonil 4(1H)-quinazolinone	aromatico
24.84	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-2-metossi etilene	Lig S7
25.25	1-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-1,2,3-tri CH ₃ O propano (treo/eritro)	Lig G14
25.37	trans-1-(3,4,5-tri-CH ₃ O fenolonil)-2-CH ₃ O etilene	Lig S8
25.60	1,2,3-trimetossi-1-(3,4-dimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig G15
25.72	1-(1-idrossiesil)-2,5-dimetossi benzene	aromatico
25.88	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1-metossi-1-propene	Lig S10
27.49	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-1-propene	Lig G16
27.68	acido propenoico trans-3-(3,4-di-CH ₃ O fenolonil)-3CH ₃ O	Lig G18
27.98	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S14
28.14	C16:1 FAME	mic
28.24	1,2,3-trimetossi-1-(3,4,5-trimetossifenolonil) propano (treo/eritro)	Lig S15
28.71	C16 iso FAME	Mic
29.42	m/z 98	N
30.20	C17 iso FAME	mic
30.37	C17 ante-iso FAME	mic
30.69	metil 9,10-metilene-esadecanoato	mic
30.74	trans 2-acido propenoico-3-(3,4,5-trimetossifenolinil)-metil estere	Lig S18
30.84	cis-1-(3,4,5-trimetossifenolonil)-1,3-dimetossi-prop-1-ene	Lig S16
31.68	1,2-dimetossietil benzene	aromatico
32.74	C18:1 FAME	lipide
32.88	C18:1 FAME	lipide
33.37	C18 FAME	lipide
33.49	isomero podocarpo-7-en 3-one dimetil	terpenoide
33.75	isomero podocarpo-7-en 3-one dimetil	Lig
33.95	C16, 16 CH ₃ O FAME	biopolimero
35.23	cy C19 FAME	lipide
36.21	β -metossi- α -fenolonilfenolonetil alcol	Lig
36.44	acido benzoico 3-(3,4-dimetossifenolonossi)-4-metossi	Lig

36.79	C16, 8(9,10)-16 di CH3O, FAME	cutina
37.60	alcol	alcol
37.70	C20 FAME	lipide
41.68	1,2-benzenedicarboidratoossilico acido, mono(2-etilesil) estere	aromatico
43.56	C23 FAME	mic
45.37	C24 FAME	lipide
45.89	C22, 22-CH3O, FAME	bipoliestere
45.92	C20:3 FAME	lipide
46.77	squalene	squalene
47.15	C26-Ome	alcol
47.39	C24, 2-CH3,FAME	mic
48.35	alcano	alcano
48.86	C26 FAME	lipide
49.35	C24, 24-CH3O,FAME	biopolimero
50.00	alcano	alcano
50.6	sterolo	sterolo
51.61	alcano	alcano
52.12	C28 FAME	lipide
52.72	sterolo	sterolo
53.19	alcano	alcano
53.66	sterolo	sterolo
53.88	sterolo	sterolo
55.22	C30 FAME	lipide

Tabella A3: Elenco dei composti ottenuti in seguito a pirolisi con TMAH, identificate mediante l'uso della libreria Nist degli estratti in etanolo da compost da pastazzo di limoni, da carciofo e da caffè

*Lig = derivato ligninico, G = unità guaiaciliche, S = unità siringiliche, P = unità p-idrossifeniliche, N=azoto, FAME =esteri metilici di acidi grassi lineari, mic = acidi grassi di origine microbica

Estratti in etanolo (70%) da compost da pastazzo di limoni

RT	Libreria Nist	Origine
6.57	2,3,4-trimetil-ciclopenten-2-ene-1-one	alchene
7.22	C8 FAME	lipide
7.70	1,2-di-CH ₃ O benzene	Lig G1
7.95	1-(2-metilfenil)-etanone	fenolo
8.42	acido benzenacetico metil-ester	biop
8.97	C11 alcano	alcano
9.29	C12 alcano	alcano
9.53	C9 FAME	mic
9.80	1,4:3,6-dianidro- α -D-glucopiranosio	carboidrato
10.59	alcano	alcano
10.77	aromatico	aromatico
11.57	C12 alcano	alcano
11.83	1,2,3-trimetossi benzene	Lig S1
12.03	2-Metossi-4-Vinil fenolo	fenolo
12.20	C10 FAME	lipide
12.35	m/z 128	N
12.66	fenolo	fenolo
13.03	2,4-dimetossifenolo	fenolo
13.16	aromatico	aromatico
13.44	4-etil 3,4-dimetossi benzene	Lig G3
13.55	1,2,3-trimetossi benzene	Lig S1
13.71	acido benzoico, 4-CH ₃ Ome	Lig P6
14.00	FAME	lipide
14.15	derivato dei carboidrati	carboidrato
14.38	C14 alcano	alcano
15.10	m/z 128	N
15.18	fenolo	fenolo
15.30	acido acetico 4-metossi, metil estre	Lig P
15.42	fenolo	fenolo
15.61	aromatico	aromatico
16.09	C16 alcano	alcano
16.18	alcano	alcano
16.74	3,4-dimetossi benzaldeide	Lig G4
17.00	alchene	alchene
17.13	benzene	aromatico
17.24	C15 alcano	alcano
17.54	2,4,6-trimetossidtirene	Lig S3
17.91	C12 FAME	lipide
19.10	1-(3,4-dimetossi-fenil)-etanone	Lig G5
19.40	3,4-dimetossi-fenil acetone	Lig G
19.68	C13 iso FAME	mic

19.84	acido benzoico, 3,4-Di-CH ₃ Ome	Lig G6
20.06	C16 alcano	alcano
20.70	C13 FAME	lipide
20.76	cis-2-(3,4-Di-CH ₃ O fenil)-1-CH ₃ O etilene	Lig G7
21.13	trans-2-(3,4-Di-CH ₃ O fenil)-1-CH ₃ O etilene	Lig G8
22.16	derivato lignina	Lig S5 + Lig P18
22.47	C14 iso FAME	lipide
22.81	C17 alcano	alcano
23.28	acido benzoico 3,4,5-Tri-CH ₃ Ome	Lig S6
23.51	C14 FAME	lipide
23.86	Cis-1-(3,4-Di-metossi fenil)-1-CH ₃ O-1-propene	Lig G11
25.23	C15 iso FAME	mic
25.43	C15 ante-iso FAME	mic
25.49	C18 alcano	alcano
26.09	C15 FAME	lipide
26.19	C16 FAME	lipide
27.11	C16 ante FAME	mic
27.80	C16 iso FAME	mic
27.80	C16 ante-iso FAME	mic
28.11	C16:1 FAME	mic
28.37	C16:1 FAME	mic
28.84	C16 FAME	lipide
29.54	C17 cy FAME	mic
29.70	C17 ante FAME	mic
30.24	C17 iso FAME	mic
30.44	C17 ante-iso FAME	lipide
30.49	C20 alcano	alcano
30.68	C17 cy FAME	mic
31.04	C17 FAME	mic
31.95	terpene	lipide
32.00	C18 iso FAME	mic
32.61	C18 ante-iso FAME	mic
32.89	C18:1 FAME	mic
32.96	C18:1 FAME	mic
33.13	alcol	alcol
33.47	C18 FAME	mic
33.52	terpene	lipide
33.80	C18:2 FAME	lipide
33.98	C18:2 FAME	lipide
34.24	C19 ante FAME	mic
34.33	C19 iso FAME	mic
34.70	derivato dei carboidrati	carboidrato
34.75	C19 ante-iso FAME	mic
35.02	C22 alcano	alcano
35.31	C19 cy FAME	mic
35.57	C19 FAME	lipide
36.89	C20 iso FAME	lipide
36.99	C20:2 FAME	lipide
37.12	C23 alcano	alcano
37.30	derivato dei carboidrati	carboidrato

37.73	C20 FAME	lipide
37.96	alcano	alcano
38.49	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.05	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.44	alcano	alcano
39.60	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.74	C21 FAME	lipide
40.30	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.85	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.16	C25 alcano	alcano
41.78	C22 FAME + carboidrato	lipide+carboidrato
42.02	derivato dei carboidrati	carboidrato
42.95	derivato dei carboidrati	carboidrato
43.42	C24 alcol (tetracosanolo)	alcol
43.64	C23 FAME	lipide
43.90	C22,2-CH3O, FAME	mic
44.75	C24 iso FAME	lipide
44.92	acido deidroabietico	terpene
45.54	C24 FAME	lipide
45.96	C22, 22 idrossi acido	lipide (cutina)
46.56	C25 FAME	lipide
47.31	C26 Alcol	alcol
47.51	C24,2-CH3O, FAME	mic
48.55	alcol	alcol
48.69	alcol	alcol
49.04	C26 FAME	lipide
49.19	C25,2-CH3O FAME	mic
49.33	α -tocoferol- β -D-mannoside	carboidrato
49.45	C24,CH3O, FAME	lipide
50.61	C28-CH3O	alcol
50.72	sterolo	sterolo
51.19	sterolo	sterolo
51.37	sterolo	sterolo
51.75	sterolo	sterolo
52.28	C28 FAME	lipide
52.39	sterolo	sterolo
52.72	sterolo	sterolo
52.84	sterolo	sterolo
53.46	sterolo	sterolo
53.82	sterolo	sterolo
54.01	sterolo	sterolo
54.30	sterolo	sterolo
54.82	sterolo	sterolo
55.36	C30 FAME	lipide
56.17	alcano	alcano
56.66	sterolo	sterolo
56.84	sterolo	sterolo
60.30	acido monogliceride	lipide

Estratti in etanolo (70%) da compost da caffè

RT	Libreria Nist	Origine
6.57	2-metossi fenolo	fenolo
6.72	acido benzoico etil-estre	aromatico
7.07	3,5-dimetil-fenolo	fenolo
7.22	FAME	lipide
7.27	N derivato	N
7.45	2,5-Dione, 1-Etil-1H-pirrolo	N
7.70	1,2- dimetossi benzene	Lig G1
7.95	1-etil, 4-metossi-benzene	Lig P3
8.05	2,4- dimetil-fenolo	Fenolo
8.16	3,4-dimetossi-benzene	Lig G3
8.24	2,3-dimetil-fenolo	fenolo
8.48	4-metossi, 3-metil-fenolo	fenolo
8.77	2metil-4-N-pentiltiano, S-S diosside	N
8.92	fenolo	fenolo
8.97	C12 alcano	alcano
9.14	m/z 128	N
9.30	C13 alcano	alcano
9.48	1,5,5-trimetil, 2,4-imidazolidinedione	N
10.60	C13 alcano	alcano
10.78	1,4-immine, 1,2,3,4-tetridro-9-metil naftalene	N
11.58	C13 alcano	alcano
11.85	1,2,3-trimetossi-benzene	Lig S1
12.21	C10 FAME	lipide
12.38	m/z 128	N
12.72	m/z 98	N
13.07	2,4-dimetossi-fenolo	fenolo
13.18	aromatico	aromatico
13.43	4-etenil 3,4-dimetossi-benzene	Lig G3
13.57	1,2,3-trimetossi-benzene	Lig S1
13.73	acido benzoico, 4-CH ₃ O,me	Lig P6
14.01	C11:1 FAME	mic
14.16	derivato dei carboidrati	carboidrato
14.39	C14 alcano	alcano
14.90	m/z 128	N
15.33	acido benzenacetico 4-metossi, metil estere	Lig P
15.45	fenolo	fenolo
15.63	5-metossi-2-metil 1H-indole	N
16.10	alcano	alcano
16.19	C15 alcano	alcano
16.44	1-(4-idrossi-3,5-dimetossifenil)-etanone	Lig S o P
16.75	3,4-dimetossi-benzaldeide	Lig G4
17.01	alchene	alchene
17.14	benzene	aromatico
17.24	C15 alcano	alcano
17.56	2,4,6-trimetossi stirene	Lig S3
17.91	C12 FAME	lipide
18.54	acido noonanedioico Dime+C12 FAME	lipide

19.05	C16 alcano	alcano
19.13	1-(3,4-dimetossi fenil) etanone	Lig G5
19.89	acido benzoico, 3,4-Di- CH3Ome	Lig G6
20.07	C16 alcano	alcano
20.80	cis-2-(3,4-Di-CH3O fenil)-1-CH3O etilene	Lig G7
21.15	trans-2-(3,4-Di-CH3O fenil)-1-CH3O etilene	Lig G8
22.21	derivato della lignina	Lig S5 + Lig P18
22.49	C14 iso FAME	lipide
22.82	C17 alcano	alcano
23.37	acido benzoico 3,4,5-Tri-CH3Ome	Lig S6
23.51	C14 FAME	lipide
23.58	alcol	alcol
23.88	cis-1-(3,4-Di-CH3O fenil)-3- CH3O,1-propene	Lig G9
24.47	2-esadecanone	alcol
24.84	Trans-1-(3,4,5-Tri-Ch 3 O fenil)-2- CH3O etilene	Lig S8
25.22	C15 ante FAME	mic
25.40	C15 iso FAME	mic
25.44	C15 ante-iso FAME	mic
25.52	C18 alcano	alcano
25.57	1-(3,4-Di- CH3O fenil)-1,2,3-tri CH3O propano	Lig G14
26.11	C15 FAME	lipide
26.19	C16 iso FAME	mic
26.53	sterolo	sterolo
27.13	C16 ante-iso FAME	mic
27.80	C19 alcano	alcano
28.03	1-(3,4,5 Tri-CH3O fenil)-1,2,3-Tri-CH3O propano	Lig S14
28.10	C16:1 FAME	mic
28.31	1-(3,4,5 Tri-CH3O fenil)-1,2,3-Tri-CH3O propano	Lig S15
28.35	C16:1 FAME	mic
28.76	C16 FAME	lipide
29.52	C17 cy FAME	mic
29.70	C17 ante FAME	mic
30.21	C17 iso FAME	mic
30.45	C17 ante-iso FAME	mic
30.50	C21 alcano	alcano
30.66	C17:1 FAME	mic
31.05	C17 FAME	lipide
31.11	C18 iso FAME	mic
31.94	terpene	lipide
32.06	C18:1 FAME	mic
32.56	derivato dei carboidrati	carboidrato
32.81	C18:1 FAME	mic
32.92	C18:1 FAME	mic
32.98	C18:1 FAME	mic
33.42	C18 FAME	lipide
33.49	terpene	lipide
34.21	C19 iso FAME	mic
34.29	C19 FAME	lipide
34.99	C22 alcano	alcano
35.27	C19 cy FAME	lipide

37.12	C23 alcano	alcano
37.44	derivato dei carboidrati	carboidrato
37.72	C18:1, 18 CH3O FAME	lipide
38.27	derivato dei carboidrati	carboidrato
38.57	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.08	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.76	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.85	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.72	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.93	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.17	C25 alcano	alcano
42.07	derivato dei carboidrati	carboidrato
42.29	C20, 20 CH3O FAME	lipide
42.58	derivato dei carboidrati	carboidrato
43.07	C26 alcano	alcano
43.42	C24 alcol (tetracosanolo)	alcol
43.63	C23 FAME	lipide
43.89	C22,2-CH3O, FAME	mic
44.90	C27 alcano	alcano
45.27	alcol	alcol
45.49	C24 FAME	lipide
45.61	1,3-acido benzenedicarbossilico, bis (2-etilesil) estere	aromatico
46.01	C22, 22-CH3O FAME	lipide
46.69	C28 alcano	alcano
46.82	squalene	sterolo
47.28	C26-Ome	alcol
47.50	C24, 2-CH3O FAME	lipide
48.41	C29 alcano	alcano
49.02	C26:1 FAME	mic
49.30	sterolo	sterolo
49.50	FAME:1	lipide
50.64	octacosanolo	alcol
50.83	Sterolo	sterolo
52.31	C28 FAME	lipide
52.40	sterolo	sterolo
52.76	sterolo	sterolo
52.85	sterolo	sterolo
53.31	sterolo	sterolo
53.83	sterolo	sterolo
54.05	sterolo	sterolo
54.50	sterolo	sterolo
55.40	C30 FAME	lipide
55.70	triterpenolo (pentaciclico)	sterolo
55.85	sterolo	sterolo
56.01	sterolo	sterolo
56.16	C35 alcano	alcano
56.81	sterolo	sterolo
57.47	sterolo	sterolo
57.61	sterolo	sterolo
58.40	sterolo	sterolo
58.64	C32 FAME	lipide

59.66 acido benzenepropanoico, 3,5-bis(1,1-dimetil)-4-idrossi, otactadecil estere aromatico

Estratti in etanolo (70%) da compost da carciofo

RT	Libreria Nist	Origine
7.7	1,2-dimetossi benzene	Lig G1
7.95	1-(2-metilfenil)-etanone	fenolo
8.16	1,4-dimetossi-benzene	carboidrato
8.98	C12 alcano	alcano
9.11	m/z 128	N
9.39	alcol	alcol
9.46	alcol	alcol
9.54	alcol	alcol
9.62	alcol	alcol
9.89	2-metossi fenolo	fenolo
10.05	fenolo	fenolo
10.12	fenolo	fenolo
10.56	alcano	alcano
10.76	aromatico	aromatico
11.79	cis 1,2,3-trimetossi-benzene	Lig S1
12.18	FAME	lipide
12.60	m/z 98	N
13.40	4-etenil 3,4-dimetossi benzene	Lig G3
13.51	trans 1,2,3-tri-CH ₃ O benzene	Lig S1
13.69	acido benzoico, 4-metossi, metil estere	Lig P6
15.04	m/z 128	N
15.51	1,2,3,4-tetrametossi-benzene	Lig S2
15.59	derivato dei carboidrati	carboidrato
16.66	derivato dei carboidrati	carboidrato
17.11	derivato dei carboidrati	carboidrato
17.87	C12 FAME	lipide
17.98	derivato dei carboidrati	carboidrato
18.08	derivato dei carboidrati	carboidrato
19.04	3,4-Di-CH ₃ O acetofenone	Lig G5
19.82	acido benzoico, 3,4-Di-CH ₃ Ome	Lig G6
22.1	derivato della lignina	Lig S5 + Lig P18
22.42	C14 iso FAME	lipide
22.77	C17 alcano	alcano
23.19	acido benzoico 3,4,5-tri-CH ₃ Ome	Lig S6
23.42	C14 FAME	lipide
23.49	alchene	alchene
24.65	trans-1-(3,4,5-Tri-CH ₃ O fenil)-2-etilene	Lig S8
25.12	C15 iso FAME	mic
25.32	C15 ante-iso FAME	mic
25.39	1-(3,4-Di-CH ₃ O fenil)-1,2,3-tri CH ₃ O propano	Lig G15
26.03	C15 FAME	lipide
26.44	alcano	alcano
27.52	acido proenoico trans-3-(3,4-Di-CH ₃ O fenil)-3-me	Lig G18
27.67	C16 iso FAME	mic
28.01	C16:1 FAME	mic
28.26	C16:1 FAME	mic

28.75	C16 FAME	lipide
29.45	C17 cy FAME	mic
29.61	C17 iso FAME	mic
30.11	C17 ante-iso FAME	mic
30.31	C17 FAME	lipide
30.40	C20 alcano	alcano
30.59	C17 cy FAME	mic
30.96	C17-N FAME	lipide
31.79	terpene	lipide
32.49	C18:2 FAME	mic
32.83	C18:1 FAME	mic
32.90	C18:1 FAME	mic
33.39	C18 FAME	lipide
33.77	C18:2 FAME	mic
33.97	C18:2 FAME	mic
34.17	C19 FAME	mic
34.25	C19 FAME	lipide
34.69	C18 :2 FAME	lipide
35.22	C19:1 FAME	mic
37.03	C20:1 FAME	mic
37.27	derivato dei carboidrati	carboidrato
37.72	C20 FAME	mic
38.09	derivato dei carboidrati	carboidrato
38.43	derivato dei carboidrati	carboidrato
38.97	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.60	derivato dei carboidrati	carboidrato
39.69	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.59	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.79	derivato dei carboidrati	carboidrato
40.79	derivato dei carboidrati	carboidrato
41.83	derivato dei carboidrati	carboidrato
42.37	derivato dei carboidrati	carboidrato
43.58	C23 FAME	lipide
43.86	C22, 2-CH3O, FAME	mic
45.44	C24 FAME	lipide
45.55	1,3-acido benzenedicarbossilico, bis(2-etilesil) estere	Lig
45.65	C23, 2-CH3O, FAME	mic
45.91.	C22, 22-CH3O, FAME	lipide
46.74	N derivato	N
47.17	C25 FAME	lipide
47.26	N derivato	N
47.46	C24, 2-CH3O, FAME	mic
48.92	C26 FAME	lipide
49.11	C25, 2-CH3O, FAME	mic
49.24	α -tocoferol- β -D-mannoside	carboidrato
49.39	C24, 24-CH3O, FAME	lipide
50.39	sterolo	sterolo
50.53	C28-CH3O	alcol
50.64	sterolo	sterolo
50.76	sterolo	sterolo
51.04	sterolo	sterolo

51.12	sterolo	sterolo
51.31	sterolo	sterolo
52.20	C28 FAME	lipide
52.36	sterolo	sterolo
52.81	sterolo	sterolo
53.81	sterolo	sterolo
54.00	sterolo	sterolo
54.72	sterolo	sterolo
54.77	derivato dei carboidrati	carboidrato
55.25	sterolo	sterolo
56.07	alcano	alcano
56.35	sterolo	sterolo
56.58	sterolo	sterolo
56.73	sterolo	sterolo
59.58	acido benzenopropanoico, 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-idrossioctdecil estere	aromatico