



Università  
Ca'Foscari  
Venezia

Corso di Laurea Magistrale  
in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

Estrazione e caratterizzazione chimica, mediante  
derivatizzazione in GC-MS, dei secreti antennali degli adulti  
di *Aromia bungii* (Faldermann, 1835)

**Relatore**

Prof. Fabio Aricò

**Correlatore**

Prof. Giacinto Salvatore Germinara

**Laureando**

Danilo Domenico Miolla

Matricola 849090

**Anno Accademico**

2019 / 2020

# INDICE

1 INTRODUZIONE.....	4
1.1 Premessa .....	4
1.2 Aromia bungii.....	4
1.2.1 Distribuzione geografica .....	4
1.2.2 Piante ospiti.....	5
1.2.3 Biologia e descrizione morfologica.....	5
1.2.4 Sintomi e danni.....	6
1.2.5 Prevenzione e lotta.....	6
2 SEMIOCHIMICI.....	7
2.1 Inquadramento generale.....	7
2.1.1 Semiochimici intraspecifici .....	7
2.1.2 Semiochimici interspecifici.....	9
2.1.3 Ricerca di semiochimici.....	10
2.2 Applicazione di semiochimici.....	11
2.3 Importanza del monitoraggio.....	13
2.3.1 Metodi di monitoraggio: il caso specifico di Aromia bungii.....	13
2.4 Stato dell'arte sui semiochimici di Aromia bungii.....	14
3 GC-MS: PRINCIPI E FUNZIONAMENTO.....	16
4 IDROCARBURI COME FEROMONI DI CONTATTO NEI CERAMBICIDI.....	17
4.1 Differenze qualitative e quantitative nei profili di idrocarburi di entrambi i sessi.....	19
5 DERIVATIZZAZIONE PER ANALISI GC-MS.....	21
5.1 Principali metodi di derivatizzazione.....	21
6 SCOPO DELLA TESI.....	23
7 MATERIALI E METODI.....	24
7.1 Materiali.....	24
7.2 Insetti.....	24
7.3 Preparazione degli estratti contenenti le secrezioni antennali.....	25
7.4 Reazione microanalitica di derivatizzazione.....	25
7.5 Analisi gascromatografica abbinata a spettrometria di massa (GC-MS).....	25
7.6 Saggi comportamentali.....	26
8 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	27
8.1 Caratterizzazione estratti di A. bungii.....	27
8.2 Derivatizzazione con DMDS degli idrocarburi insaturi.....	29
8.2.1 Derivatizzazione di dieni.....	29

<i>8.3 Derivatizzazione estratto del maschio di A. bungii</i> .....	30
<i>8.4 Derivatizzazione estratto della femmina di A. bungii</i> .....	35
<i>8.5 Discussione</i> .....	38
<i>9 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</i> .....	39
<i>10 IMMAGINI</i> .....	40
<i>11 BIBLIOGRAFIA</i> .....	44

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Premessa

Questo lavoro di tesi è incentrato sulla ricerca di semiochimici non volatili, in questo caso idrocarburi pesanti, secreti dai sensilli presenti sulle antenne di *Aromia bungii* (Faldermann, 1835) che giocano un ruolo importante nell'accoppiamento riproduttivo.

L'identificazione e la caratterizzazione degli idrocarburi, già sviluppata in un precedente studio (Di Palma et al. 2019) è stata nel presente lavoro ampliata, in particolar modo mediante la tecnica della derivatizzazione che ha permesso di attribuire la posizione del doppio legame C = C laddove è impossibile determinarlo utilizzando esclusivamente la tecnica cromatografica ifenata GC-MS.

Questo studio è di interesse notevole, in quanto permette di acquisire una maggiore conoscenza del sistema di comunicazione degli insetti, di definire una strategia di monitoraggio e controllo dell'insetto e quindi di prevenirne la diffusione nelle regioni ove attualmente è presente.

## 1.2 *Aromia bungii* (F.)

La specie *Aromia bungii* (Faldermann, 1835) (Coleoptera, Cerambycidae), nota anche come cerambicide dal collo rosso, è originaria del nord est asiatico. La particolarità di questo coleottero sono le larve, le quali danneggiano seriamente le drupacee (*Prunus*) provocando in molti casi la morte delle piante. In Cina e in Italia rappresenta un pericolo importante per i frutteti di drupacee. *A. bungii* è considerata quindi in Europa un nuovo potenziale organismo di quarantena ed è quindi obbligatoria la segnalazione e la lotta.

### 1.2.1 Distribuzione geografica

*A. bungii* è nativo di Corea, Cina, Mongolia e Russia orientale. L'insetto è considerato un pericoloso parassita e questo ha fatto sì che fosse considerato in Europa un nuovo potenziale organismo di quarantena (OMF-UFAG, RS 916.202.1). Sebbene dal 2011 sia stata bloccata l'introduzione dell'insetto in Europa, si sono comunque registrati focolai epidemici in Italia e in Germania. Uno dei focolai più importanti si è registrato nella Regione Campania. Altri meno consistenti si sono verificati in Lombardia e in Baviera. Nel 2013, l'insetto si è insediato anche in Giappone.

### **1.2.2 Piante ospiti**

*A. bungii* è considerato un coleottero molto pericoloso in grado di danneggiare le drupacee (*Prunus*) e provoca danni importanti ai frutteti, specie in Cina. L'insetto può essere trasportato su lunghe distanze tramite il commercio di legname (compreso quello utilizzato per gli imballaggi), i bonsai e i giovani alberi da frutto del genere *Prunus*. Le piante maggiormente infestate sono albicocco (*Prunus armeniaca*), susino (*Prunus domestica*), loto americano (*Diospyros virginiana*), olivo (*Olea europea*), pioppo bianco (*Populus alba*) e melograno (*Punica granatum*). Non è ancora chiaro se il coleottero è in grado di insediarsi su piante di altri generi. Le larve e le pupe di *A. bungii* vivono nel legname diversi mesi e ivi si sviluppano danneggiando di conseguenza i giovani fruttiferi.

### **1.2.3 Biologia e descrizione morfologica**

*A. bungii* compie un ciclo biologico di 2-4 anni a seconda delle condizioni climatiche. Gli adulti vivono circa 50 giorni e il volo avviene tra giugno e agosto. La livrea appare nera brillante e presenta un pronoto di colorazione rossa. In rarissimi casi compaiono individui completamente neri. Gli adulti hanno una lunghezza variabile dai 23 ai 37 mm e sono provvisti di lunghe antenne; nelle femmine quest'ultime sono lunghe quanto il corpo e nei maschi eccedono di poco la lunghezza del corpo del coleottero. Le femmine depongono le uova nelle fessure della corteccia, sul fusto e all'inserzione dei rami più grossi. Ogni femmina depone in media 340 uova di colore biancastro – giallo verdastro e di lunghezza 2 mm. Le uova si schiudono dopo circa 10 giorni e le larve cominciano a scavare gallerie sotto la corteccia nutrendosi del legno. Le giovani larve danneggiano così l'alburno (dove si trovano i vasi conduttori). Quelle più mature scavano gallerie fino a 60 cm. Le larve impiegano 20-33 mesi per svilupparsi e diventare pupe: passano così da 2 mm ad essere 42-52 mm di lunghezza. Esse sono biancastre con protorace rossastro, corpo di forma conica e possiedono un apparato boccale scuro. La metamorfosi si verifica nel durame e ivi le larve scavano una camera pupale. All'inizio le pupe sono di colore giallo chiaro e con il passare del tempo diventano più scure. L'adulto sfarfalla dopo 17-23 giorni. Il coleottero si adatta molto bene alle condizioni del nostro Paese in quanto le larve vivono all'interno del legno in inverno e gli adulti sfarfallano d'estate. Le larve sono attive dalla primavera al tardo autunno.

#### **1.2.4 Sintomi e danni**

Poco dopo la schiusura delle uova, si verifica l'attività trofica delle larve e questa si manifesta all'esterno con segni di rosura espulsa dalle gallerie scavate che si accumula alla base del tronco con la crescita delle larve. L'accumulo fa presagire la presenza di un insetto xilofago e alcune volte questo può essere provocato anche dal rodilegno rosso (*Cossus cossus*) oppure dal capnodio delle drupacee (*Capnodis tenebrionis*). Laddove sono presenti fori di dimensioni 6-10 x 10-16 mm, questo rappresenta la fuoriuscita degli adulti. Sezionando il fusto di una pianta infestata, si distinguono chiaramente le gallerie larvali nutrizionali e sottocorticali presenti nel legno. Le gallerie nutrizionali indeboliscono il legno rallentando la produzione di frutta e nei casi più gravi si ha la morte dell'albero. *A. bungii* in Cina causa ingenti danni economici negli impianti di drupacee. Anche in Campania molti frutteti sono stati decimati. Il cerambicide attacca prevalentemente gli alberi malati, ma senza trascurare le piante giovani e sane. Gli adulti si cibano di frutti maturi senza causare però danni visibili.

#### **1.2.5 Prevenzione e lotta**

La lotta è complicata in quanto le larve di *A. bungii* vivono ben riparate all'interno del legno ed è difficile se non impossibile rimuoverlo. A tal proposito l'importazione di legname e di drupacee da zone altamente infestate è sottoposta a severi controlli e il legname utilizzato per gli imballaggi va trattato termicamente. In caso di infestazione, si deve trattare sia il focolaio d'infestazione che la zona cuscinetto circostante. Il focolaio comprende tutte le piante colpite e quelle sospette, mentre la zona cuscinetto si estende per almeno 2 Km<sup>2</sup> attorno al focolaio stesso. Entro 100 m dal focolaio, tutte le drupacee devono essere estirpate e demolite e non è più possibile piantare nuove drupacee nella zona delimitata. Le misure restrittive vengono meno se per almeno quattro anni non si osservano più coleotteri adulti e/o danni causati da larve. Le drupacee potranno così essere esportate dalla zona delimitata e commercializzate già dopo due anni solo se corredate dal passaporto fitosanitario e verranno sottoposte a campionamenti casuali. La cattura dei coleotteri avviene tramite trappole contenenti aceto, vino o birra e queste consentono di rilevare precocemente un'eventuale infestazione. In Cina, per esempio, nelle aree interessate dal parassita si interviene estirpando le piante infestate e si impiegano ceppi di nematodi entomopatogeni (*Steinernema carpocapsae*) contro le larve e anche insetticidi contro adulti e uova. Anche i funghi entomopatogeni del genere *Beauveria* o *Metarhizium* riescono ad infettare ed eliminare *A. bungii*.

## 2. SEMIOCHIMICI

Stimoli visivi, tattili, sonori ed olfattivi sono alla base della vita degli insetti. La loro comunicazione è basata sullo scambio di messaggeri chimici o semiochimici (Law et al.,1971). Questi permettono all'insetto, ad esempio, di poter scegliere il proprio partner per l'accoppiamento, di intercettare la pianta ospite che permette ad esso di alimentarsi e di ovideporre e di localizzare la preda.

### 2.1 Inquadramento generale

I semiochimici (dal greco *semeion*, “segnale”) sono composti chimici che permettono la comunicazione tra gli organismi viventi e favoriscono modificazioni di carattere etologico, fisiologico o anatomico (Masutti et al.,2001). In natura abbiamo due tipologie diverse di comunicazione semiochimica: la prima si basa sui feromoni (dal greco *pherein*, “trasportare” e *ormao*, “stimolo”) che permettono di comunicare intraspecificatamente, cioè tra membri della stessa specie e la seconda si basa invece sugli allelochimici che permettono di comunicare interspecificatamente, cioè tra membri di specie e regni diversi (Reigner, 1971). Tuttavia, in certi casi si ha un solo segnale chimico che può comportarsi sia come feromone, sia come allelochimico (Howse et al., 1998).

#### 2.1.1 Semiochimici intraspecifici

Il feromone è una sostanza chimica che viene rilasciata da un animale e favorisce una reazione specifica in un membro della stessa specie (Karlson et al., 1959). I feromoni vengono emessi da punti specifici del corpo degli insetti e vengono prodotti da ghiandole specializzate a secrezione esterna. Essi vengono recepiti da recettori detti sensilli chemiorecettori posti in genere sulle antenne degli insetti. Le molecole feromoniche colpiscono i sensilli e penetrano nell'emolinfa sensillare giungendo alle terminazioni nervose. Gli impulsi che si generano vengono elaborati dal sistema nervoso centrale (SNC) in risposte fisiologiche o comportamentali. Le secrezioni feromonali emesse, vengono trasmesse tramite acqua, aria oppure vengono deposte sulla superficie del suolo e raggiungono l'organismo ricevente. Le risposte comportamentali possono avere effetto releaser, cioè immediato, oppure effetto primer, ossia rendono lente le risposte fisiologiche e morfologiche (Wilson et al., 1963; Tremblay et al., 1980). A seconda della risposta comportamentale che sono in grado di indurre, si riconoscono feromoni di aggregazione, di dispersione, di traccia, sessuali e feromoni di allarme o aggressione. Si riporta a seguire la descrizione specifica di questi composti:

- *Feromoni di aggregazione*: questi composti permettono ai membri della stessa specie di accoppiarsi abbattendo le difese della pianta concentrandosi presso la sorgente emettitrice (Birch et al., 1984).
- *Feromoni di dispersione*: limitano l'aggressione e l'emissione avviene quando, ad esempio, nell'ambiente si ha una densità eccessiva di insetti e questi, di conseguenza, sono indotti a disperdersi per ridurre la competizione.
- *Feromoni di traccia*: sono molto presenti tra gli insetti sociali e vengono rilasciati da un individuo e successivamente seguiti dalle specie medesime che indicano l'itinerario utile per raggiungere una nuova sede (Birch et al., 1984). Questo tipo di composto è più persistente rispetto a quello liberato dai feromoni di allarme.
- *Feromoni sessuali*: sono complessi blend chimici il quale componente principale (dotato di attività biologica elevata), funge inizialmente da attrattivo e in seguito, a concentrazione più elevata, da composto che il maschio avverte in prossimità della femmina (come arrestante e stimolante sessuale). La sostanza di richiamo agisce su lunghe distanze (anche oltre 7,5 km) e permette alla specie ricevente di orientarsi verso la sorgente stimolando questa a volare controvento (Rotundo et al., 2016). I componenti secondari, invece, agiscono a corto raggio e svolgono un'azione sinergica sull'attrazione, stimolando maggiormente il maschio nella ricerca del partner oppure arrestando il maschio che si trova in prossimità della femmina.
- *Feromoni di aggressione o allarme*: vengono emessi in situazioni di pericolo e provocano fuga e dispersione degli individui. A titolo d'esempio si riporta il caso degli afidi che, riconoscendo la presenza di un predatore, dai loro sifoni dorsali emettono sostanze come il trans- $\beta$ -farnesene che disgregano il gruppo (effetto centrifugo). Nel caso dei coleotteri carabidi, la stessa sostanza è utilizzata per localizzare la preda ed è usata da una specie come feromone e dall'altra come caiomone.

I composti del blend feromonico sono emessi in un preciso rapporto tale da permettere la "sinergia intraspecifica", cioè "richiamo-arresto-eccitazione". In tutti i casi, comunque, l'emissione di feromoni ha lo scopo di trasmettere un messaggio un segnale specifico creando in questo modo un canale di comunicazione che ha il vantaggio di essere esclusivo o privato per gli insetti coinvolti. I segnali chimici, inoltre, possono essere emessi anche durante la fase di buio senza che l'emittente si esponga e si metta in pericolo e vengono anche trasportate per lunghe distanze attraverso vento o correnti d'acqua, preservando così le energie dell'emittente. Tuttavia, è possibile anche che un segnale chimico possa non essere modificato o interrotto facilmente. (Howse et al., 1998).



### 2.1.2 *Semiochimici interspecifici*

I semiochimici interspecifici, definiti anche “allelochimici” (dal greco *allelon*, “reciproco”), sono messaggeri chimici che favoriscono la comunicazione tra specie e regni viventi diversi. Si distinguono in:

- *Allomoni* (dal greco *allos*, “altro”): sono sostanze chimiche che avvantaggiano l’organismo emittente e hanno funzione difensiva come repellenti o deterrenti per il nutrimento. Sono compresi in questa categoria alcuni metaboliti secondari prodotti dalle piante per scongiurare l’attacco dei fitofagi, l’odore repellente delle cimici, l’acido formico emesso dalle formiche.
- *Cairomoni* (dal greco *kairos*, “momento opportuno”): sono composti volatili favorevoli solamente all’organismo che li riceve (Tremblay, 1999). Rientrano in questo gruppo le sostanze volatili emesse dalle piante che richiamano fitofagi, gli odori presenti sulle uova che richiamano i parassitoidi oofagi (Celli et al., 1988).
- *Sinomoni* (dal greco *sin*, “insieme”): sono segnali utili sia all’organismo emittente che a quello ricevente (Tremblay, 1999). Esempi sono l’odore emesso dai fiori che attira insetti pronubi (Celli et al., 1988) e le sostanze volatili rilasciate da alcune piante che attirano i nemici naturali dei fitofagi.
- *Apneumoni* (dal greco *apnoia*, “mancanza di respiro”): sono odori emessi da substrati organici non viventi utili all’organismo ricevente. Fungono da messaggeri in specie sociali predatrici o parassito idi.
- *Antiferomoni*: utilizzati per l’isolamento riproduttivo e inibiscono i maschi eterospecifici.

Lo studio delle caratteristiche degli allelochimici e dei feromoni, ha permesso l’adozione di nuove strategie nella difesa delle piante e nel monitoraggio dei fitofagi. Di conseguenza, queste sostanze opportunamente utilizzate, possono modificare il comportamento degli insetti, diventando strumenti fondamentali in strategie di controllo ecocompatibili (Germinara, 2014).

### ***2.1.3 Ricerca di semiochimici***

La ricerca di un semiochimico si sviluppa attraverso varie fasi e interessa diverse competenze (Rotundo et al., 2015). Inizialmente si osserva il comportamento biologico per poi dimostrare l'eventuale coinvolgimento di una sostanza chimica nello specifico fenomeno. Come secondo step, bisogna isolare il composto bioattivo, identificare la struttura chimica e proseguire con ulteriori indagini chimiche e biochimiche ai fini di elaborare una sintesi della molecola e quindi studiarne il meccanismo d'azione. Si procede così, attraverso saggi comportamentali e fisiologici, per determinare la loro attività biologica. Infine, le molecole sintetizzate in laboratorio, vengono utilizzate in campo e quindi in agricoltura.

Per poter identificare un semiochimico è necessario seguire diversi step:

- Osservazioni comportamentali sull'accoppiamento che permettono di conoscere la natura comportamentale dell'insetto in esame e le condizioni nelle quali l'insetto emette il feromone (se questo viene emesso da insetti dello stesso sesso o da insetti di sesso opposto).
- Allevamento dell'insetto: la progenie di questo in laboratorio facilita la ricerca dato che esso possiede talvolta blend feromonici complessi.
- Progettazione di un biosaggio che permette la valutazione del comportamento dell'insetto e che esso abbia condizioni quanto più vicine alla realtà di campo.
- Estrazione di un semiochimico: prevede che l'insetto venga posto in condizioni ottimali per l'emissione del feromone. Si valuta così la tecnica estrattiva più idonea da utilizzare per l'ottenimento dei composti volatili. L'estrazione può essere effettuata tramite solvente, trappola fredda, adsorbente, ecc.
- Valutazione delle risposte comportamentali dell'insetto verso l'estratto: in questa fase si verifica la risposta comportamentale dell'insetto per assicurarsi che non ci siano state alterazioni durante la fase precedente.
- Analisi chimiche estratto che determinano la varietà dei composti presenti in esso e tramite gas-cromatografia (GC) si separano le varie frazioni.
- Selezione frazioni attive: le frazioni ricavate vengono esaminate tramite elettroantennografia e prove olfattometriche per valutare eventuali risposte dell'insetto.
- Analisi chimiche e strumentali dei maggiori composti delle frazioni attive e formulazione di ipotesi sui composti chimici identificati: utilizzando la tecnica ipenata della GC-MS, facendo quindi un'analisi qualitativa delle frazioni ed eventualmente analisi NMR che permettono di identificare meglio la struttura chimica delle frazioni in caso queste siano incognite.

- Valutazione delle risposte comportamentali e/o fisiologiche dell'insetto verso i composti sintetici: si considerano i saggi di laboratorio e le prove di campo mediante trappole attivate con le sostanze sintetizzate sempre in laboratorio.
- Purezza enantiomerica dei composti: è importante che taluni componenti chimici siano in forma enantiopura in caso essi abbiano centri stereogenici, in quanto gli insetti rispondono soltanto a questi.
- Prove in campo mediante utilizzo di dispensatori a rilascio controllato: una volta identificato il feromone, questo si verifica in campo. Si usano così dispensatori che sono in grado di rilasciare la sostanza o più sostanze in caso di blend feromonico nel giusto rapporto e nelle giuste quantità nel corso di settimane o mesi.

La ricerca dei semiochimici va indirizzata verso l'individuazione dell'organo coinvolto dalla comunicazione, l'antenna, nella quale vengono intercettati i feromoni (Rotundo e Germinara, 2016). Per far ciò è necessario disporre di strumentazioni analitiche precise e valide. Inoltre i biosaggi consentono di registrare cambiamenti comportamentali mediante le stesse strumentazioni disposte in condizioni standard di laboratorio.

## **2.2 Applicazione di semiochimici**

In passato per difendere le piante dagli attacchi degli insetti fitofagi, è stata utilizzata la lotta "a calendario" che consisteva nell'utilizzo a turno fisso di prodotti chimici di sintesi. Tuttavia questo approccio causava problemi non indifferenti, in quanto residui di fitofarmaci erano presenti negli alimenti e nell'ecosistema e gli insetti sviluppavano una resistenza verso i principi attivi. Si è pensato così nel tempo di utilizzare metodi di controllo innovativi e sostenibili da un punto di vista ambientale ed economico per aumentare la biodiversità dei vari agroecosistemi. A questi principi aderisce la "International Organization for Biological Control" (IOBC) che, mediante l'applicazione dei programmi di "Integrated pest management" (IPM), mantiene le popolazioni di organismi nocivi al di sotto della soglia di tolleranza, rendendo così economico l'intervento fitosanitario. Le misure proposte da IPM, per poter essere attuate, richiedono la conoscenza approfondita della biologia del fitofago dannoso e dei suoi nemici naturali all'interno di qualsiasi ecosistema (Dent, 1991).

I semiochimici trovano una valida applicazione nel controllo di insetti dannosi (nell'ottica di tutela ambientale e di benessere umano). Esistono mezzi diretti di controllo che consistono in cattura

massale, confusione sessuale, lotta attratticida, disorientamento del maschio) e mezzi indiretti come il monitoraggio.

I mezzi di controllo diretti che permettono l'applicazione di semiochimici vengono descritti da Campion et al. nel 1989:

- *La cattura massale* (mass trapping) si pone come obiettivo quello di eliminare il maggior numero possibile di maschi nell'ambiente, collocando numerose trappole che abbiano la capacità di contenere gli insetti catturati. La cattura massale si utilizza per scongiurare effetti dannosi e rappresenta inoltre un metodo di lotta naturale che utilizza trappole a feromone sessuale.
- *La confusione sessuale* consiste nell'esposizione dei maschi ad un'elevata concentrazione del feromone. Il sistema nervoso centrale dell'insetto va incontro così ad un processo di assuefazione, in quanto questa tecnica agisce sulla saturazione dei recettori antennali. Inoltre si altera la risposta del maschio rispetto ai valori normali percepiti da questo nei confronti delle femmine vergini (Weatherston, 1990). Si parla di confusione sessuale anche se si ha un blend feromonico complesso, in quanto può sbilanciarsi il rapporto ideale di questo.
- *La lotta attratticida* si realizza mediante l'utilizzo di feromone specifico della specie che si vuole controllare in sinergia con un insetticida di contatto (ad esempio un piretroide). Questa tecnica si impiega quando non è nota la struttura chimica del feromone e l'insetto pur se orientato non atterra sulla sorgente odorosa. I trattamenti chimici risultano essere localizzati e viene ridotta la possibilità di dispersione nell'ambiente.
- *La tecnica di disorientamento del maschio* (competitive mechanism o attraction) ha come obiettivo la creazione di "false tracce di volo" utilizzando un numero elevato di erogatori che emettono il feromone ad una concentrazione quasi simile a quella emessa dalle femmine vergini. (Millar et al., 2006). La vegetazione assorbe il feromone sintetico e lo rilascia in parte in diversi siti di diffusione (Sanders, 1995). I maschi vengono così disorientati e vengono attratti da "false femmine" e ingannati dalla ricerca di quelle vere, durante la fase di richiamo.

L'utilizzo dei semiochimici come mezzi indiretti di controllo, invece, si realizza mediante monitoraggio di fitofagi usando feromoni attrattivi o sostanze volatili. Questo meccanismo è importante in quanto permette di individuare la presenza di specie dannose all'interno di un areale, di stabilire le curve di volo degli adulti in modo da individuare il momento ottimale per un eventuale trattamento ed infine di stimare la densità di popolazione di un fitofago e quindi il

potenziale rischio. La biologia dell'insetto risulta così importantissima per il monitoraggio di questo mediante trappole attivate con semiochimici. Esso deve trovarsi in uno stadio fisiologico che gli consenta di rispondere all'attrattivo. In caso di monitoraggio, l'azione di difesa vera e propria viene svolta con mezzi biologici e/o chimici per poter raggiungere la soglia di intervento. Una volta individuati così in campo gli adulti dannosi, si procede tramite interventi mirati e tempestivi.

### **2.3 Importanza del monitoraggio**

Dal 1° gennaio 2014 si devono adottare i principi della produzione integrata (Direttiva 2009/128/CE, "Uso sostenibile dei prodotti fitosanitari") per tutti i produttori degli stati membri. In Italia è stata predisposta l'adozione del Piano d'Azione Nazionale (PAN) che obbliga l'uso sostenibile di prodotti fitosanitari (D.Leg. 150/2012, art.6). Lo stesso PAN ha come obiettivo la guida, la garanzia e il monitoraggio di un processo di cambiamento delle pratiche di utilizzo dei prodotti fitosanitari verso forme caratterizzate da maggiore compatibilità e sostenibilità ambientale e sanitaria in riferimento alla prevenzione ed eventuale soppressione di organismi nocivi (Decreto 22/01/2014, art.2). Ciascuna regione definisce dei valori soglia e in base a questi regola le misure fitosanitarie da applicare in caso di infestazione.

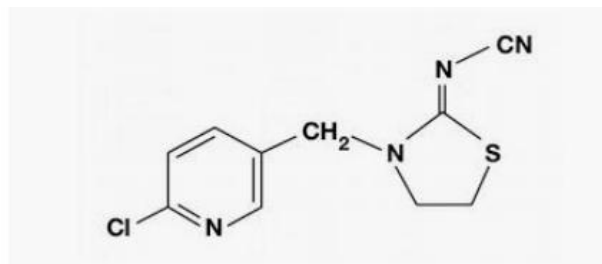
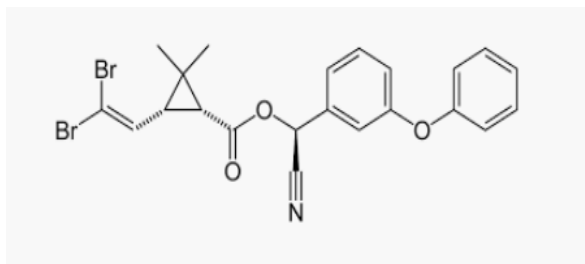
#### ***2.3.1 Metodi di Monitoraggio: il caso specifico di *A. bungii****

Il Servizio fitosanitario dispone annualmente indagini sui territori regionali per rilevare l'eventuale presenza dell'organismo nocivo *A. bungii* e dei suoi eventuali sintomi attraverso ispezioni sistematiche svolte in collaborazione con gli enti comunali. Il monitoraggio si basa principalmente su osservazioni visive, verificando se sulla pianta siano presenti rosime o deperimento della stessa e ponendo particolare attenzione a tronco e branche principali. In caso di ritrovamento di fori e fuoriuscita quindi di rosime, va verificata la presenza dell'organismo nocivo tramite scortecciamento e successive analisi in laboratorio, poiché esistono altri xilofagi che possono arrecare danni simili alla pianta. Nel periodo di sfarfallamento degli adulti, il monitoraggio può essere disposto servendosi di trappole innescate con miscele attrattive come aceto, zucchero e vino; questa tecnica tuttavia non offre risultati efficaci. Le trappole vanno posizionate una ogni due-tre alberi e fissate al tronco ad un'altezza di circa 1,60 m in zone ombreggiate. L'uso delle trappole nella zona di contenimento o in eventuali zone nuove

infestate ha lo scopo di monitorare i voli dell'insetto per far sì che si possa individuare il periodo più opportuno ed eventualmente poter trattare con insetticidi.

Nella cosiddetta zona cuscinetto, cioè la fascia perimetrale di almeno 2 km attorno alla zona infestata o di contenimento, è previsto un monitoraggio rafforzato delle piante sensibili presenti nell'area. Le ispezioni vengono programmate in modo che possano coprire tutta la zona e permettano il controllo di tutte le potenziali piante ospiti. I controlli riguardano anche le piante ornamentali di *Prunus* spp. ubicate in giardini privati e parchi.

Per evitare la diffusione dell'organismo nocivo, il Servizio fitosanitario dispone l'abbattimento delle piante infestate da cerambicide. Se durante il periodo di volo dell'insetto si accertano piante infestate, esse devono essere abbattute seguendo accorgimenti tecnici che scongiurino la diffusione. Gli abbattimenti vanno effettuati previo preavviso, da parte del possessore delle piante, di almeno due giorni lavorativi al Servizio fitosanitario regionale. Il materiale abbattuto raccolto va trattato termicamente in loco e, ove non sia possibile, va trasportato e imballato accuratamente e successivamente trattato. Nella zona delimitata sono consentiti trattamenti insetticidi contro gli adulti nel periodo di volo, purché si utilizzi, come disposto dal Ministero della Salute, DELTAMETRINA e THIACTOPRID diluiti in 1200-1500 litri di acqua per ettaro e impiegati per bagnare tronchi e branche principali e secondarie.



DELTAMETRINA (a sinistra) e THIACTOPRID (a destra)

#### 2.4 Stato dell'arte sui semiochimici di *A. bungii*

Analizzando la letteratura, si evince che due sono gli studi più significativi che riguardano i semiochimici di *A. bungii*.

Il primo studio riguarda l'identificazione e la sintesi del feromone sessuale di aggregazione emesso dal maschio, condotto da Millar et al. (2017), (*E*)-2-*cis*-6,7-epossinonenale (Fig. 1). Tale feromone è indispensabile per scongiurare l'invasione del cerambicide. E' stato dimostrato che è il componente principale del feromone sessuale di aggregazione poiché nelle analisi GC-EAD, le antenne delle femmine rispondono a questo composto. La struttura del componente può essere indirizzata ad un monoterpinoide ossigenato prodotto da percorsi biosintetici diversi rispetto al non ramificato (*E*)-2-*cis*-6,7-epossinonenale. Questo potrebbe essere prodotto da scissione ossidativa di un acido grasso insaturo omega-3 come l'acido linolenico per fornire (3*Z*, 6*Z*)-nona-3,6-dienale, seguita da isomerizzazione al composto termodinamicamente più stabile (2*E*, 6*Z*)-nona-2,6-dienale ed epossidazione del doppio legame non coniugato.

Dal punto di vista chimico, (*E*)-2-*cis*-6,7-epossinonenale, come riportato dallo stesso Millar, può essere ottenuto tramite epossidazione di (2*E*,6*Z*)-nona-2,6-dienal con acido metacloroperossibenzoico, un forte ossidante avente la peculiarità di mantenere invariata la configurazione geometrica *cis/trans* dell'alchene iniziale. Inoltre, questo è un perossiacido organico facile da utilizzare e può essere utilizzato per convertire chetoni in esteri, tramite reazione di Baeyer-Villiger, e per ossidare ammine.

Il secondo studio riguarda Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) dei sensilli antennali e l'analisi delle loro secrezioni negli adulti di *A. bungii* (Di Palma et al., 2019). In questo caso viene provato che le stesse secrezioni giocano un ruolo importante nell'accoppiamento e nel comportamento riproduttivo dei cerambicidi. In particolare risultano interessanti le secrezioni dei sensilli basi conici di tipo 1 e 2, i quali producono un materiale viscoso che si accumula sulla superficie antennale. Le analisi chimiche degli estratti antennali condotte in GC-MS sottolineano, sia per il maschio che per la femmina, che si hanno diversi idrocarburi a catena lunga. Alcuni di questi sono stati individuati in altri cerambicidi come feromoni di contatto, cioè feromoni che agiscono una volta che le antenne degli insetti vengono a contatto.



**Fig. 1** Struttura di (*E*)-2-*cis*-6,7-epossinonenale

### 3. GC-MS: PRINCIPI E FUNZIONAMENTO

La gascromatografia-spettrometria di massa (indicata con la sigla GC-MS), è una tecnica analitica ibrida e consiste nell'accoppiamento di un gascromatografo e uno spettrometro di massa. Il gascromatografo separa gli analiti presenti nell'estratto e lo spettrometro di massa funge da rivelatore. La GC-MS può essere impiegata sia per analisi qualitative, che per analisi quantitative. Le prime consistono nell'identificazione degli analiti tramite libreria e le seconde mediante il metodo delle aggiunte standard o dello standard interno consentono di determinare la concentrazione dell'analita all'interno del campione.

Lo schema a blocchi dello strumento è riportato in Fig. 2 e consiste in un cromatografo, uno spettrometro di massa e un sistema di raccolta dati e relativa analisi che costituisce il sistema per l'analisi e la separazione qualitativa e quantitativa di miscele complesse. Il cromatografo comprende un iniettore, un sistema che permette il controllo della temperatura della colonna e un sistema di trasferimento che consente alla miscela che fuoriesce dalla colonna capillare di entrare nello spettrometro di massa. Quest'ultimo è formato da una sorgente (in genere Electron Impact EI o Chemical Ionization CI) che ha lo scopo di frammentare le molecole che arrivano in più ioni, da un'analizzatore di masse (per sempio a quadrupolo) e da un rivelatore di ioni (elettromoltiplicatore). Lo spettrometro di massa lavora in condizioni di alto vuoto creato da pompe apposite.

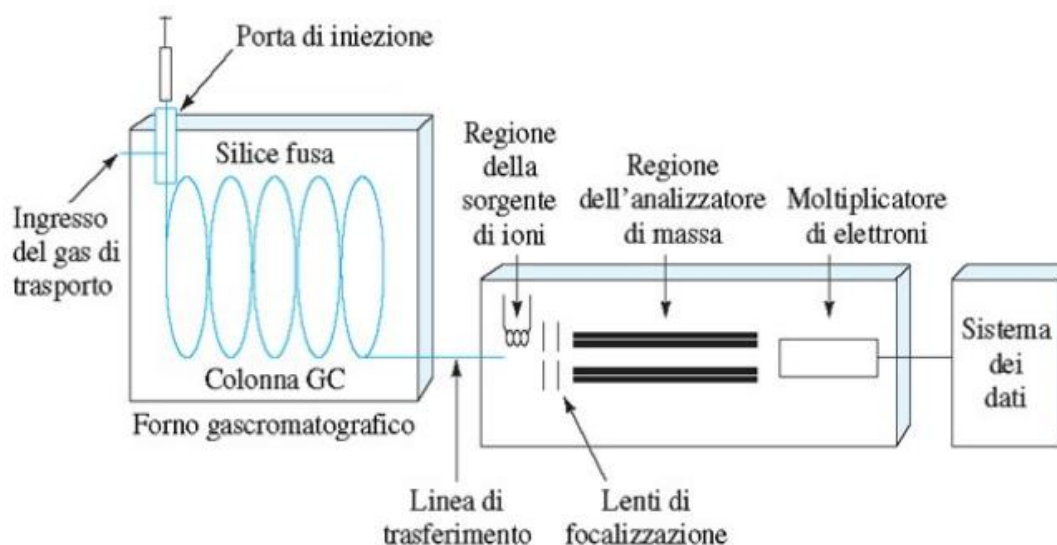


Fig. 2 Schema rappresentativo spettrofotometro GC-MS (Fonte: CNR)



#### **4. IDROCARBURI COME FEROMONI DI CONTATTO NEI CERAMBICIDI**

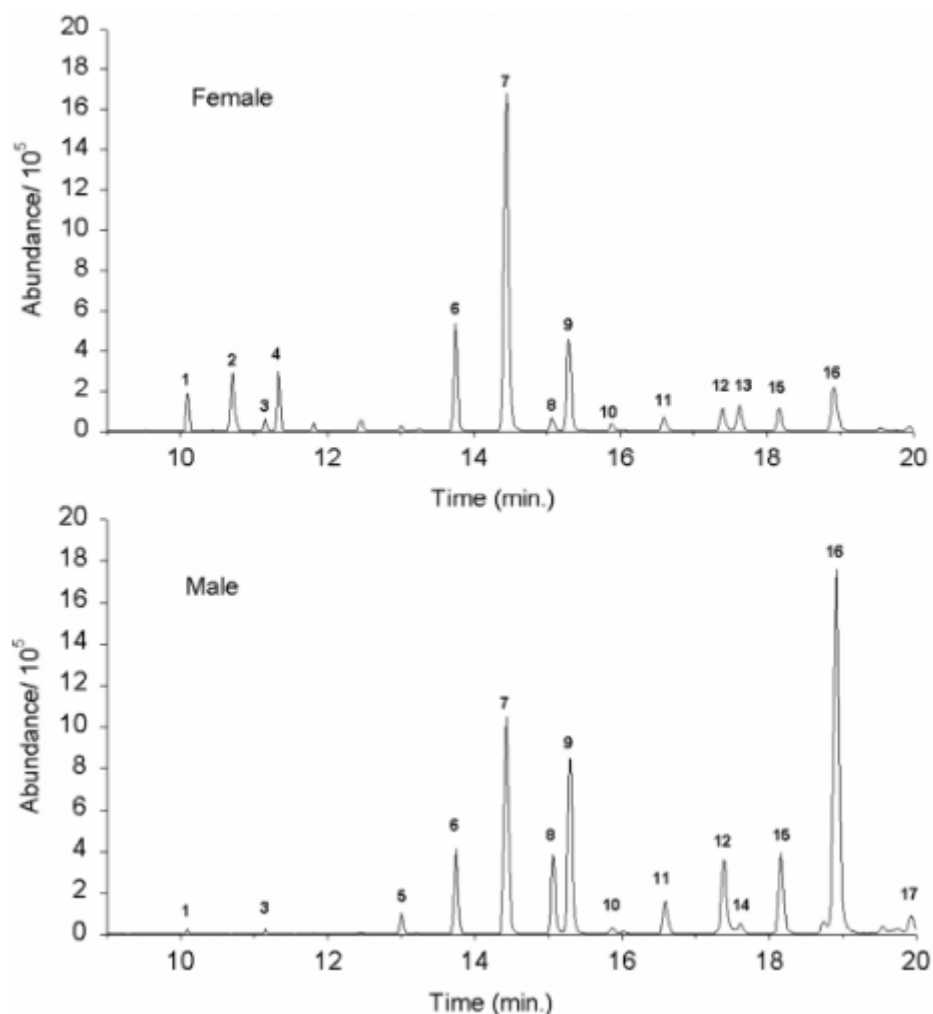
Lo strato di cera cuticolare degli insetti è composto da una miscela complessa di acidi grassi a catena lunga, alcoli, esteri, aldeidi, chetoni e idrocarburi che proteggono gli insetti dall'essiccamento (Gibbs, 1998). I componenti dello strato ceroso, in particolare gli idrocarburi, fungono anche da feromoni di contatto che sono indispensabili per il riconoscimento del partner (Howard e Blomquist, 2005). Studi riportati in letteratura sembrano indicare che i feromoni di contatto svolgano un ruolo importante nell'accoppiamento dei coleotteri della famiglia Cerambycidae (Kim et al., 1993; Fukaya et al., 1996,1997,2000; Ginzl e Hanks, 2003; Yasui et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Nei cerambicidi è stato dimostrato che l'accoppiamento avviene mediante tre fasi: entrambi i sessi sono attratti indipendentemente dalle sostanze volatili emesse dalla pianta ospite; i maschi attraggono le femmine servendosi di feromoni di aggregazione; i maschi riconoscono le femmine mediante i feromoni di contatto (Ginzl e Hanks, 2005). Quindi il riconoscimento dei segnali chimici emessi dalle antenne del partner, è di fondamentale importanza. Inoltre, le antenne permettono la localizzazione e il riconoscimento del compagno. (Hanks, 1999). Dopo il contatto iniziale del maschio tramite le antenne con la femmina, esso dà inizio al processo di copulazione. (Ginzl et al., 2003). Il maschio smette di camminare immediatamente una volta che ha toccato la femmina con le sue antenne e allinea quindi il suo corpo con la femmina. Il maschio piega così l'addome e mediante l'accoppiamento dei suoi genitali si riproduce con la femmina.

Heintz, nel 1925, dimostrò empiricamente che i cerambicidi utilizzano i feromoni di contatto per il riconoscimento del compagno, in particolar modo riferendosi ai maschi delle leptine che riconoscevano esclusivamente le femmine per contatto antennale. Si sono effettuati successivamente dei biotest che rafforzano la prova empirica sopracitata. In questi test, una femmina viene uccisa e congelata e successivamente riscaldata e posta in una capsula Petri: se il maschio tenta di accoppiarsi con la femmina, questo dimostra che i segnali di riconoscimento presenti sulla cuticola sono intatti e che quindi il comportamento non è coinvolto nel riconoscimento del compagno. Gli idrocarburi vengono così rimossi dalla cuticola della femmina mediante estrazione con diverse aliquote di esano o di diclorometano. Si lascia asciugare la femmina e successivamente viene reintrodotta nella capsula. Si verifica così se il maschio risponde questa volta agli stimoli e se questo non risponde, significa che l'estrazione con solvente ha rimosso gli idrocarburi responsabili del riconoscimento. Per verificare infine se l'estratto contiene il feromone, questo viene pipettato sul corpo della femmina e questa presentata nuovamente al maschio. Questo test risulta così utile per testare la bioattività dell'estratto grezzo e delle sue

frazioni. E' interessante notare che i maschi di alcune specie rispondono più facilmente alle femmine uccise per congelamento, che alle femmine lavate con solvente organico apolare e ricostituite con estratti cuticolari grezzi.

Gli idrocarburi cuticolari possono essere estratti mediante solventi oppure impiegano la microestrazione in fase solida (SPME). Nel primo caso, i composti che mediano il riconoscimento del partner sono spesso unici per gli estratti cuticolari delle femmine e una volta estratti vengono analizzati mediante GC-MS. Nel secondo caso si utilizza un'estrazione in fase solida che prevede l'uso di una fibra rivestita di una fase polimerica (in questo caso si utilizza polidimetilsilossano) in grado di adsorbire gli analiti di interesse da analizzare poi sempre in GC-MS inserendo direttamente la siringa SPME all'interno della camera di iniezione e desorbiti termicamente. E' una tecnica vantaggiosa, poiché non prevede l'uso di solventi e si campiona esclusivamente lo strato di cera esterno. A titolo d'esempio si riporta in Fig. 3 i cromatogrammi relativi all'estrazione mediante esano di *Xylotrechus colunus* maschio e femmina.



**Fig. 3** Cromatogrammi riferiti ad estratti in esano di femmina (sopra) e di maschio (sotto) di *Xylotrechus colunus*.  
(Fonte: Ginzel et al. 2003)

La tecnica SPME è stata utilizzata insieme all'estrazione con solvente per identificare il feromone di contatto di *Megacyllene robiniae* (Ginzel et al., 2003) e di *M. caryae* (Ginzel et al., 2006). È stato dimostrato che la prima tecnica risulti essere migliore della seconda: nel caso di *M. robiniae*, il feromone di contatto risulta essere (Z)-9-pentacosene. Questo composto rappresenta il 16% degli idrocarburi totali presenti nella miscela estratta con solvente ed è codominante con altri due idrocarburi non biologicamente attivi. Mediante SPME lo (Z)-9-pentacosene risulta essere il 34/36 % e questo dimostra che il feromone di contatto è presente sulla superficie cerosa dell'antenna prelevabile integralmente con la siringa e facilmente accessibile al partner per il riconoscimento. Le tecniche di campionamento risultano però limitate, in quanto composti ad elevato peso molecolare che non vengono rivelati dal GC-MS rimangono sulla superficie dello strato ceroso e fungono da componenti minori di feromoni di contatto. Recentemente, è stata utilizzata la spettrometria di massa a tempo di volo (TOF) e a sorgente di desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI) per dimostrare che lo strato ceroso di 12 specie di insetti di diversi taxa, contiene idrocarburi ad alto PM fino a C<sub>70</sub>.

#### **4.1 Differenze qualitative e quantitative nei profili di idrocarburi di entrambi i sessi**

I profili cutanei degli idrocarburi di alcune specie di cerambicidi maschi e femmine sono qualitativamente abbastanza simili (la maggior parte dei componenti cuticolari si trovano in entrambi i sessi). Per esempio, nel *X. colonus* ci sono solo quattro composti che sono unici per la cuticola della femmina e altri tre specifici per il maschio. (Ginzel et al., 2003). Inoltre, i profili cuticolari di maschio e femmina di *Anoplophora glabripennis* hanno in comune una serie di composti saturi, ramificati ed insaturi, ma sono presenti cinque alcheni molto più diffusi negli estratti delle femmine. Tutti questi sono necessari per provocare la flessione addominale nei maschi (Zhang et al., 2003). Nel *M. caryae*, tuttavia, i profili cuticolari delle femmine contengono un numero di idrocarburi alifatici che non sono presenti nello strato di cera dei maschi. Effettivamente, gli strati dei maschi e delle femmine sono qualitativamente molto diversi e i composti specifici per sesso rappresentano quasi la metà degli idrocarburi delle femmine e un terzo degli idrocarburi dei maschi (Ginzel et al., 2006). Qualora vi siano sostanziali differenze qualitative nei profili di maschi e femmine, è molto conveniente testare prima l'attività biologica dei composti per gruppo funzionale. Per esempio, la bioattività degli alcani sintetici a catena fissa più abbondanti, i ramificati e i monoeni presenti nell'estratto della femmina di *M. robiniae*, sono stati testati basandosi sul gruppo funzionale e solo i monoeni sintetici hanno dato una risposta di accoppiamento nei maschi simile a quella dell'estratto grezzo. I maschi rispondono di più allo (Z)-

9-nonacosene. Il riconoscimento del partner può avvenire mediante un solo feromone di contatto oppure per mezzo di un blend complesso.

Il feromone di contatto di *X. conolus* è una miscela di pentacosano e due alcani ramificati (Ginzel et al., 2003); quello di *A. malasiaca* è composto da 9-metil-pentacosano e sette idrocarburi e cinque chetoni. Si riporta in tabella 1, a titolo d'esempio gli idrocarburi cuticolari identificati nella femmina e nel maschio di *Megacyllene robiniae*.

Peak Number	Retention Time	Hydrocarbon	% of total hydrocarbons $\pm$ 1 SE				Diagnostic Ions
			Hexane Extracts		SPME Samples		
			Female	Male	Female	Male	
1	21.13	<i>n</i> C <sub>22</sub>	0.32 $\pm$ 0.11	nd	nd	nd	310 (M <sup>+</sup> )
2	21.99	2-meC <sub>22</sub>	1.15 $\pm$ 0.13	0.12 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.30	nd	324 (M <sup>+</sup> ), 309, 281
3	22.13	Z9:C <sub>23</sub> <sup>2</sup>	1.85 $\pm$ 0.23	0.66 $\pm$ 0.19	3.40 $\pm$ 0.43	nd	322 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
4	22.42	<i>n</i> C <sub>23</sub>	11.9 $\pm$ 0.68	4.56 $\pm$ 1.0	6.36 $\pm$ 0.34	1.17 $\pm$ 0.74	324 (M <sup>+</sup> )
5	23.36	3-meC <sub>23</sub>	5.31 $\pm$ 1.0	1.66 $\pm$ 0.50	5.81 $\pm$ 0.94	nd	338 (M <sup>+</sup> ), 309
6	23.73	<i>n</i> C <sub>24</sub>	5.58 $\pm$ 0.33	2.03 $\pm$ 0.41	2.24 $\pm$ 0.27	0.26 $\pm$ 0.17	338 (M <sup>+</sup> )
7	24.57	4-meC <sub>24</sub>	0.48 $\pm$ 0.25	0.39 $\pm$ 0.26	1.39 $\pm$ 0.10	nd	352 (M <sup>+</sup> ), 309, enlarged 71
8	24.65	2-meC <sub>24</sub>	2.81 $\pm$ 0.33	1.30 $\pm$ 0.24	1.38 $\pm$ 0.21	0.52 $\pm$ 0.33	352 (M <sup>+</sup> ), 337, 309
9	24.86	Z9:C <sub>25</sub> <sup>6</sup>	16.3 $\pm$ 1.3	3.92 $\pm$ 1.1	37.8 $\pm$ 1.3	0.30 $\pm$ 0.19	350 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
10	24.97	Z7:C <sub>25</sub> <sup>8</sup>	1.2 $\pm$ 0.52	0.47 $\pm$ 0.28	7.90 $\pm$ 0.64	nd	350 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
11	25.23	<i>n</i> C <sub>25</sub>	17.0 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 1.1	7.02 $\pm$ 0.68	11.25 $\pm$ 4.1	352 (M <sup>+</sup> )
12	25.80	11-meC <sub>25</sub>	0.84 $\pm$ 0.09	0.65 $\pm$ 0.18	nd	1.14 $\pm$ 0.60	366 (M <sup>+</sup> ), 168, 224
		13-meC <sub>25</sub>					366 (M <sup>+</sup> ), 196
13	26.47	3-meC <sub>25</sub>	3.77 $\pm$ 0.50	1.73 $\pm$ 0.21	4.43 $\pm$ 0.44	3.76 $\pm$ 1.1	366 (M <sup>+</sup> ), 337
14	26.94	<i>n</i> C <sub>26</sub>	1.99 $\pm$ 0.19	1.04 $\pm$ 0.13	0.78 $\pm$ 0.15	0.25 $\pm$ 0.27	366 (M <sup>+</sup> )
15	28.11	2-meC <sub>26</sub>	3.49 $\pm$ 0.97	9.89 $\pm$ 0.35	1.45 $\pm$ 0.35	14.2 $\pm$ 4.9	380 (M <sup>+</sup> ), 365, 337
16	28.38	Z9:C <sub>27</sub> <sup>6</sup>	2.47 $\pm$ 0.24	0.89 $\pm$ 0.30	6.55 $\pm$ 1.3	2.18 $\pm$ 0.91	378 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
17	28.53	Z7:C <sub>27</sub> <sup>8</sup>	0.55 $\pm$ 0.16	nd	3.50 $\pm$ 1.2	nd	378 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
18	28.84	<i>n</i> C <sub>27</sub>	6.18 $\pm$ 0.98	5.79 $\pm$ 0.18	1.85 $\pm$ 0.55	5.62 $\pm$ 1.4	380 (M <sup>+</sup> )
19	29.50	11-meC <sub>27</sub>	0.67 $\pm$ 0.18	0.69 $\pm$ 0.23	0.85 $\pm$ 0.74	8.16 $\pm$ 6.6	379 (M-15), 168, 252
		13-meC <sub>27</sub>					379 (M-15), 196, 224
20	30.36	3-meC <sub>27</sub>	2.39 $\pm$ 0.27	2.83 $\pm$ 0.34	1.10 $\pm$ 0.36	3.81 $\pm$ 1.4	394 (M <sup>+</sup> ), 365
21	30.93	<i>n</i> C <sub>28</sub>	0.79 $\pm$ 0.14	1.01 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.42	nd	394 (M <sup>+</sup> )
22	32.10	C <sub>20</sub> diene	0.48 $\pm$ 0.20	nd	0.44 $\pm$ 0.24	nd	404 (M <sup>+</sup> ), 82, 96, 109
23	32.31	2-meC <sub>28</sub>	2.91 $\pm$ 0.28	13.9 $\pm$ 1.18	0.60 $\pm$ 0.27	6.92 $\pm$ 1.9	408 (M <sup>+</sup> ), 393, 365
24	32.65	Z9:C <sub>29</sub> <sup>6</sup>	0.72 $\pm$ 0.20	1.91 $\pm$ 0.39	2.20 $\pm$ 0.23	5.47 $\pm$ 2.5	406 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
25	33.17	<i>n</i> C <sub>29</sub>	2.80 $\pm$ 0.38	6.80 $\pm$ 0.50	0.72 $\pm$ 0.35	2.00 $\pm$ 1.2	408 (M <sup>+</sup> )
26	33.89	11-meC <sub>29</sub>	2.35 $\pm$ 0.18	11.7 $\pm$ 1.3	0.70 $\pm$ 0.23	16.08 $\pm$ 5.4	422 (M <sup>+</sup> ), 168, 280/281
		13-meC <sub>29</sub>					422 (M <sup>+</sup> ), 196, 252
		15-meC <sub>29</sub>					422 (M <sup>+</sup> ), 224
27	34.92	3-meC <sub>29</sub>	1.83 $\pm$ 0.34	1.64 $\pm$ 0.36	0.09 $\pm$ 0.09	nd	422 (M <sup>+</sup> ), 407, 393
28	38.03	<i>n</i> C <sub>31</sub>	0.94 $\pm$ 0.21	0.85 $\pm$ 0.22	nd	nd	436 (M <sup>+</sup> )
29	38.77	15-meC <sub>31</sub>	0.67 $\pm$ 0.21	4.67 $\pm$ 0.46	nd	1.73 $\pm$ 1.01	435 (M-15), 224, 252
30	39.41	13,17dimeC <sub>31</sub>	0.29 $\pm$ 0.19	4.91 $\pm$ 0.75	nd	nd	449 (M-15), 196/295, 224/267

**Tab. 1** Idrocarburi cuticolari di *Megacyllene robiniae* maschio e femmina. Si osserva per ogni picco del cromatogramma gli idrocarburi identificati con % rispetto al totale di essi e gli ioni caratteristici per ognuno ottenuti con MS. (Fonte: Ginzel et al., 2003)

## 5. DERIVATIZZAZIONE PER ANALISI GC-MS

La GC spesso non è adatta per lo studio di composti polari e idrofili ed è necessario quindi convertire queste sostanze in altre che siano più adattabili all'analisi gascromatografica e questo processo prende il nome di derivatizzazione. I gruppi funzionali suscettibili a derivatizzazione sono idrossili, acidi carbossilici, chetoni, ammine e le olefine. I reagenti da impiegare per derivatizzare dipendono da una serie di fattori:

- Tipo di sorgente di ionizzazione impiegata da MS (in genere si utilizza EI o CI)
- La risoluzione dello spettrometro di massa (specie quando si vuole separare l'analita da molte interferenze e rumori di fondo)
- La possibilità di aumentare la risoluzione spettrometrica (impiegando la tandem MS-MS)

La derivatizzazione deve essere impiegata per composti volatili e termicamente stabili, cioè identificabili tramite GC. La riduzione della polarità migliora le proprietà degli analiti da separare in colonna e minimizza l'adsorbimento in questa (tale fenomeno arreca problemi durante le analisi non favorendo la separazione degli analiti) per ottenere picchi ben risolti. La preparazione di un derivato può essere utile anche in presenza di uno spettro di massa dove gli ioni caratteristici di frammentazione dell'analita non sono bene evidenti o talvolta assenti. Una volta derivatizzato il composto, si ottiene uno spettro con ioni aventi maggiore abbondanza (in base al loro rapporto  $m/z$ ).

Per avere una buona derivatizzazione, bisogna seguire determinati principi:

- Stabilità del composto nella miscela di reazione
- Resa elevata e riproducibile
- Condizioni blande di reazione
- Preparare un solo derivato per ogni composto
- Reazioni veloci e semplici
- Ottenere una curva di calibrazione lineare (nel caso in cui si svolgano analisi quantitative)

### 5.1 Principali metodi di derivatizzazione

- *Sililazione*: è il più adottato in GC. I derivati sililati si formano per sostituzione di un idrogeno attivo con un gruppo alchilsilile (ad es. in gruppi -OH, -NH, -SH).

I gruppi funzionali protici possono essere trasformati in silil eteri o esteri. I silil derivati si formano in base alla reattività del gruppo funzionale:

alcoli > fenoli > acidi carbossilici > ammine > ammidi

La sintesi di questi avviene per metilsililazione. I derivati trimetilsilil (TMS) sono i più indicati in quanto sono stabili chimicamente e termodinamicamente, sono facili da preparare e sono molto volatili. Si possono utilizzare anche trimetilalossilani, TMS-ammine, TMS-esteri e TMS-ammidi (ad esempio la MSTFA: N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetammide).

Per favorire la silazione di funzioni stericamente impedito si usano i catalizzatori.

- *Acilazione*: si utilizza su molecole con un idrogeno reattivo come negli alcoli, ammine, tioli, fenoli, enoli, ammidi, sulfonammidi, composti insaturi e aromatici. Per questo tipo di derivatizzazione si impiegano tre classi di reagenti: alogenuri acilici (RCOX), anidridi acide (RCOOCOR) come l'anidride acetica o altri derivati acilici come imidazoli acilati.
- *Alchilazione*: l'idrogeno reattivo di alcoli, acidi carbossilici, tioli, fenoli, ammine primarie e secondarie, ammidi e sulfonammidi viene sostituito con un alchile o un arile. Questa tecnica viene impiegata maggiormente in GC-MS, poiché aumenta leggermente la massa molecolare dell'analita e i derivati metilici sono sufficientemente volatili. Si utilizzano in questo caso alogenuri alchilici (RX) come bromuri e idruri alifatici a basso PM (fino a quattro carboni) e bromuri benzilici. I catalizzatori più impiegati sono ossido di argento (Ag<sub>2</sub>O), ossido di bario (BaO) e idruro di sodio (NaH).

Nel caso in cui si abbiano molecole polifunzionali, si possono impiegare reagenti specifici che reagiscono simultaneamente con due gruppi vicini funzionali vicinali e in caso di cicli aromatici in posizione *orto* per ottenere un anello a 5,6 o 7 termini: si formano quindi dei composti stabili avente bassa tensione d'anello.

## 6. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro è quello di identificare e caratterizzare i secreti dei sensilli antennali del maschio e della femmina di *A. bungii* con potenziale attività feromonica di contatto. I suddetti feromoni sono dal punto di vista chimico idrocarburi a lunga catena saturi, insaturi e ramificati. Questi sono stati parzialmente caratterizzati in un lavoro precedente (Di Palma et al., 2019), ma per alcuni di essi non è stata ancora definita la posizione dei doppi legami. Mediante la tecnica di derivatizzazione utilizzata in GC-MS, si possono caratterizzare gli idrocarburi insaturi determinando con certezza la posizione del doppio legame C=C.

I feromoni di contatto, come già detto in precedenza, sono utili per comprendere il comportamento riproduttivo della specie per individuare composti biologicamente attivi da utilizzare per il monitoraggio e il controllo di specie dannose. A tal fine, sono stati condotti, in via preliminare, anche dei biosaggi comportamentali per valutare la capacità degli stessi estratti di indurre comportamenti riproduttivi (es. estroflessione dell'organo copulatore, tentativi di copula) negli insetti in assenza di stimoli visivi.

## 7. MATERIALI E METODI

### 7.1 Materiali

Insetti adulti di *A. bungii* (Marigliano, Campania, Italia)

Contenitori di plastica trasparente con tappo a vite

Rete a maglie di 1 mm

Mele (Italia)

Ago di siringa

Vials (Supelco Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Agitatore Vortex (Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

N-esano ( $\geq 98\%$ ) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Dimetildisolfuro ( $\geq 98\%$ ) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Iodio ( $\geq 98\%$ ) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Dietil etere ( $\geq 98\%$ ) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Tiosolfato di sodio ( $\geq 98\%$ ) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Acqua ultrapura di Tipo 1 – MilliQ (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Solfato di magnesio ( $\geq 98\%$ ) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

### 7.2 Insetti

I tronchi di alberi abbattuti contenenti le larve di *A. bungii* sono stati prelevati da Marigliano (Napoli, Campania, Italia) e collocati in gabbie apposite da allevamento per ottenere gli adulti a partire dalla prima settimana. Gli adulti sono stati prelevati e collocati individualmente in contenitori di plastica trasparente (diametro 6 cm x altezza 8 cm). Per consentire lo scambio d'aria, i contenitori sono stati coperti con appositi tappi a vite provvisti di foro centrale (2 cm) e rete a maglie di 1 mm. Gli insetti sono stati mantenuti ad una temperatura di  $25 \pm 2$  °C, umidità relativa del  $60 \pm 5$  % e a 16 ore di luce e 8 di buio. Inoltre, sono stati nutriti con pezzi di mela che venivano rinnovati ogni 3 giorni.



### **7.3 Preparazione degli estratti contenenti le secrezioni antennali**

Le secrezioni antennali presenti sulla superficie a partire dal sesto fino al nono flagellomero (aventi 4 settimane) di maschi e femmine, sono state prelevate mediante un ago sterile di siringa facendo attenzione a non danneggiare le antenne e l'emolinfa presente. Le secrezioni (circa 0.5 mg) sono state prelevate da tre specie maschio e tre specie femmina, poste in vials e dissolte in 500  $\mu$ L di n-esano e conservate a -20 °C fino alla successiva analisi.

### **7.4 Reazione microanalitica di derivatizzazione**

Le posizioni dei doppi legami C=C e la geometria degli idrocarburi insaturi sono state determinate considerando gli addotti prodotti degli estratti con dimetildisolfuro (DMDS) utilizzando la procedura elaborata da Buser et al. nel 1983. Ad ogni estratto contenente gli idrocarburi del maschio e della femmina sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di DMDS e 5  $\mu$ L di iodio in etere etilico (0.06 %). Le vials sono state omogeneizzate con Agitatore Vortex e successivamente riscaldate a 40 °C tutta la notte. Alle soluzioni così ottenute vengono aggiunti 200  $\mu$ L di una soluzione di tiosolfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) in acqua distillata (5 %) e la miscela ottenuta viene estratta con 100  $\mu$ L di n-esano. La frazione organica viene disidratata con solfato di magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) e analizzata in GC-MS.

### **7.5 Analisi gascromatografica abbinata a spettrometria di massa (GC-MS)**

Per la caratterizzazione dell'estratto viene utilizzato un gascromatografo di serie 7890B (Agilent Technologies, USA) equipaggiato con una colonna capillare HP-5MS (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA; 30 m x 250  $\mu$ m x 0.5  $\mu$ m di spessore fase stazionaria) accoppiato con uno spettrometro di massa 5977A (Agilent Technologies, USA). La fase mobile (carrier) utilizzata è l'elio (1.25 mL/min). Un microlitro di soluzione viene iniettato in modalità "splitless" (0.3 min) e la temperatura dell'iniettore viene mantenuta a 250 °C. Per rimuovere tracce di interferenti vari (ossigeno, azoto, acqua, ecc.), l'elio è stato pre-filtrato mediante passaggio in filtro adsorbente (Gas Clean Filters, Agilent, USA). Il forno dove è posta la colonna viene programmato ad una temperatura iniziale di 100 °C con una rampa di riscaldamento di 10 °C/min. fino a 300 °C con un'isoterma finale di 15 min. Gli spettri vengono registrati utilizzando una sorgente ad impatto elettronico (EI) con un'energia di ionizzazione di 70 eV e range di massa 15-550 m/z con velocità di scansione di 2.9 scans/s. Ciascun estratto di ciascun sesso, viene analizzato tre volte. Gli analiti così ottenuti vengono identificati confrontando gli spettri di massa con quelli riportati in libreria del

National Institute for Standards and Technology database (NIST08). Le sostanze non identificabili in libreria sono state dedotte mediante gli ioni caratteristici di ciascuna di esse oppure mediante la derivatizzazione nel caso in cui fossero insature.

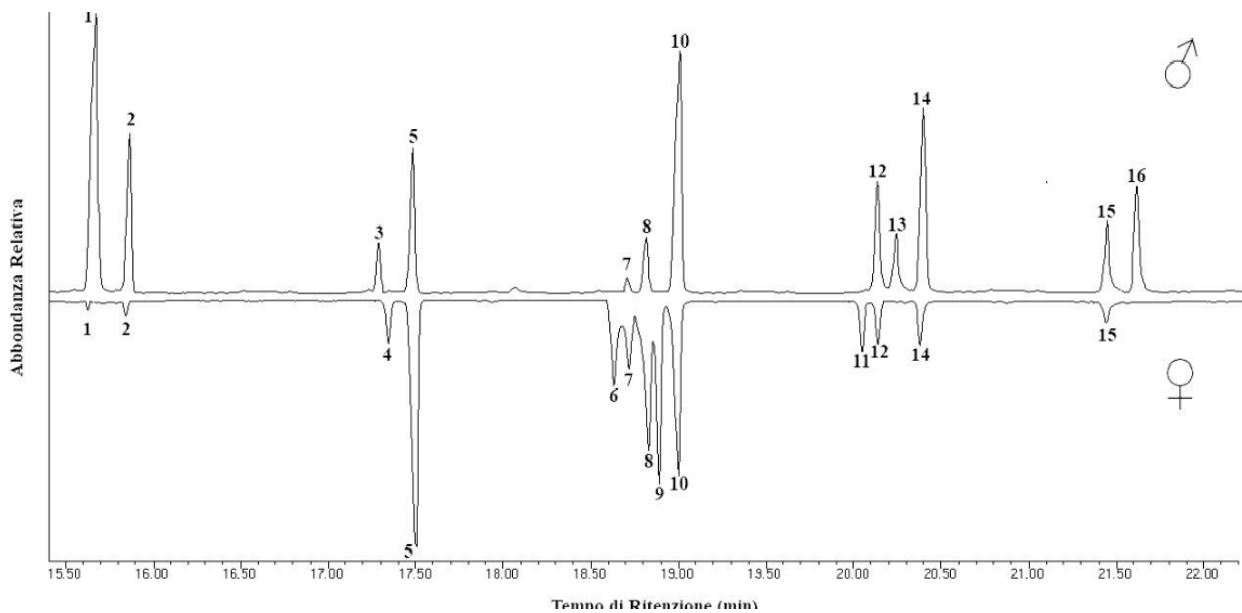
## **7.6 Saggi comportamentali**

Per verificare la presenza, nell'estratto antennale femminile, di composti in grado di suscitare una risposta copulatoria al maschio, sono stati condotti biosaggi comportamentali simili a quelli descritti in Zang et al.(2003). Un'aliquota (50 µl) dell'estratto antennale femminile è stata distribuita uniformemente sulla superficie di una provetta in polipropilene per microcentrifuga (1,5 ml) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Dopo 3 minuti, avvenuta l'evaporazione del solvente, la provetta è stata posizionata sul fondo di un contenitore di plastica (6 cm di diametro x 8 cm di altezza) e successivamente introdotto al suo interno un esemplare maschio di *A. bungii*. In tale saggio, è stata osservata la possibile insorgenza di una risposta copulatoria dopo il contatto delle antenne con la provetta. La prova è stata condotta su 5 individui maschi, utilizzando per ogni ripetizione 5 diversi estratti antennali di femmine.

## 8. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 8.1 Caratterizzazione estratti di *A. bungii*

In Fig.4 vengono riportati i cromatogrammi degli estratti maschio (in alto) e femmina (in basso). Dagli spettri si evince che alcuni picchi sono in comune ai due sessi e altri no. I picchi riportati corrispondono ad una serie di idrocarburi a partire dal C<sub>23</sub> fino a C<sub>31</sub>. Molti di essi sono stati identificati qualitativamente grazie alla libreria NIST08, come riportato in Tab. 2. I restanti picchi 1,3,8,13,16 (maschio) e 1,4,8,9 (femmina) sono stati identificati mediante derivatizzazione in GC-MS con DMDS.



**Fig. 4** Cromatogramma derivante dall'analisi GC-MS degli estratti maschio (in alto) e femmina (in basso) di *A. bungii*

Numero Picco	Tempo di Ritenzione	Idrocarburi	% idrocarburi totali $\pm$ E.S <sup>1</sup>				Ioni Diagnostici
			Estratti Esano		Estrazione SPME		
			Femmina	Maschio	Femmina	Maschio	
1	15.68	Z9:C <sub>23</sub> *	0.06 $\pm$ 0.02	21.52 $\pm$ 4.65	0.04 $\pm$ 0.01	1.02 $\pm$ 0.45	322 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
2	15.88	nC <sub>23</sub>	0.22 $\pm$ 0.12	9.57 $\pm$ 0.65	0.02 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.21	324 (M <sup>+</sup> )
3	17.30	Z9:C <sub>25</sub> *	n.d. <sup>2</sup>	2.94 $\pm$ 0.61	n.d.	0.32 $\pm$ 0.07	350 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
4	17.34	Z7:C <sub>25</sub> *	3.24 $\pm$ 0.50	n.d.	1.24 $\pm$ 0.12	n.d.	350 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
5	17.50	nC <sub>25</sub>	24.08 $\pm$ 2.31	8.54 $\pm$ 1.25	19.98 $\pm$ 2.98	2.23 $\pm$ 0.68	352 (M <sup>+</sup> )
6	18.64	C <sub>27</sub> diene	8.19 $\pm$ 1.12	n.d.	3.73 $\pm$ 0.25	n.d.	376 (M <sup>+</sup> )
7	18.71	2-meC <sub>26</sub>	6.61 $\pm$ 0.68	0.88 $\pm$ 0.12	23.60 $\pm$ 3.54	0.42 $\pm$ 0.21	380 (M <sup>+</sup> ), 365, 337
8	18.82	Z9:C <sub>27</sub>	17.17 $\pm$ 2.36	3.37 $\pm$ 0.57	15.41 $\pm$ 2.55	0.60 $\pm$ 0.19	378 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
9	18.90	Z7:C <sub>27</sub>	14.33 $\pm$ 1.98	n.d.	11.35 $\pm$ 2.14	n.d.	378 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
10	19.01	nC <sub>27</sub>	15.82 $\pm$ 1.31	18.57 $\pm$ 2.97	7.31 $\pm$ 1.21	18.94 $\pm$ 1.93	380 (M <sup>+</sup> )
11	20.05	C <sub>29</sub> diene	2.88 $\pm$ 0.33	n.d.	4.29 $\pm$ 0.24	n.d.	404 (M <sup>+</sup> ), 82, 96, 109
12	20.40	2-meC <sub>28</sub>	2.17 $\pm$ 0.87	7.20 $\pm$ 0.74	7.50 $\pm$ 0.77	19.60 $\pm$ 1.87	408 (M <sup>+</sup> ), 393, 365
13	20.25	Z9:C <sub>29</sub> *	n.d.	3.34 $\pm$ 0.25	n.d.	6.85 $\pm$ 1.21	406 (M <sup>+</sup> ), 83, 97, 111
14	20.40	nC <sub>29</sub>	3.38 $\pm$ 0.97	11.96 $\pm$ 0.78	1.66 $\pm$ 0.21	17.35 $\pm$ 2.87	408 (M <sup>+</sup> )
15	21.45	2-meC <sub>30</sub>	1.84 $\pm$ 0.41	5.05 $\pm$ 0.34	3.92 $\pm$ 0.49	7.32 $\pm$ 1.40	436 (M <sup>+</sup> ), 393, 421
16	21.62	Z9:C <sub>31</sub> *	n.d.	7.06 $\pm$ 1.20	n.d.	24.59 $\pm$ 2.88	434 (M <sup>+</sup> ), 83, 87, 111

**Tab. 2** Tempi di ritenzione degli idrocarburi estratti sia con solvente (esano), sia con SPME ed identificati mediante GC-MS. Si riportano i frammenti caratteristici di ognuno di essi.

## 8.2 Derivatizzazione con DMDS degli idrocarburi insaturi

Gli idrocarburi derivatizzati si formano aggiungendo il dimetildisolfuro (DMDS), avente peso molecolare 94 g/mol, al composto insaturo. Si riporta in fig. 5 la reazione generica di derivatizzazione.

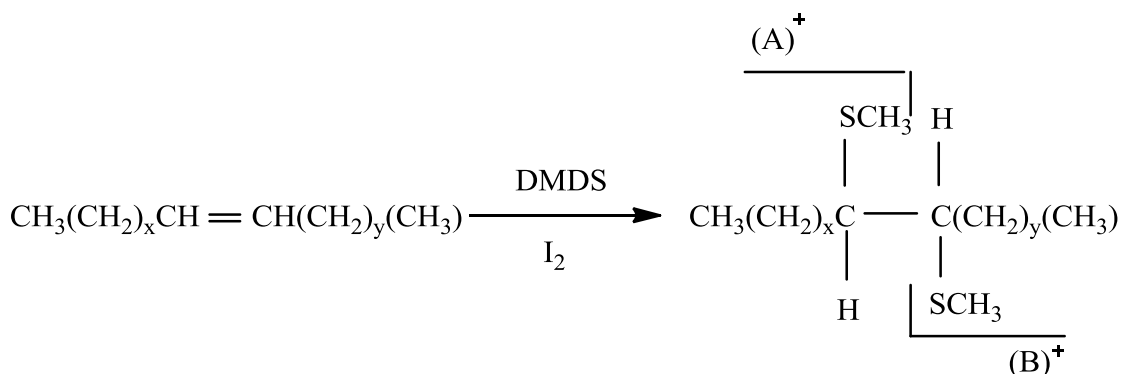


Fig.5 Reazione di derivatizzazione con DMDS

Il doppio legame carbonio-carbonio si individua con facilità, poiché si ha la metilazione dei due carboni con metil solfuro e nello spettro di massa finale si hanno i picchi caratteristici dei principali ioni frammento  $(\text{A})^+$  e  $(\text{B})^+$ . Spesso uno di questi frammenti rappresenta il picco base dello spettro. Il rapporto  $m/z$  caratteristico di questi ioni viene identificato grazie allo ione  $\text{CH}_2\text{SCH}_3^+$  ( $m/z = 61$ ) con addizione di  $\text{CH}_2$  ( $m/z = 14$ ) ad intervalli. La coppia  $(\text{A})^+$  e  $(\text{B})^+$  si riconosce facilmente, in quanto la loro somma dà la  $m/z$  dello ione molecolare  $\text{M}^+$ .

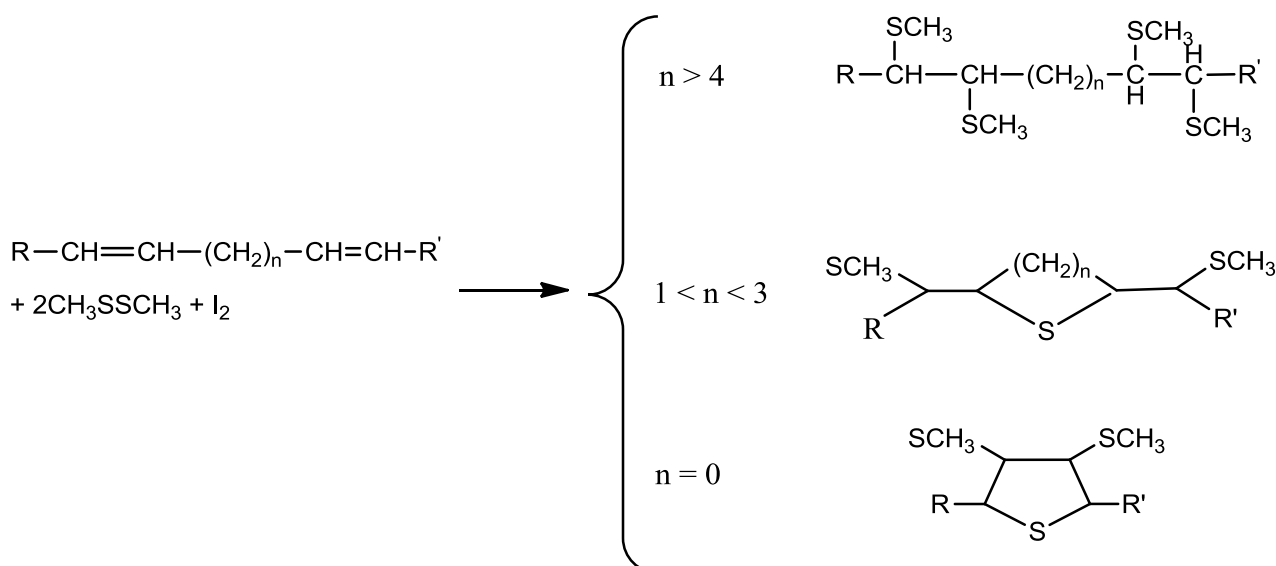
### 8.2.1 Derivatizzazione di dieni

In fig. 6 viene riportato lo schema di derivatizzazione nel caso in cui si abbiano due insaturazioni.

Con due insaturazioni coniugate ( $n = 0$ ), si forma un addotto ciclico (tioetere) a cinque termini sostituito con due dimetil solfuri e due sostituenti alchilici.

Quando il doppio legame carbonio-carbonio è separato da uno, due o tre gruppi metilene, la reazione del composto insaturo con due equivalenti di DMDS, fornisce rispettivamente tioeteri ciclici a quattro, cinque e sei termini. I due gruppi metil solfuro sono posti in  $\alpha$  rispetto all'anello.

Infine, se il doppio legame carbonio-carbonio è separato da quattro o più metilene, allora si formano gli addotti che ci si aspetta.

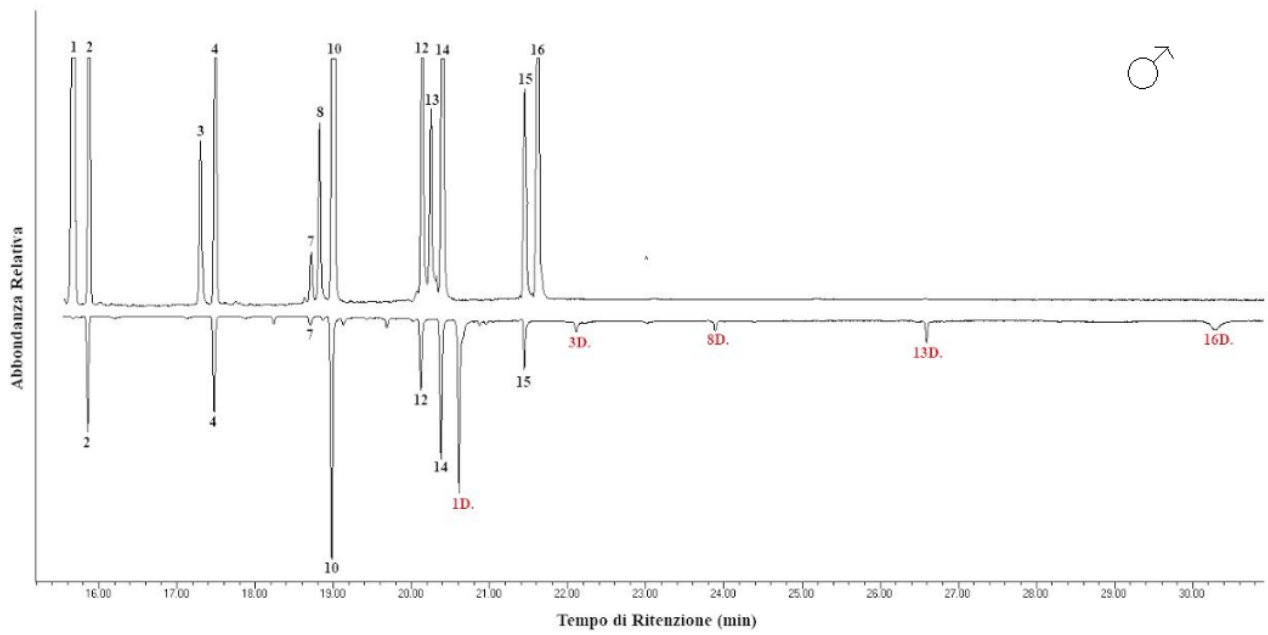


**Fig. 6** Schema di reazione di derivatizzazione con DMDS di dieni

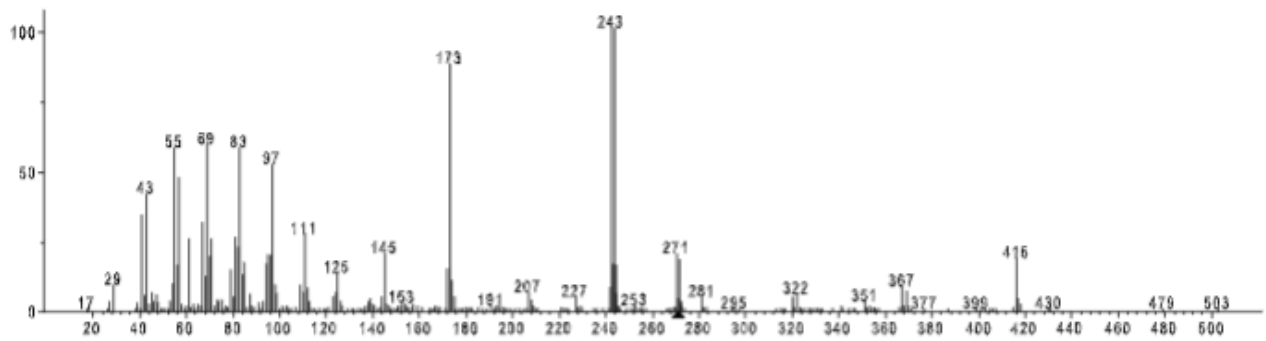
### 8.3 Derivatizzazione estratto del maschio di *A. bungii*

In fig.7 è riportato il cromatogramma dell'estratto del maschio del coleottero. I picchi (1D., 3D., 8D., 13D. e 16D.) indicano i cinque idrocarburi che hanno derivatizzato. In alto è riportato il cromatogramma dell'estratto prima della derivatizzazione e in basso lo spettro dopo la derivatizzazione con DMDS. Si osserva che i picchi 1,3,8,13,16 non compaiono nello spettro in basso e questo suggerisce che sono idrocarburi insaturi che hanno derivatizzato. I picchi in questione corrispondono rispettivamente a:

- **1D. : Z-9 tricosene.** Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 8) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  322 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 15.6 min. e dopo di 20.6 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  173 [ $CH_3(CH_2)_7CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  243 [ $H_3CS^+ =CH(CH_2)_{12}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio nove.

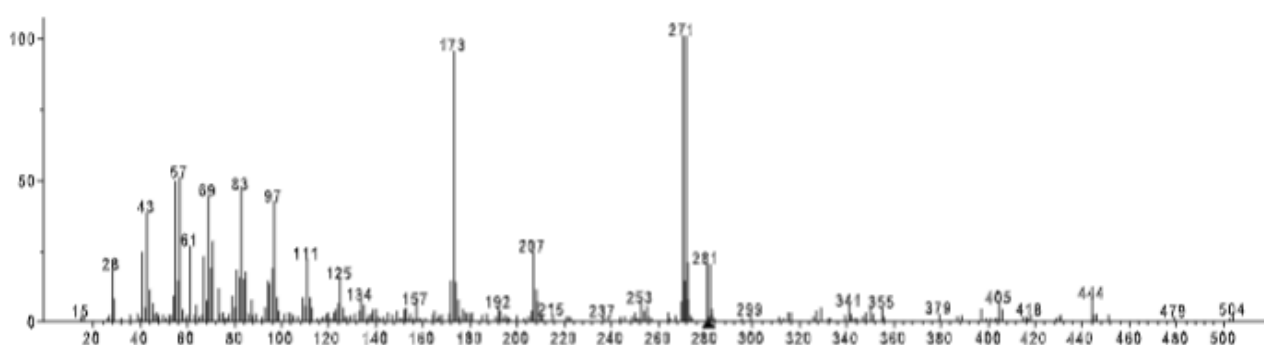


**Fig.7** Cromatogramma derivante dall'analisi GC-MS degli estratti maschio non derivatizzato (in alto) e derivatizzato(in basso) di *A. bungii*



**Fig. 8** Spettro di massa di Z-9 tricosene dopo derivatizzazione in GC-MS

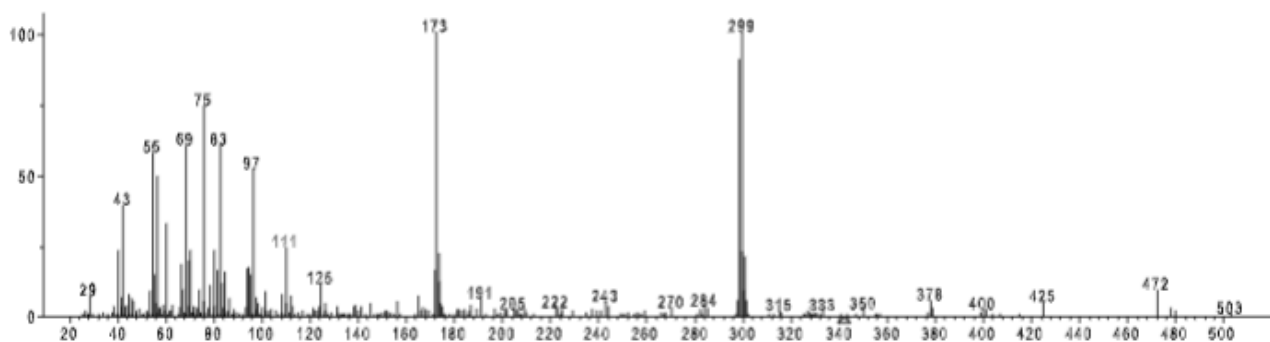
- **3D. : Z-9 pentacosene.** Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 9) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  350 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 17.4 min. e dopo di 22.2 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  173 [ $CH_3(CH_2)_7CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  271 [ $H_3CS^+ =CH(CH_2)_{14}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio nove.



**Fig. 9** Spettro di massa di Z-9 pentacosene dopo derivatizzazione in GC-MS

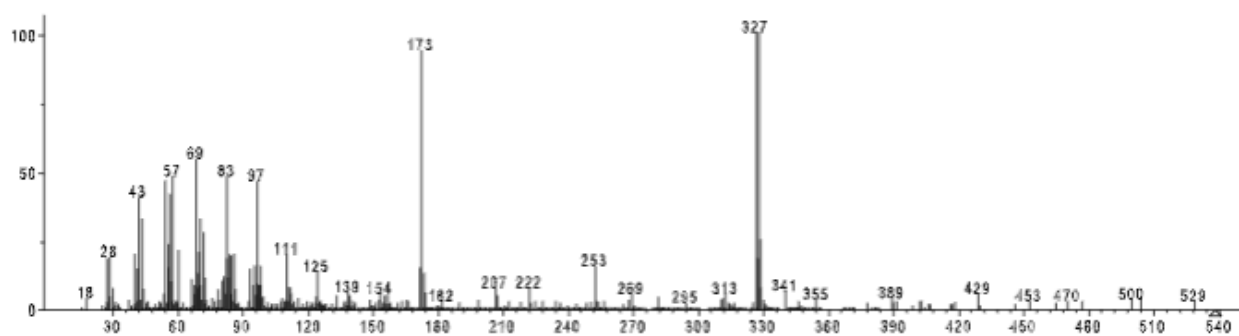
- **8D.: Z-9 heptacosene.** Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 10) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  378 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 18.8 min. e dopo di 24 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  173 [ $CH_3(CH_2)_7CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  299 [ $H_3CS^+ =CH(CH_2)_{16}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio nove.





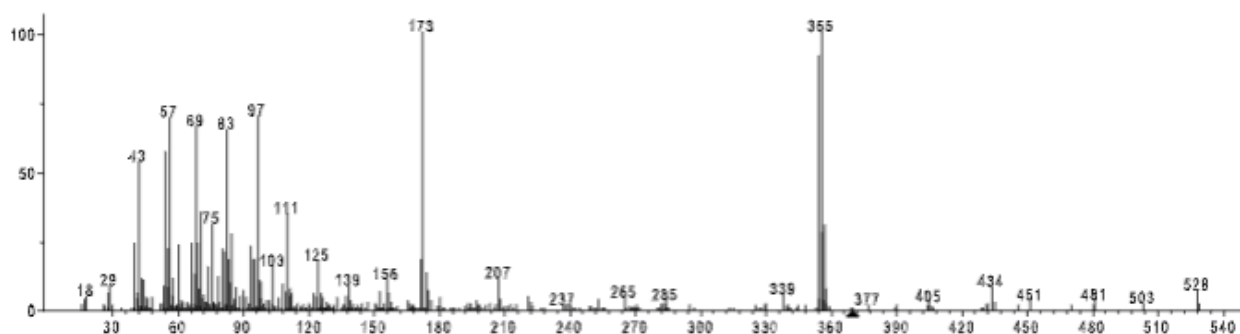
**Fig. 10** Spettro di massa di Z-9 heptacosene dopo derivatizzazione in GC-MS

- **13D.: Z-9 nonacosene.** Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 11) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  406 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 20.3 min. e dopo di 26.8 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  173 [ $CH_3(CH_2)_7CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  327 [ $H_3CS^+=CH(CH_2)_{18}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio nove.



**Fig. 11** Spettro di massa di Z-9 nonacosene dopo derivatizzazione in GC-MS

- **16D.: Z-9 monotriacontene.** Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 12) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  434 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 21.6 min. e dopo di 30.4 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  173 [ $CH_3(CH_2)_7CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  355 [ $H_3CS^+=CH(CH_2)_{20}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio nove.

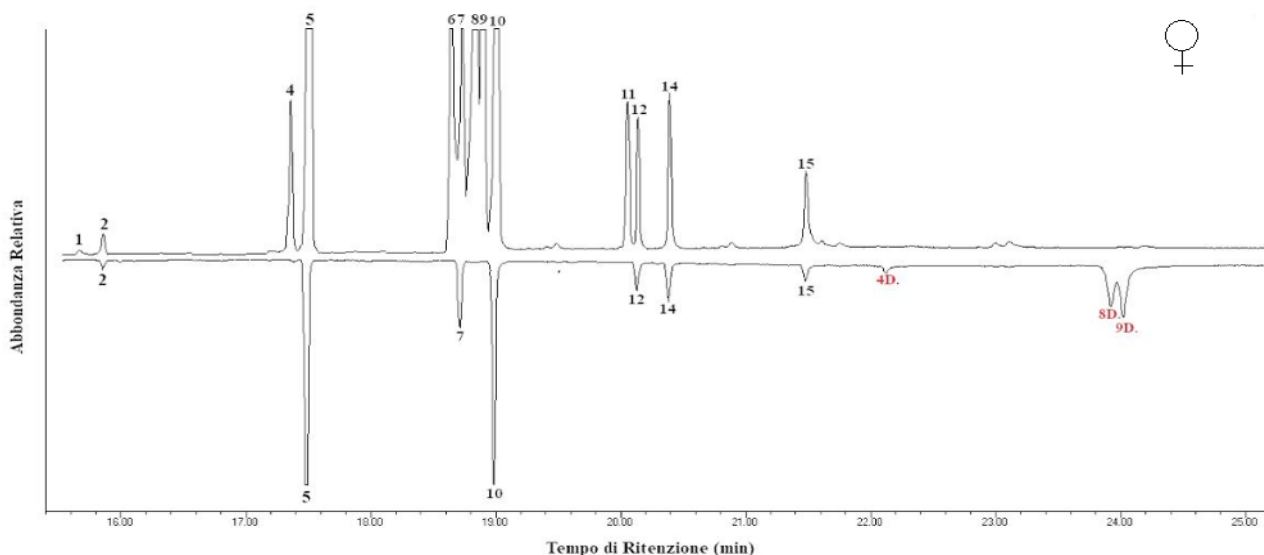


**Fig. 12** Spettro di massa di Z-9 monotriacontene dopo derivatizzazione in GC-MS

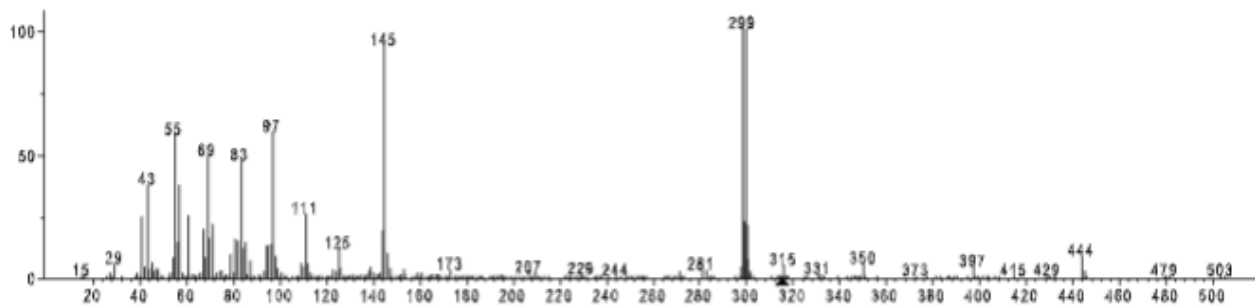
#### 8.4 Derivatizzazione estratto della femmina di *A. bungii*

In fig.13 è riportato il cromatogramma dell'estratto della femmina del coleottero. I picchi (4D., 8D.,9D.) indicano i tre idrocarburi che hanno derivatizzato. In alto è riportato il cromatogramma dell'estratto prima della derivatizzazione e in basso lo spettro dopo la derivatizzazione con DMDS. Si osserva che i picchi 4,8,9 non compaiono nello spettro in basso e questo suggerisce che sono idrocarburi insaturi che hanno derivatizzato. I picchi in questione corrispondono rispettivamente a:

- **4D. : Z-7 pentacosene.** Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 14) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  350 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 17.4 min. e dopo di 22.2 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  145 [ $CH_3(CH_2)_5CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  299 [ $H_3CS^+ =CH(CH_2)_{16}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio sette.

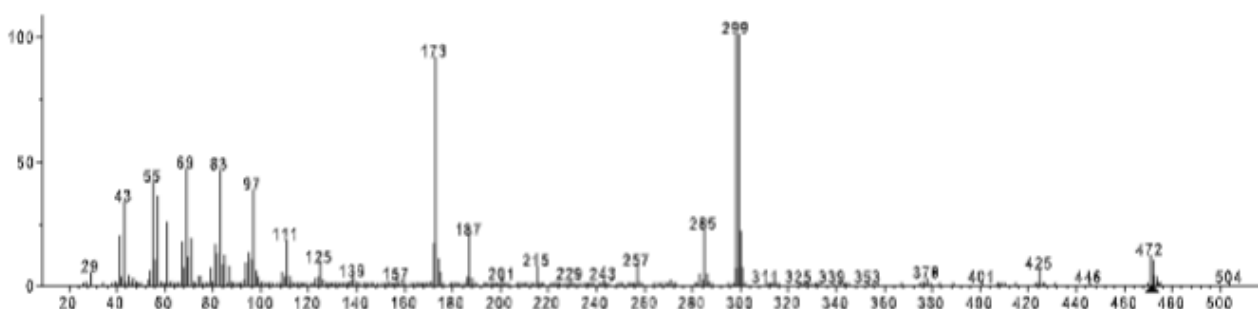


**Fig.13** Cromatogramma derivante dall'analisi GC-MS degli estratti femmina non derivatizzato (in alto) e derivatizzato(in basso) di *A. bungii*



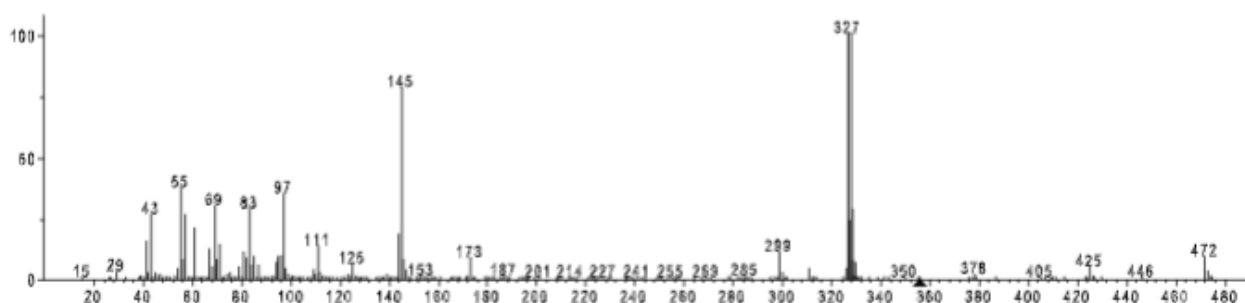
**Fig. 14** Spettro di massa di Z-7 pentacosene dopo derivatizzazione in GC-MS

- 8D. : Z-9 heptacosene. Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 15) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  378 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 18.8 min. e dopo di 23.9 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  173 [ $CH_3(CH_2)_7CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  299 [ $H_3CS^+ = CH(CH_2)_{16}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio nove.



**Fig. 15** Spettro di massa di Z-9 heptacosene dopo derivatizzazione in GC-MS

- 4D. : Z-7 heptacosene. Lo spettro di massa dell'idrocarburo derivatizzato (fig. 16) mostra lo ione molecolare ( $M^+$ )  $m/z$  378 e gli ioni diagnostici  $m/z$  83, 97, 111. Il tempo di ritenzione dell'idrocarburo prima della derivatizzazione risulta di 18.9 min. e dopo di 24.1 min. Gli ioni caratteristici a  $m/z$  145 [ $CH_3(CH_2)_5CH=SCH_3^+$ ] e a  $m/z$  327 [ $H_3CS^+ =CH(CH_2)_{18}CH_3$ ], quest'ultimo rappresenta il picco base, suggeriscono una geometria *cis* e la posizione dell'insaturazione nel carbonio sette.



**Fig. 16** Spettro di massa di Z-7 heptacosene dopo derivatizzazione in GC-MS

## 8.5 Discussione

Gli studi condotti sono stati incentrati sull'identificazione e caratterizzazione degli idrocarburi presenti sui sensilli antennali di *A. bungii*, riprendendo e approfondendo un precedente lavoro (Di Palma et al., 2019) dove alcuni idrocarburi sono stati indicati genericamente (in particolare quelli aventi insaturazione) e senza definire la posizione corretta del doppio legame carbonio-carbonio.

Confrontando gli estratti maschio e femmina si notano degli idrocarburi in comune. Per quanto concerne gli alcani si hanno tricosano ( $C_{23}$ ), pentacosano ( $C_{25}$ ), eptacosano ( $C_{27}$ ) e nonacosano ( $C_{29}$ ). Si osserva che sono presenti solo quelli a numero di carboni dispari. Sono stati identificati anche degli idrocarburi ramificati, quali 2-metil esacosano, 2-metil ottacosano e 2-metil triacosano. Infine sono stati caratterizzati gli idrocarburi insaturi. Sono in comune al maschio e alla femmina Z-9 tricosene e Z-9 eptacosene. Tuttavia Z-9 tricosene non compare nel cromatogramma di derivatizzazione della femmina riportato in Fig.13 e la causa potrebbe essere una concentrazione diluita utilizzata in GC-MS. Ma nel lavoro di Di Palma et al.,2019, viene riportato che la femmina cerambicide presenta Z-9 tricosene sui relativi sensilli antennali.

Nel maschio sono stati identificati i suddetti idrocarburi insaturi: Z-9 pentacosene, Z-9 nonacosene e Z-9 monotriacosene. Nella femmina invece: Z-7 pentacosene e Z-7 eptacosene.

Nella femmina sono stati identificati anche due dieni rispettivamente a  $C_{27}$  e a  $C_{29}$ . Tuttavia anche questi idrocarburi, come nel caso di Z-9 tricosene sempre nella femmina, non compaiono in Fig.13 e quindi non si può stabilire con esattezza la posizione delle due insaturazioni all'interno della catena. Inoltre questi sono presenti in tracce nell'estratto originale e quindi difficili da derivatizzare: servirebbe uno strumento con una risoluzione più elevata di un normale GC-MS.

Studi comportamentali condotti su molte specie di coleotteri cerambicidi affermano che i feromoni di contatto svolgono un ruolo importante nella riproduzione: i maschi sembrano riconoscere possibili partner solo dopo che le antenne sono state in contatto con le antenne o con altre parti del corpo di individui conspecifici (Zhang et al., 2003). Dalle osservazioni fatte in laboratorio è emerso che in tutte le prove effettuate (5 prove) le provette in polipropilene caricate con il secreto antennale di femmine hanno suscitato nei maschi risposte di accoppiamento dopo contatto antennale con la provetta (Fig. 21), suggerendo, quindi, la presenza di composti in grado di fungere da feromoni di contatto nel riconoscimento del partner (Ginzel, 2010).

## **9. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE**

La tecnica di derivatizzazione in gascromatografia-spettrometria di massa si è rivelata utile nell'identificazione degli idrocarburi presenti nei sensilli antennali ed in particolar modo nell'attribuzione della posizione del doppio legame nel caso di composti insaturi. I preliminari saggi comportamentali, hanno indicato che l'estratto ottenuto dalle antenne della femmina, distribuito su un supporto di polietilene, quindi in assenza di stimoli visivi, è in grado di indurre comportamenti riproduttivi nel maschio quali l'estroffessione dell'organo genitale e il tentativi di accoppiamento. Ciò a conferma di quanto osservato in altre specie di cerambicidi circa la presenza nei secreti antennali di sostanze di contatto deputate al riconoscimento tra i sessi e fondamentali per la riproduzione. Purtroppo, per cause di forza maggiore, non è stato possibile sintetizzare gli idrocarburi identificati, ma in futuro è possibile farlo in modo da individuare quale o quali tra i tanti idrocarburi presenti si comportano da feromoni di contatto. Questo lo si potrà fare studiando il comportamento degli insetti in saggi comportamentali come quelli descritti e valutando la risposta del maschio e della femmina a diverse concentrazioni di composti singoli, loro miscele.

## 10. IMMAGINI



**Fig. 17** *Aromia bungii* posata su una foglia di ciliegio. (Fonte: Prefettura di Gunma, Giappone, luglio 2016).



**Fig. 18** (A) Un albero di pesco infestato da *A. bungii* (Fonte: Prefettura di Tokushima, Giappone, agosto 2016), che mostra la massa voluminosa prodotta dalle larve. (B) Danno strutturale al tronco causato dalle gallerie scavate dalle larve.





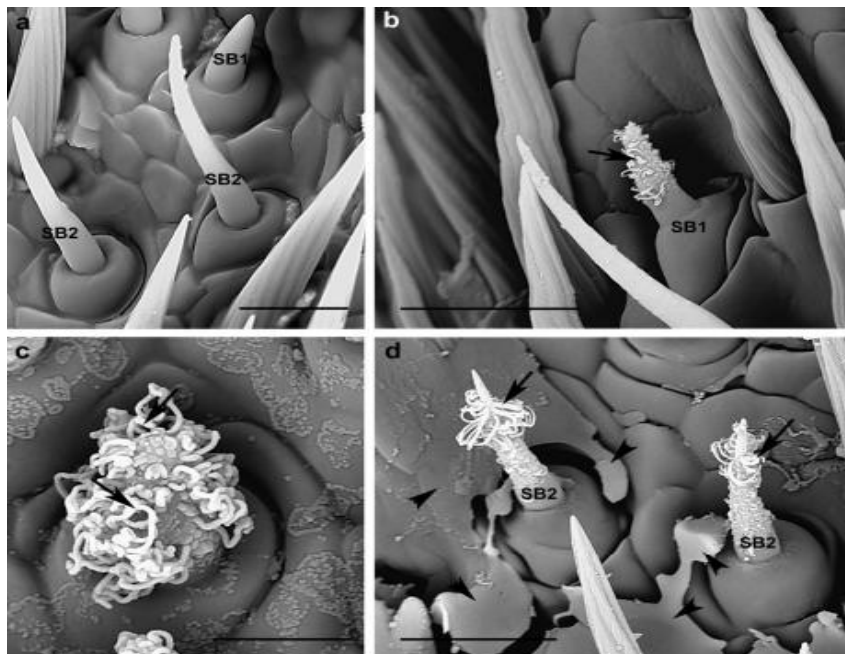
**Fig. 19** Larva di *A. bungii* (Fonte: Regione Campania – Assessorato Agricoltura)



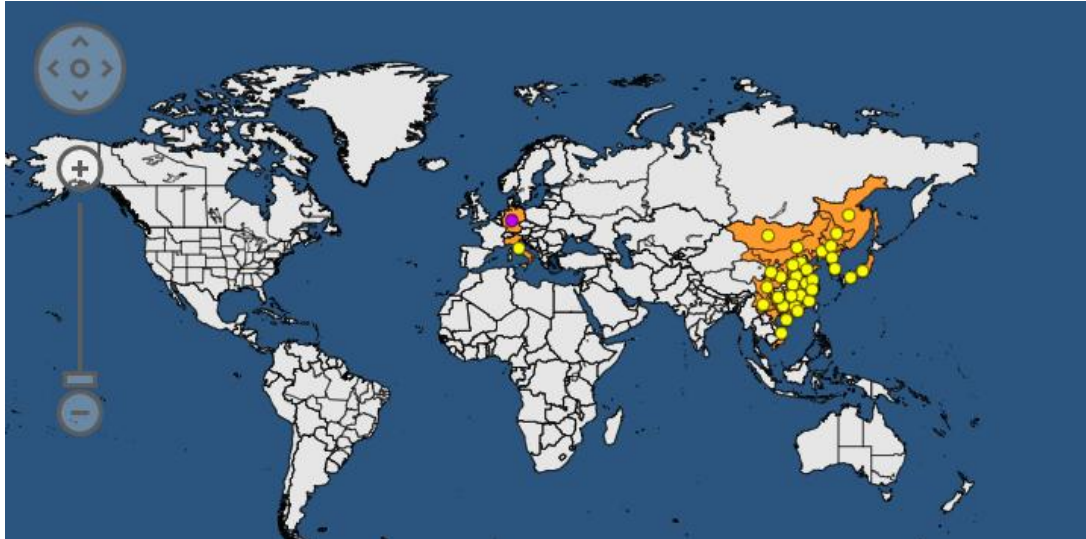
**Fig. 20** Adulto di *A. bungii* maschio (a sinistra) e femmina (a destra). Si notano nel maschio le antenne più lunghe.



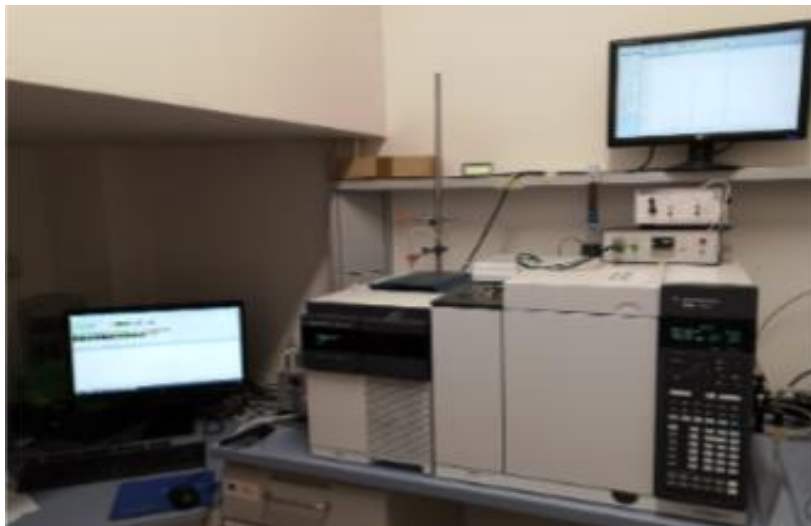
**Fig. 21** Maschio di *A. bungii* durante la fase di eccitazione. L'insetto è stato posto in un contenitore di plastica drogato con feromoni di contatto della femmina. Come si può notare, si prepara all'accoppiamento in quanto percepisce i composti anche se la femmina effettivamente non c'è.



**Fig. 22** Sensilli basicinici di *A. bungii* (SEM). (a) Femmina. (b) Dettaglio di sensillo ricoperto da abbondante e condensato materiale viscoso della femmina e (c) del maschio. (d) Dettaglio di due sensilli con materiale viscoso e condensato fuori dalle loro pareti e sulla superficie antennale del maschio. (Fonte: Di Palma et al., 2019).



**Fig. 23** Mappa di distribuzione di *A. bungii*. Si osserva che è diffusa in estremo Oriente ed in Europa (Germania e Italia). In Italia è particolarmente diffusa in Campania (Napoli). (Fonte: EPPO)



**Fig. 24** Gascromatografo ifenato con spettrometro di massa (GC-MS). (Fonte: Università degli Studi di Foggia)

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Birch M.C., Haynes K.F. (1984). *Introduzione ai feromoni*, Milano, Cesav, 95 pp
- Buser H.R., Arn H., Guerin P., Rauscher S. (1983), *Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adduct*. Anal. Chem. 55, 818-822.
- Champion D.G., Crichley B.R., McVeigh L.J. (1989). *Mating disruption*. In *Insect Pheromones in Plant Protection* (eds Jutsum A.R. e Gordon R.F.S.), Jhon Wiley & Sons, Chichester, pp. 89-122
- Carlson D.A., Roan C.S., Yost R.A., Hector J., *Dimethyl Disulfide Derivatives of Long Chain Alkenes, Alkadienes, and Alkatrienes for Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Anal. Chem. 1989, 61, 1564-1571.
- Celli G., Maini S. (1988). *Lotta biologica integrata in agricoltura*, Cestaat, Roma: 196 pp
- Dent J.F. (1991). *Accounting and organizational cultures: A field study of the emergence of a new organizational reality*, LSE, UK, vol.16, pp.705-732
- Di Palma A., Pistillo M., Griffio R., Garonna A.P., Germinara G.S. *Scanning Electron Microscopy of the Antennal Sensilla and Their Secretion Analysis in Adults of Aromia bungii (Faldermann, 1835) (Coleoptera, Cerambycidae)*, Insects 2019, 10,88.
- EPPO. First Report of *Aromia bungii* in Germany: Addition to the EPPO Alert List. EPPO Reporting Service, September 2012.
- EPPO. First Report of *Aromia bungii* in Italy. EPPO Reporting Service, 1 October 2012
- EPPO. *Aromia bungii* Found for the First Time in Lombardia Region, Italy. EPPO Reporting Service, September 2013.
- Fukaya , M. , Yasuda , T. , Wakamura , S. and Honda , H. ( 1996 ). *Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, Psacotha hilaris (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). 3. Identification of contact sex pheromone on female body surface* . J. Chem. Ecol ., 22 , 259 –270.
- Fukaya , M. , Wakamura , S. , Yasuda , T. , Senda , S. , Omata , T. and Fukusaki , E. ( 1997 ). *Sex pheromonal activity of geometric and optical isomers of synthetic contact pheromone to males of the yellow-spotted longicorn beetle, Psacotha hilaris (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae)* . Appl. Entomol. Zool ., 32 , 654 –656.
- Fukaya , M. , Akino , T. , Yasuda , T. , Wakamura , S. , Satoda , S. and Senda , S. ( 2000 ). *Hydrocarbon components in contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, Anoplophora malasiaca (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) and pheromonal activity of synthetic hydrocarbons* . Entomol. Sci., 3 , 211 –218.
- Germinara G.S. (2014). *Prospettive di sviluppo pratico di tecnologie basate sull'uso dei semiochimici in agricoltura*, Terra e vita, 9:1-2
- Gibbs , A. G. ( 1998 ). *Water-proofing properties of cuticular lipids* . Am. Zool., 38 , 471 –482.
- Ginzel, M. D., Millar J. G., Hanks L. M. (2003), *(Z)-9-Pentacosene-contact sex pheromone of the locust borer, Megacyllene robiniae*, Chemoecology 13:135-141.
- Ginzel , M. D . and Hanks , L. M . ( 2003 ). *Contact pheromones as mate recognition cues of four species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae)* . J. Insect Behav ., 16 , 181 –187.
- Ginzel , M. D . and Hanks , L. M . ( 2005 ). *Role of host plant volatiles in mate location for three species of longhorned beetles* . J. Chem. Ecol., 31, 213 –217.

- Ginzel , M. D ., Moreira , J. A ., Ray , A. M ., Millar , J. G . and Hanks , L. M . ( 2006 ). *(Z)-9-Nonacosene – Major component of the contact sex pheromone of the beetle Megacyllene caryae* . J. Chem. Ecol. , 32 , 435 –451.
- Ginzel, M.D. *Hydrocarbons as contact pheromones of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae)*. In *Insect Hydrocarbons*; Blomquist, G.J., Bagnères, A.G., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2010; pp. 375–389.
- Hanks , L. M . ( 1999 ). *Influence of the larval host plant on reproduction strategies of cerambycid beetles* . Ann. Rev. Entomol ., 44 , 483 –505.
- Howard , R. W . and Blomquist , G. J . ( 2005 ). *Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons* . Ann. Rev. Entomol ., 50 , 371 –393.
- Howse P.E., Stevens I.D.R., Jones O.T. (1998). *Insect Pheromones and their Use in Pest Management*, Salisbury, Chapman & Hall, DOI 10.1007/978-94-011-5344-7
- Karloson P., Luscher M. (1959). *Pheromones’: a new term for a class of biologically active substances*, Nature 183 (4653): 55-56
- Kim , G. H ., Takabayashi , J. , Takahashi , S. and Tabata , K. ( 1993 ). *Function of contact pheromone in the mating behavior of the cryptomeria bark borer, Semanotus japonicus Lacordaire (Coleoptera: Cerambycidae)* . Appl. Entomol. Zool., 28 , 525 –535.
- Law J.H., Regnier F.E. (1971). *Pheromones*, Annu. Rev. Biochem. 40: 533-544
- Masutti L., Zancheri S. (2001). *Entomologia generale e applicata*, Padova, Cedam Ed., 978 pp
- Millar J.R., Gut L.J., de Lame F.M., Stelinski L.L. (2006). *Differentiation of competitive vs. non competitive mechanisms mediating disruption of moths sexual communication by point sources of sex pheromone (part 1): theory*, J. Chem. Ecol., 32: 2089-2114
- Regnier F.E. (1971). *Semiochemical – structure and function*, Article Literature Review, DOI: 10.1093/biolreplod/4.3.309, Source: PubMed
- Regione Campania, Decreto Dirigenziale n° 23 del 10/02/2017.
- Rotundo et al, (2015). *Difesa delle piante mediante biotecnologie* Firenze, 10 dicembre 2015
- Rotundo G., Germinara G.S. (2016). *I semiochimici in agricoltura*, Atti dell’Accademia dei Georgofili, Serie VIII, vol. 12: 25-41
- Sanders C.J. (1995). *Mechanism of mating disruption in moth*. In: *Insect pheromone research new direction*. Cardè R.T., Minks A.K. (eds), ITP., 333-346
- Tremblay E., Rotundo G. (1980). *I feromoni*, In “*Prospettive di controllo biologico degli insetti in agricoltura*”, S. Zangheri Ed., C.N.R.A.Q., 1: 81-121.51-56
- Tremblay E. (1999). *Entomologia applicata*, Vol. I, Generalità e mezzi di controllo, Liguori Ed., Napoli: 269 pp
- Vincenti M., Guglielmetti G., Cassani G., Tonini C., *Determination of Double Bond Position in Diunsaturated Compounds by Mass Spectrometry of Dimethyl Disulfide Derivates*, Anal. Chem. 1987, 59, 694-699.
- Weatherston I. (1990). *Principles of design of controlled-release formulations*. In: *Behaviour-modifying Chemicals for Insect Management: Applications of Pheromones and other Attractants (eds RL: Ridgway, RM, Silverstein and M.N. Inscoe)*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 93-112
- Wilson E.O., Bossert W.H. (1963). *The analysis of olfactory communication among animals, recent progress*, Horm. Res., 19: 673-716

- Xu T., Yasui H., Teale S.A., Fujiwara-Tsujii N., Wickham J.D., Fukaya M., Hansen L., Kiriya S., Hao D., Nakano A., Zhang L., Watanabe T., Tokoro M., Millar J. G. *Identification of a male-produced sex-aggregation pheromone for a highly invasive cerambycid beetle, Aromia bungii*, Scientific Reports 7:7330, 2017.
- Yasui , H. , Akino , T. , Yasuda , T. , Fukaya , M. , Ono , H. and Wakamura , S. ( 2003 ). *Ketone components in the contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, Anoplophora malasiaca , and pheromonal activity of synthetic ketones* . Entomol. Exp. Appl ., 107 , 167 –176.
- Zhang , A. J ., Oliver , J. E ., Chauhan , K. , Zhao , B. G ., Xia , L. Q . and Xu , Z. C. ( 2003 ). *Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, Anoplophora glabripennis (Coleoptera: Cerambycidae)* . Naturwissenschaften , 90 , 410 – 413.