



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

INIBIZIONE DELLE COMUNICAZIONI FEROMONICHE TRA LE FORMICHE

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureando: Daniele Rizzi  
1225349

Anno Accademico 2021/2022

# INDICE

1 INTRODUZIONE.....	1
2 STRUTTURA SOCIALE .....	3
3 IDENTIFICAZIONE DEI FEROMONI .....	5
4 BIOSINTESI DEI FEROMONI.....	7
5 RICEZIONE DEI FEROMONI .....	11
5.1 GENETICA DI RICONOSCIMENTO.....	13
5.2 IDORCARBURI CORRELATI AL SUPERGENE .....	14
6 AUTOINIBIZIONE.....	17
6.1 SINTESI DEL 3-MEC31 .....	18
7 CONCLUSIONI .....	20
8 BIBLIOGRAFIA .....	22

# 1 INTRODUZIONE

Il controllo delle varie specie animali, finalizzato alla salvaguardia delle risorse e al benessere delle persone, ad oggi dispone delle conoscenze teoriche per far sì che diverse tecniche vengano applicate per rispettare il più possibile l'ambiente e gli esseri viventi, ma non ha ancora a disposizione i mezzi pratici per farlo. L'utilizzo di repellenti specifici permetterebbe una più mirata eradicazione dell'agente infestante con un minore impatto ambientale; nello specifico, gli insetticidi utilizzati per la rimozione delle formiche dalle case o dalle coltivazioni agiscono ad ampio spettro, non limitandosi ad eliminare unicamente questi insetti, ma tutti quelli che ne vengono a contatto. Una disinfestazione selettiva, che può arrivare a distinguere specie per specie, risulterebbe quindi non solo più efficiente, ma implicherebbe anche un impatto ambientale significativamente ridotto. Agendo in maniera mirata, utilizzando strumenti nocivi solo per il bersaglio della disinfestazione, si andrebbe ad avere un'influenza quasi del tutto nulla sulla catena alimentare che coinvolge quel determinato target.

In questo studio, si vuole porre l'attenzione, in particolare, sulle formiche e, quindi, sui possibili trattamenti chimici che si possono mettere in atto per bonificare gli ambienti dalla loro presenza. Al fine di attuare il concetto di repellente specifico, è necessario individuare un fattore discriminante tra le varie specie, che sia in grado di identificarle in maniera univoca; per questo, può essere utile sfruttare il metodo con cui naturalmente le formiche si riconoscono tra loro, ossia i feromoni.

La struttura sociale delle formiche prevede una divisione in caste con ruoli specifici: questa differenziazione porta alle formiche numerosi vantaggi rispetto agli altri insetti solitari. Tuttavia, per essere attuata, è stata necessaria l'evoluzione di un complesso ed efficiente sistema di linguaggio [1].

Il metodo di comunicazione di questi insetti eusociali sono per l'appunto i feromoni. Si tratta principalmente di idrocarburi, per la maggior parte saturi, con pochissime ramificazioni e a basso peso molecolare; queste molecole, se rilasciate da un certo individuo, riescono ad indurre risposte comportamentali o fisiologiche in un altro individuo della stessa specie [2][3]. Ogni individuo di una colonia possiede sul suo esoscheletro uno specifico profilo chimico che gli permette di essere riconosciuto dagli altri membri come parte di essa; inoltre, è in grado di rilasciare specifiche miscele di feromoni, volatili o non volatili, per comunicare bisogni o avvertimenti come, ad esempio, un pericolo imminente o un sito di foraggiamento [4].

Di particolare interesse sono i feromoni prodotti dalla regina dal momento che, oltre a svolgere le funzioni che esercitano anche nelle operaie, quelli di questo particolare individuo sono in grado di influenzare attivamente la struttura sociale della colonia. Le regine, attraverso di essi, riescono non solo ad inibire la nascita, dalle uova, di individui in grado di riprodursi, ma regolano le popolazioni delle varie caste in base alla grandezza della colonia [1]. Una colonia giovane avrà grande necessità di foraggiatrici – si tratta di formiche che escono dal nido per andare a cercare il nutrimento per la colonia – a discapito di soldati o operaie maggiori, i quali richiedono un maggior quantitativo di risorse per lo sviluppo; la regina, quindi, produce specifici feromoni che inducono la nascita di operaie semplici a discapito di altre caste. Successivamente, quando la colonia si ingrandisce viene favorito lo sviluppo di operaie più grandi data la maggiore quantità di risorse.

Lo studio dei feromoni, in particolare quelli della regina, può essere quindi utilizzato per il controllo e la differenziazione delle varie specie; agendo su di essi, si avrà controllo sul destino dell'intera colonia. Una eradicazione mirata nei confronti della regina permetterebbe l'eliminazione dell'intera colonia con un impatto ambientale e un consumo di risorse minore. Agendo con gli attuali veleni, infatti, si ottiene come risultato l'eliminazione di una parziale quantità di formiche operaie: si ottengono quindi dei vantaggi temporanei e non permanenti.

## 2 STRUTTURA SOCIALE

Il particolare successo avuto dalle formiche, che le ha rese l'animale che conta più individui al mondo, risiede nella loro struttura sociale. Essa, infatti, prevede una suddivisione in caste dove ogni individuo è specializzato nell'eseguire una o più mansioni.

La regina, all'interno di una colonia, è l'unico membro in grado di riprodursi ed ha come unico compito la deposizione delle uova. Essa è l'individuo più vecchio tra tutti e, salvo situazioni di emergenza, trascorre all'interno del formicaio tutta la sua vita.

Dalle uova prodotte si sviluppano poi delle larve che vengono nutrite e pulite dalla regina, nelle fasi iniziali della colonia, e successivamente dalle operaie; le larve, trascorso un determinato lasso di tempo, si impupano e gli individui adulti, infine, sfarfallano.



Figura 1: Una formica operaia, in alto a destra, sta sorvegliando una covata composta da larve di diverse dimensioni ed una pupa, in basso a sinistra.

Le operaie invece svolgono diversi compiti, tra i quali la ricerca di cibo, l'ampliamento del nido, la cura della prole e della regina ed infine la difesa. Inoltre, si tratta di individui solo di sesso femminile, incapaci di riprodursi in quanto sterili.

I maschi non hanno ruoli attivi all'interno della colonia: il loro unico scopo è volare all'esterno del nido durante i periodi riproduttivi per accoppiarsi con le neo-regine e poi morire.

Le colonie di formiche si dividono in due grandi tipologie:

- colonie monoginiche, in cui è presente una singola regina;
- colonie poliginiche, nelle quali sono presenti più regine contemporaneamente che depongono e vivono insieme nel formicaio.



Figura 2: Evidenze delle diverse morfologie delle formiche *Messor barbarus*; nella parte alta dell'immagine ed in basso a destra, è rappresentata una regina mentre, in basso a sinistra, è presente un'operaia media e, al centro, un'operaia minore.

La fondazione di una colonia da parte di una nuova regina avviene a seguito dell'accoppiamento della stessa con uno o più maschi nei periodi di sciamatura. Le neo-regine non ancora fecondate posseggono delle ali che permettono loro di volare al di fuori del formicaio dove sono nate alla ricerca di maschi con cui accoppiarsi. Questi voli prendono il nome di voli nuziali ed avvengono durante specifici periodi dell'anno che variano da specie a specie. Una volta che la regina si è accoppiata, scende a terra, si rimuove le ali e va alla ricerca di un luogo dove deporre le uova ed iniziare una nuova colonia.

### 3 IDENTIFICAZIONE DEI FEROMONI

Per prima cosa, si vuole quindi capire quali siano i feromoni utilizzati dalle formiche, perciò, bisogna identificarli; di seguito, grazie alle informazioni reperite nello studio effettuato da Yan H. [3], vengono presentate le tecniche principali utilizzate a tal fine e le caratteristiche osservate generalmente su queste molecole.

L'analisi e l'identificazione dei feromoni risulta particolarmente importante per lo studio di metodi di inibizione efficaci. Le proprietà chimiche e strutturali delle molecole di interesse forniscono informazioni preziose che permettono di ricavare, in primo luogo, dei metodi di sintesi del feromone originale e, in secondo luogo, le sue possibili alterazioni per variare o accentuare determinati comportamenti.

Tuttavia, la complessità delle comunicazioni di questi insetti viene confermata dall'elevato numero di feromoni che questi utilizzano. Il comportamento adottato da un individuo all'interno della colonia non solo è influenzato dal tipo, nella maggior parte dei casi dalla miscela, di questi feromoni, ma anche dalla loro stereospecificità.

Le formiche, infatti, possono talvolta produrre miscele raceme oppure emanare selettivamente uno stereoisomero in quantità superiore. Un esempio è l'S-4-metil-3-eptanone prodotto dalle formiche *Atta texana* come feromone d'allarme: tale sostanza risulta indurre un comportamento aggressivo nei vari individui a concentrazioni cento volte minori rispetto allo stereoisomero R.

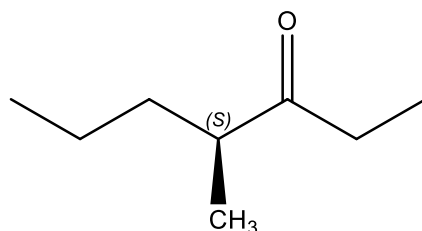


Figura 3: S-4-metil-3-eptanone

Di conseguenza, in questo caso, la sintesi di una miscela racema risulterebbe sconveniente all'animale in quanto il secondo composto non avrebbe alcun tipo di funzionalità e consisterebbe unicamente in uno spreco di risorse.

Per poter identificare un feromone è quindi necessario per prima cosa estrarlo; a tal fine, risulta indispensabile possedere i campioni di formiche di interesse. Gli idrocarburi cuticolari vengono, generalmente, direttamente estratti dai corpi di formiche prelevate in natura.

Per la loro estrazione si possono immergere le formiche in solventi organici, come ad esempio l'esano; l'utilizzo di questi solventi, inoltre, favorisce i successivi processi di purificazione in

quanto sono facilmente separabili dagli idrocarburi di interesse. Questa metodica presenta anche dei difetti, tra cui il fatto che vanno a diluire concentrazioni già infinitesime di alcuni di questi feromoni ed inoltre potrebbero dare reazioni collaterali reagendo con alcuni di essi.

La tecnica di analisi maggiormente utilizzata in questo caso è la gas-cromatografia data la natura volatile di queste sostanze; questa tecnologia, infatti, ha abbastanza risoluzione per identificare al meglio i componenti della miscela di idrocarburi e la sensibilità necessaria a rilevare anche quelli a concentrazioni basse.

Visto quanto detto in precedenza, le analisi vengono effettuate direttamente sul campione solido: i corpi delle formiche vengono inseriti in un capillare di vetro posto all'ingresso di un gas-cromatografo modificato appositamente; a questo punto, vengono schiacciati e frammentati permettendo ai composti volatili di uscire ed essere immediatamente iniettati all'interno del gas-cromatografo.

Seguono analisi strutturali attraverso tecniche come la spettrometria di massa, l'IR, l'UV e l'NMR; tali procedimenti, tuttavia, richiedono quantità di analita non sempre disponibili. Di conseguenza, è necessario utilizzare strumenti con un'elevata sensibilità in maniera tale da identificare immediatamente e correttamente la struttura delle molecole e procedere poi con delle ipotesi sulla loro biosintesi.



## 4 BIOSINTESI DEI FEROMONI

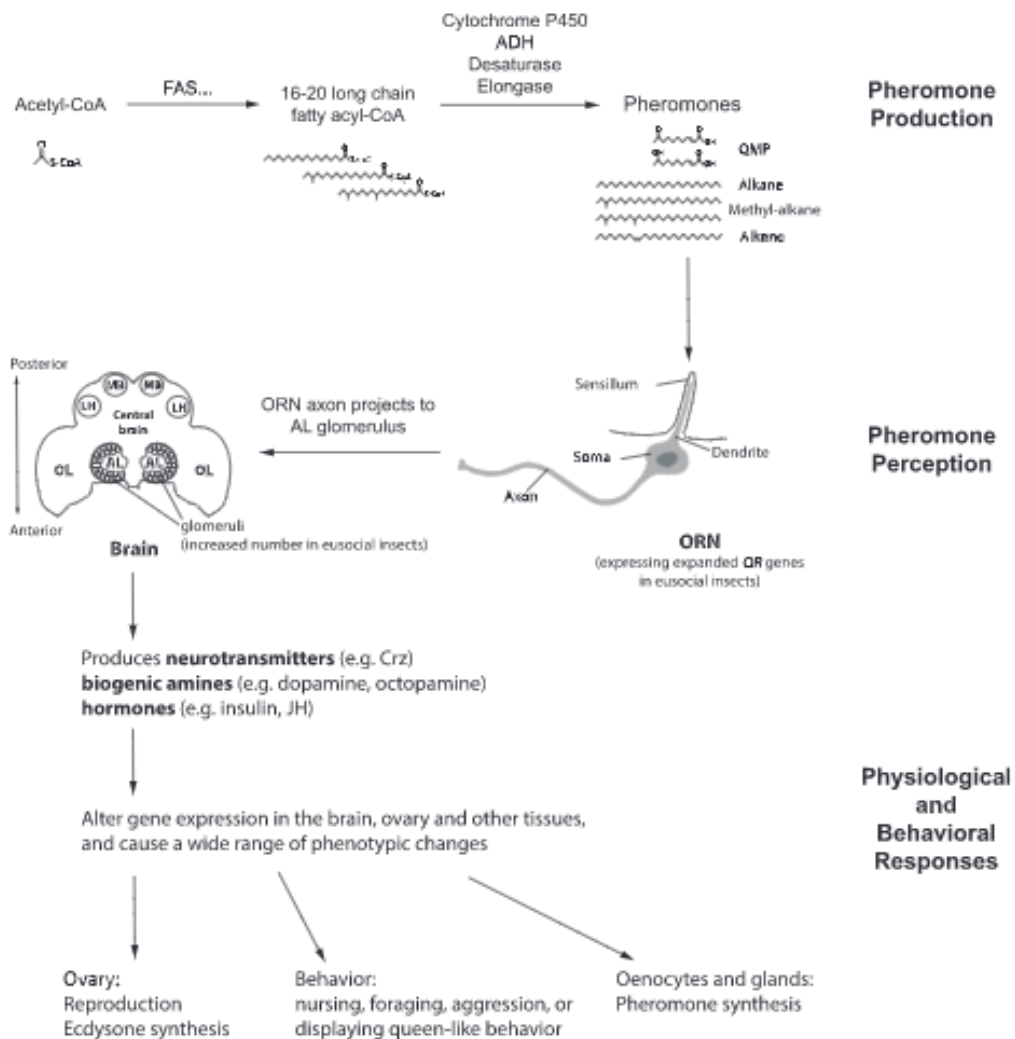


Figura 4: Nello schema, viene presentata la produzione di feromoni a partire dall'acetil-CoA fino alla loro ricezione ed alla risposta da parte dell'individuo ricevente.

La produzione di composti chimici da parte degli insetti avviene in particolari ghiandole situate su tutto il corpo dell'animale, in particolare sull'addome [3]. Le formiche non sono gli unici insetti a produrre sostanze chimiche dall'esoscheletro; difatti, idrocarburi per prevenire la disidratazione e disinfettare vengono prodotti anche da altri animali che possono essere talvolta solitari. Tali sostanze vengono chiamate idrocarburi cuticolari, CHC, e le formiche, come d'altronde anche altri insetti eusociali, li utilizzano come importantissimi feromoni. Questi composti vengono impiegati, in particolar modo, da parte delle regine che, addizionandoli con tetraidrofurani, terpeni ed alcoli [3] li utilizzano come sistema di comunicazione regina-operaia.

Alcuni esempi di queste molecole sono riportati di seguito:

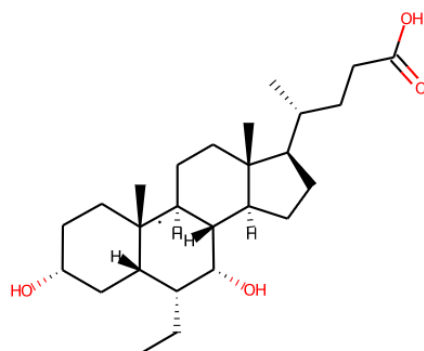


Figura 5: acido-(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ )-6-etil-3,7-diidrossicolan-24-oico

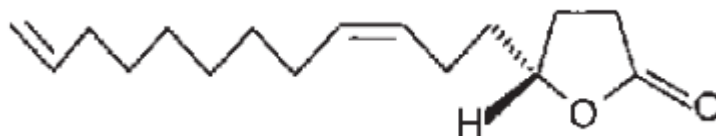


Figura 6: (5R)-5-[(3Z)-dodeca-3,11-diene-1-il]ossolan-2-one

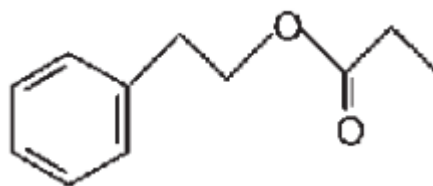


Figura 7: feniletilpropionato

Tuttavia, essendo la produzione di queste sostanze una convergenza evolutiva comune a molti generi di insetti, al fine dello studio di repellenti speciali, è stata necessaria una caratterizzazione specifica per creare una miscela di sostanze organiche caratteristiche di una determinata specie di formiche e di un certo messaggio.

In questo modo, una specifica miscela induce un determinato comportamento solamente negli individui di una particolare specie e talvolta di una singola colonia; ciò permette una notevole comunicazione con una varietà di messaggi estremamente complessa.

I CHC subiscono quindi una serie di variazioni strutturali che possono essere, ad esempio, la saturazione/insaturazione, la presenza di ramificazioni e quindi di dimetil/trimetil/tetrametil-alceni, tra i quali vengono identificati come composti principali i dimetil-alceni ed i monometil-alceni [5], oppure la presenza di eteroatomi all'interno della catena carboniosa.

I processi biologici di sintesi di questi idrocarburi, nonostante tutte le possibili differenziazioni che consistono in piccole variazioni dello schema di reazione, seguono una stessa sequenza di passaggi principale.

La produzione di questi CHC inizia con la sintesi di un acil-CoA in cui l'acile ha una catena carbonilica di 16-20 atomi, derivante da un acido grasso; tale processo è una reazione multistadio che ha come reagente di partenza l'acetil-CoA ed è catalizzata da vari enzimi, tra cui l'acidograssosintasi. Successivamente, avviene l'allungamento della catena attraverso l'enzima acil-CoA elongasi, la formazione di doppi legami per mezzo dell'acil-CoA desaturasi ed infine la rimozione del CoA con formazione dell'aldeide grazie a delle riduttasi ed al citocromo P450 in accoppiamento con il NADPH [3]. Eventuali variazioni come la lunghezza della catena, le insaturazioni o le ramificazioni permettono l'estrema differenziazione di queste sostanze ed il loro utilizzo.

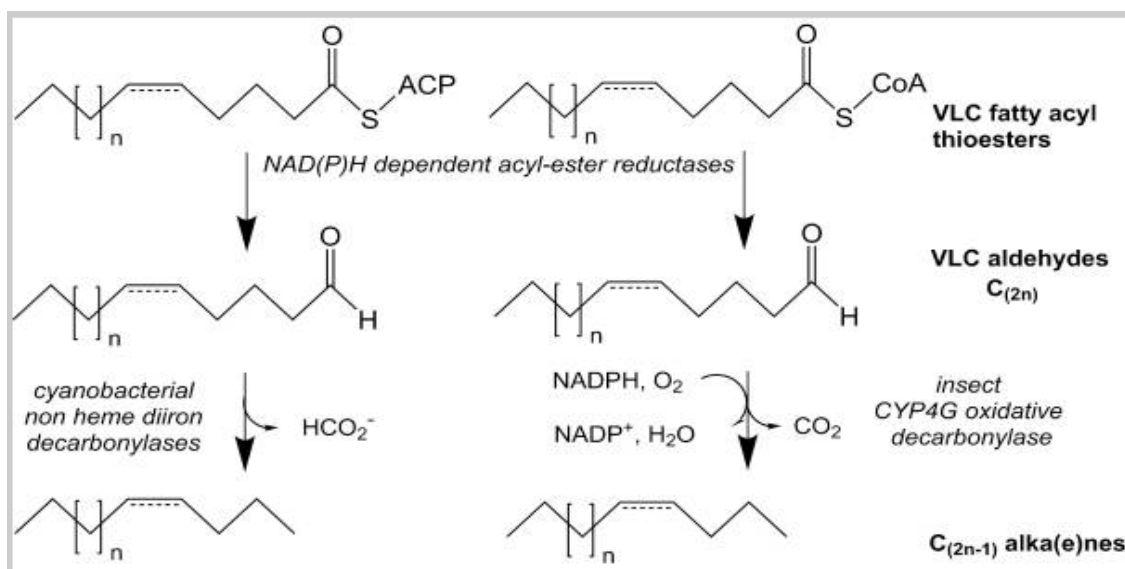


Figura 8: Schema generale di sintesi dei CHC [3].

Tra tutti gli enzimi coinvolti, di particolare importanza sono le elongasi e il citocromo P450; quest'ultimo, nello specifico, attua una decarbossilazione ossidativa nei confronti dell'aldeide liberando la catena carboniosa dal gruppo carbonilico e rilasciando CO<sub>2</sub> [6].

L'importanza di questi idrocarburi cuticolari viene evidenziata dal fatto che il gene codificante il citocromo P450 è presente in tutte le specie di insetti e non solo nelle formiche. La sua mancanza può causare delle problematiche piuttosto serie, soprattutto negli insetti eusociali, dal momento che impedisce la sintesi dei feromoni adibiti alla comunicazione e al riconoscimento tra i membri. Lo studio di Hoffmann [7] ha dimostrato come l'abbattimento dell'enzima P450 in alcune regine di termiti ha causato una variazione degli idrocarburi cuticolari tale da non

renderle più riconoscibili da parte delle operaie. Questo suggerisce che, nello studio di metodi selettivi di disinfestazione, una possibile soluzione risiede nel non prendere in considerazione unicamente i feromoni ma anche tutti i complessi proteici coinvolti nella biosintesi di tali sostanze.

## 5 RICEZIONE DEI FEROMONI

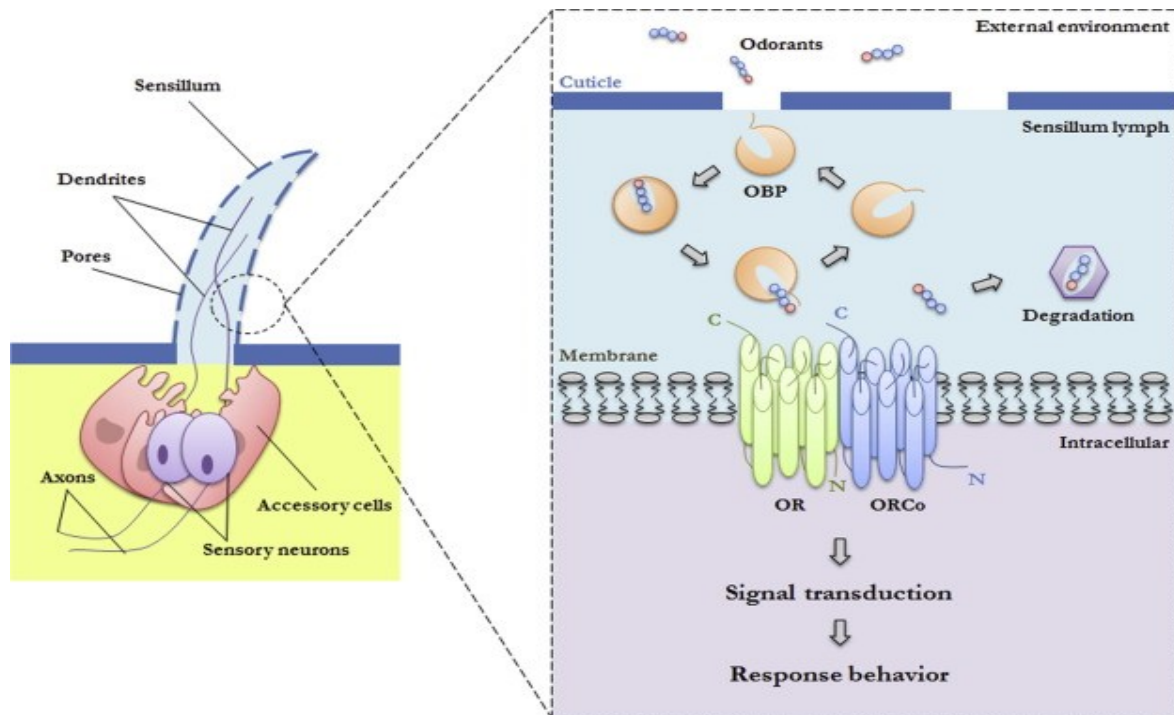


Figura 9: Ricezione dei feromoni e loro trasporto all'interno del corpo della formica da parte delle proteine OBP fino ad un chemiorecettore.

Nelle formiche i principali organi sensoriali, adibiti alla ricezione dei segnali chimici, sono le antenne; queste sono ricoperte da una serie di strutture simili ai peli dei mammiferi chiamate sensilli. Su di essi vi sono dei micropori che consentono, per capillarità, l'ingresso dei feromoni in un ambiente acquoso chiamato linfa del sensillio; successivamente, questi composti chimici vengono catturati da dei chemiorecettori che convertono il segnale in un impulso elettrico ed inducono la risposta da parte dell'individuo. Essendo tuttavia i feromoni di carattere prevalentemente idrocarburico, quindi con elevata idrofobicità, l'ingresso degli stessi nella linfa non avviene spontaneamente, ma richiede l'utilizzo di proteine di trasporto.

Alcune tra le principali proteine coinvolte nel trasporto dei feromoni fino ai chemiorecettori sono le OBP (odorant-binding proteins) e le CSP (chemosensory proteins) [8] che hanno la caratteristica di essere composte quasi esclusivamente da  $\alpha$ -eliche. Questa peculiarità comporta una particolare elasticità e rende tali proteine in grado di subire modifiche conformazionali per potersi legare in maniera efficiente ai rispettivi ligandi. In questo modo, esse possono legare diversi idrocarburi mantenendo comunque un'elevata specificità data dalle interazioni tra i residui amminoacidici delle eliche e le molecole di substrato.

Questi sistemi di ricezione risultano essere talmente efficienti che anche minime variazioni strutturali alle molecole causano una drastica diminuzione delle risposte da parte degli individui. La sintesi di tali sostanze risulta essere molto importante sia per verificare l'effettivo cambiamento comportamentale delle formiche sia per poter ricercare eventuali modifiche strutturali che accentuano determinati atteggiamenti e risposte. In uno studio mirato all'eliminazione selettiva di una determinata specie da un ambiente risulta particolarmente importante poter accentuare comportamenti aggressivi o ridurre drasticamente i segnali di riconoscimento.

Di conseguenza, è necessario individuare dei metodi di sintesi economicamente ed energeticamente convenienti per queste sostanze. Tuttavia, riprodurre i feromoni esattamente uguali a quelli che si trovano in natura presenta non poche difficoltà dal momento che queste strutture possono essere poco stabili e particolarmente volatili; inoltre, i meccanismi utilizzati per sintetizzarli sono spesso notevolmente complessi.

Un esempio è il 4-cloropirrolo-2-metilcarbossilato (figura 10), un composto di sintesi che è risultato avere le stesse funzionalità del 4-metilpirrolo-2-metilcarbossilato (figura 11). Si tratta di un feromone che le formiche *Atta texana* utilizzano per marcare i percorsi per gli altri membri della colonia. La sostituzione del gruppo metile con il cloro, avvenuta senza alterazioni della risposta comportamentale da parte degli insetti, evidenzia una funzionalizzazione non determinante ai fini delle interazioni con le proteine di trasporto. Questo implica la possibilità di effettuare dei rimpiazzamenti in quella posizione, a patto che consentano comunque la ricezione del composto, tramite l'inserimento di gruppi vari che ne alterino la funzione inducendo comportamenti diversi da quelli che stimolavano inizialmente o modificandone l'intensità.

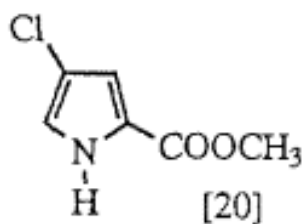


Figura 10: 4-cloropirrolo-2-carbossilato

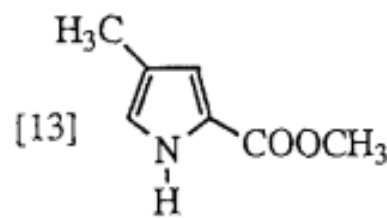


Figura 11: 4-metilpirrolo-2-carbossilato

## 5.1 GENETICA DI RICONOSCIMENTO

Tra le principali difficoltà relative all'eliminazione dell'individuo principale della colonia, vi è l'esistenza, come si diceva in precedenza, delle colonie poliginiche dove la privazione di una tra le varie regine presenti potrebbe infatti non rappresentare una perdita significativa, soprattutto per colonie di grandi dimensioni. In questo caso, essendo presente più di una regina, è necessario che il target identificativo di questa casta non discrimini colonie con una o più regine e agisca su tutte quelle presenti. Dato che nelle specie poliginiche non sempre è detto che più regine si siano incontrate subito, nel momento della fondazione, ma può capitare che alcune abbiano fondato da sole e poi se ne sono aggiunte altre, allora la sostanza chimica di interesse deve poter essere captata in tutti e due i casi. Questo fatto si accentua maggiormente dal momento che, all'interno di specie poliginiche, talvolta vi sono regine che accettano la presenza di altre loro simili mentre ve ne sono altre che fondano esclusivamente in solitudine e non tollerano la partecipazione di nessun'altra. Tale comportamento ha delle conseguenze a livello feromonico in quanto, nel secondo caso, i feromoni di un'altra regina provocano un comportamento aggressivo nei confronti della prima, mentre nel primo caso questo non avviene ed anzi collaborano tra loro. A tale scopo, è necessario analizzare ciò che sta alla base delle differenti capacità di ricezione di queste due tipologie di regine: il fattore discriminante, che sta alla base della percezione o meno di un determinato feromone, risiede nella diversa genetica. Le proteine in grado di legare i feromoni e trasportarli fino ai recettori vengono prodotte a partire da un particolare super gene, chiamato cromosoma sociale, che possiede due alleli: Sb e SB [9][10].

Una delle specie di formiche più studiate, in quanto ritenute tra le più infestanti, in particolare nel nord-America, sono le formiche di fuoco (*Solenopsis invicta*). Questi insetti hanno come particolarità il fatto di avere sia colonie monoginiche che poliginiche [11]. Le regine con uno dei due genotipi lo trasferiscono anche alle corrispettive operaie; le formiche con genotipo SB/SB risultano accettare solamente una regina SB/SB nella loro colonia mentre le operaie con genotipo SB/SB-SB/Sb accettano multiple regine SB/Sb e uccidono le regine che presentano genotipo SB/SB [12][13][14].

Uno studio condotto da Dang [11] ha evidenziato come, tra tutti i geni codificanti le OBP, la sequenza codificante la proteina SiOBP12b' sia di fatto quella discriminante tra le operaie SB/SB e quelle SB/SB-SB/Sb e che induce quindi i diversi comportamenti nei confronti delle regine. Nella figura 7, riportata di seguito, è presente un breve schema di quanto appena detto sulle combinazioni dei genotipi di regine e operaie e i loro effetti.

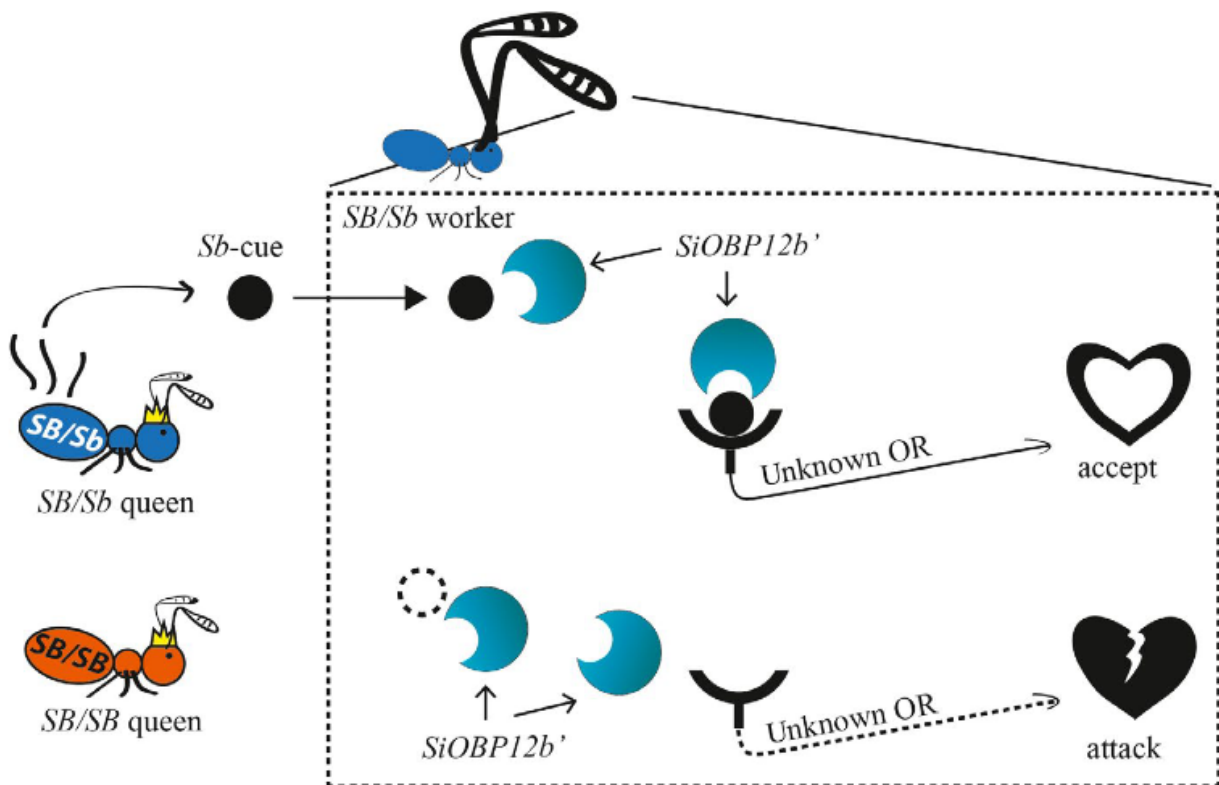


Figura 12: Riconoscimento delle regine aventi l'allele *Sb* grazie alla produzione dell'*Sb-cue* che può legarsi alla proteina di trasporto fino ad arrivare al recettore.

Le regine di tipo *SB/Sb* sono in grado di produrre un segnale chimico *Sb*-specifico (composto da biomolecole insature di natura idrocarburica) [12][14] in grado di essere captato dalle operaie con i medesimi alleli. Esse, infatti, sono in grado di produrre la proteina *SiOBP12b'* che, una volta captato il segnale, lo trasferirà ad un recettore (OR) riconoscendo la regina come tale [11]. Questo processo non avviene con un'operaia che possiede l'altro genotipo e ciò significa che il feromone prodotto dalla regina non verrà riconosciuto; il mancato riconoscimento del feromone induce comportamenti aggressivi nei confronti della regina in quanto quest'ultima viene riconosciuta come un individuo estraneo alla colonia.

## 5.2 IDORCARBURI CORRELATI AL SUPERGENE

Oltre alla sintesi dei complessi proteici di trasporto, il super gene svolge un altro ruolo relativo al riconoscimento delle regine all'interno delle colonie poliginiche: nello specifico, esiste una sua correlazione con gli idrocarburi cuticolari. La presenza o meno dell'allele *Sb* ha come risultato una diversa concentrazione dei vari CHC che vengono prodotti nell'esoscheletro delle



regine; difatti, le regine del tipo SB/SB sono caratterizzate da una concentrazione significativamente inferiore di questi idrocarburi.

Dal momento che la quantità di questi idrocarburi ha un ruolo cruciale nella comunicazione, l'identificazione e il dosaggio corretti degli stessi permetterebbero una discriminazione selettiva delle regine. Andando a ricercare sostanze prodotte da una sola tipologia di queste, sarebbe possibile inibire selettivamente la specie di interesse fornendo un'ulteriore selettività sul tipo di colonia. Nell'articolo *Characterization of queen supergene pheromone in the red imported fire ant using worker discrimination assays* [1] sono stati estratti e sintetizzati i principali idrocarburi cuticolari che permettono il riconoscimento regina (poliginica)-operaia di *Solenopsis invicta*; successivamente, sono stati eseguiti dei test per verificare l'effettiva importanza di questi idrocarburi e la frazione necessaria per garantirne l'efficacia.

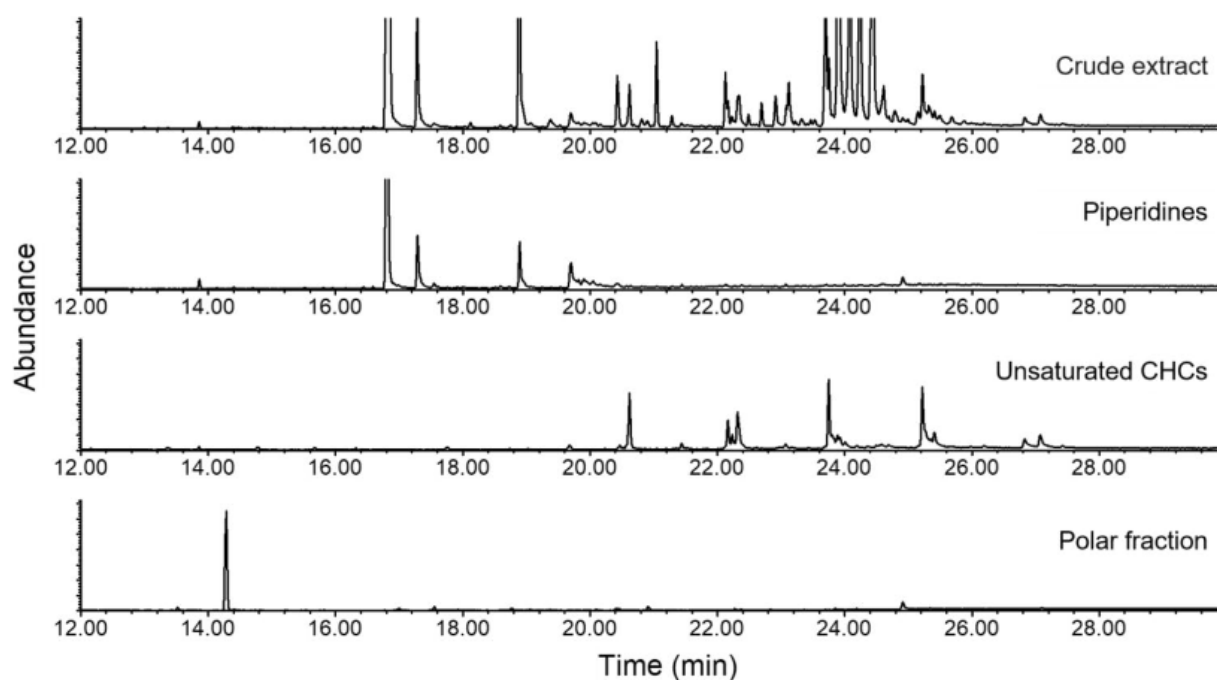


Figura 13: Gascromatografia relativa ad una soluzione di esano contenente tutte le sostanze estratte dal corpo di 3 formiche regine. Nella frazione polare, il picco è relativo ad impurità varie mentre i picchi presenti nel crude extract che non sono visibili negli altri spettri appartengono a composti saturi.

In figura 13, è possibile vedere i risultati dell'analisi cromatografica delle sostanze estratte da alcune formiche regine tramite l'immersione dei corpi di queste ultime in esano. In questo caso, la separazione tra componenti polari e non polari è avvenuta tramite cromatografia liquida su gel di silice con il 10% di nitrato d'argento. Un'ulteriore distinzione dei CHC secondo la loro insaturazione è stata fatta utilizzando delle colonne a scambio ionico caricate con ioni argento mentre i composti polari sono stati frazionati utilizzando piperidina.

Alcuni tra i principali idrocarburi estratti da regine poliginiche ed assenti però in quelle monoginiche sono riportati nella tabella 1.

Compound Name	Compound Abbreviation	Compound Type	Amounts in Blend	
			Blend of Five CHCS	Blend of Eleven CHCS
(Z)-5-tricosene	5Z-C23	Monoene		25.5 (5%)
(Z)-5-pentacosene	5Z-C25	Monoene		19.8 (4%)
(Z)-9-pentacosene	9Z-C25	Monoene		18.3 (3%)
(Z)-9-heptacosene	9Z-C27	Monoene	73.2 (17%)	73.2 (14%)
(Z)-7-nonacosene	7Z-C29	Monoene		9.9 (2%)
(Z)-9-nonacosene	9Z-C29	Monoene	141.0 (32%)	141.0 (26%)
(Z)-9-hentriacontene	9Z-C31	Monoene	33.0 (8%)	33.0 (6%)
(6Z,9Z)-6,9-pentacosadiene	6Z,9Z-C25	Diene		16.2 (3%)
(6Z,9Z)-6,9-heptacosadiene	6Z,9Z-C27	Diene		11.7 (2%)
(6Z,9Z)-6,9-nonacosadiene	6Z,9Z-C29	Diene	42.5 (10%)	42.6 (8%)
(6Z,9Z)-6,9-hentriacontadiene	6Z,9Z-C31	Diene	147.0 (34%)	147.0 (27%)

Tabella 1: Vengono rappresentati undici dei principali CHC presenti a livello cuticolare nelle regine poliginiche che sono stati sintetizzati.

L'alterazione nella quantità di tali idrocarburi farebbe scaturire degli atteggiamenti aggressivi nei confronti della regina dato che non sarebbe più in possesso del giusto genotipo. Essa sarebbe quindi eliminata in quanto non riconosciuta come membro della colonia.

## 6 AUTOINIBIZIONE

Un ruolo di particolare importanza dei feromoni prodotti dalle regine, che può essere preso in considerazione per un controllo mirato, è la capacità di inibire la produzione di uova da parte delle operaie. All'interno della struttura sociale di questi insetti tale ruolo appartiene solamente alla regina e, al fine di mantenere questa caratteristica, alcuni idrocarburi cuticolari vengono prodotti con lo scopo di svolgere ruoli inibitori sulle operaie. L'utilizzo di tali feromoni, con lo scopo di controllo numerico delle colonie, godrebbe di tutte le caratteristiche precedentemente citate rispetto ai veleni con risultati ottimali.

Tra le specie di formiche più comuni in Italia vi sono quelle del genere *Lasius*, si tratta di formiche di piccole/medie dimensioni dotate di un'ottima adattabilità e resistenza.

Secondo lo studio di de Narbonne M.M. [15] tra gli idrocarburi prodotti dalle regine di questa specie il 3-metil-entriacuntano (3-MeC31) svolge un ruolo primario nell'inibizione della produzione di uova da parte di formiche operaie.

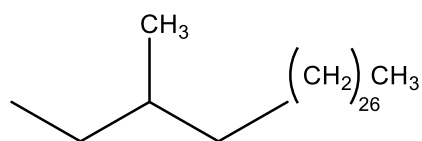


Figura 14: 3-metil-entriacuntano

Tale feromone viene prodotto in forma racemica e gli enantiomeri vengono captati da parte delle operaie distintamente. Si è scoperta una particolarità fondamentale di questa miscela, ossia che è in grado di ridurre l'aggressività tra le operaie all'interno della colonia; tuttavia, questo avviene se i due stereoisomeri vengono prodotti nelle giuste quantità. Oltre alle caratteristiche strutturali, ciò evidenzia ulteriormente la grande rilevanza che le concentrazioni dei feromoni hanno nel far sì che questi ultimi possano ricoprire il loro ruolo.

Da notare attentamente è il fatto che le stesse regine non sono immuni da tali sostanze per cui un loro trattamento con questo idrocarburo è in grado di far manifestare gli stessi effetti che scaturisce nelle operaie. Utilizzando quindi il 3-MeC31 è possibile inibire la produzione di uova della regina.

La figura 15 mostra la variazione della quantità di prole di una colonia di *Lasius niger* a seguito di un trattamento con diverse sostanze indicate nella legenda del grafico stesso. Tutte e tre le sostanze presenti nell'immagine sono prodotte a livello cuticolare dalla regina.

Tuttavia, i risultati evidenziano come, in particolar modo, il 3-MeC<sub>31</sub> svolga un considerevole ruolo nell'inibizione della produzione di uova rispetto agli altri due.

Questi risultati confermano che le regine possono essere inibite dagli stessi feromoni che producono; inoltre, una significativa diminuzione della prole implica una diminuzione progressiva di operaie e quindi della forza lavoro all'interno della colonia.

Questo fatto, a lungo termine, implica un indebolimento generale della colonia con conseguenze negative a livello di foraggiamento, di ampliamento del nido, di cure verso la regina e di difese rispetto a predatori e rispetto all'attacco portato avanti da altre colonie. Oltretutto, l'utilizzo di questi feromoni risulta essere selettivo per la specie di interesse se si impiegano i feromoni prodotti da essa. Quindi, è estremamente efficace e privo di impatti ambientali significativi.

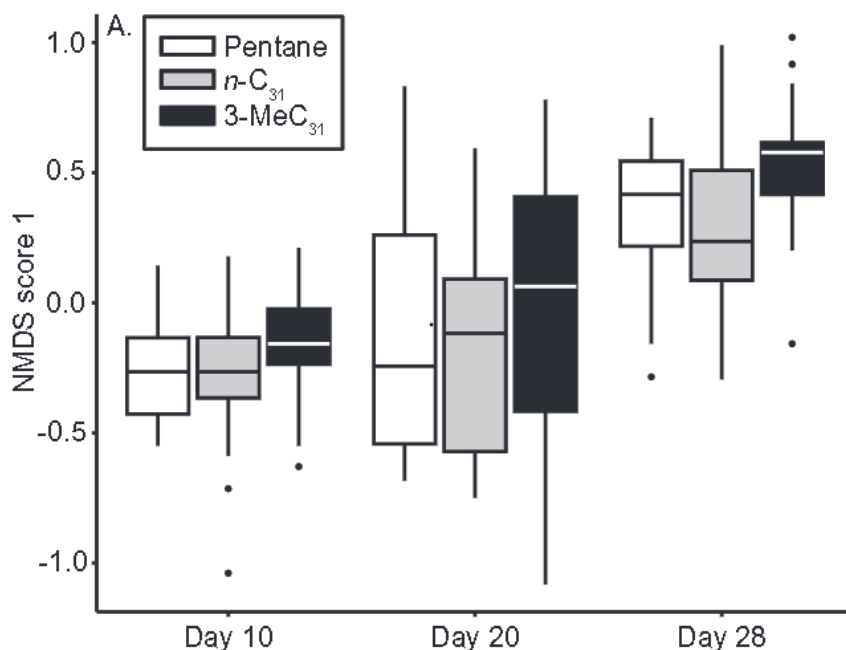


Figura 15: Variazione della quantità di prole in una colonia di *Lasius niger*. Sull'asse delle ascisse è presente il numero di giorni mentre sull'asse delle ordinate è presente un fattore NMDS. Tale fattore è composto da una parte positiva che corrisponde al numero di uova e bozzoli ed una parte negativa che corrisponde al numero di larve.

## 6.1 SINTESI DEL 3-MEC31

Il 3-MeC<sub>31</sub>, come gli altri idrocarburi, presenta una lunga catena di atomi di carbonio con una sola ramificazione dove è presente un gruppo metile. Per questa sostanza, è stata proposta una possibile via sintetica che prevede come reagente di partenza il 2-metilbutan-1-olo; questo alcool viene fatto reagire con l'enzima lipasi del battere *Pseudomonas fluorescens*, con aggiunta di vinil-acetato in diclorometano.

Tale reazione consente di esterificare in maniera enantioselettiva l'isomero S mentre quello R rimarrà presente come alcool; a questo punto, le due sostanze possono essere separate con una colonna cromatografica e la purezza può essere verificata tramite metodi cromatografici. Il composto R così separato può quindi essere trattato con anidride triflica, Tf<sub>2</sub>O, e piridina formando il 2-metilbutan-1-iltriflato. Quest'ultimo viene poi fatto reagire in soluzione con 11-(terz-butildimetilsilossi)undecilmagnesiobromuro, con l'aiuto del catalizzatore Li<sub>2</sub>CuCl<sub>4</sub>, per formare il composto n° 3 in figura 16.

Successivamente, il gruppo alcolico viene protetto con il TBS ed il composto viene fatto reagire con Ph<sub>3</sub>PBr<sub>2</sub> per ottenere il corrispondente bromuro. Viene poi eseguita un'alchilazione con esadecinil-litio in THF a refluxo; tale reazione porta alla formazione del composto n° 5 che, tramite idrogenazione catalizzata da rodio su carbone, Rh/C, porta alla formazione del prodotto voluto.

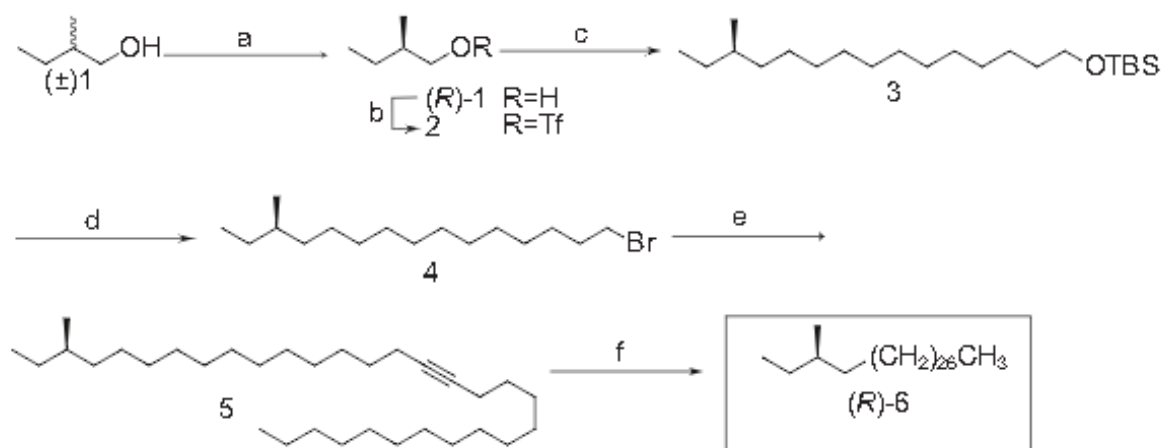


Figura 16: Passaggi della sintesi di 3-MeC31. Le varie lettere indicano dei reagenti, dei catalizzatori o degli enzimi: (a) Lipasi batterica, vinilacetato e diclorometano; (b) Tf<sub>2</sub>O, piridina e diclorometano; (c) 11- (terz-butildimetilsilossi)undecilmagnesiobromuro , Li<sub>2</sub>CuCl<sub>4</sub> e dietilere; (d) Ph<sub>3</sub>PBr<sub>2</sub> e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (95%); (e) esadecinil-litio e THF a refluxo (85%); (f) Rh/C, H<sub>2</sub> ed esano.

## 7 CONCLUSIONI

L'analisi dei vari aspetti relativi ai metodi di produzione, di ricezione, di sintesi ed agli effetti dei feromoni sui vari individui offre diversi spunti sui possibili metodi di inibizione. Il ruolo fondamentale che la regina svolge all'interno delle colonie di formiche la rende il bersaglio principale da attaccare e, di conseguenza, l'inibizione dei feromoni ad essa correlati risulterebbe particolarmente efficace. Poiché i feromoni sono prevalentemente a carattere idrocarburico e presenti a livello cuticolare, l'inibizione può procedere sia esternamente, mascherando o variando la concentrazione di questi segnali chimici, che internamente, andando ad agire sulle sostanze o sulle proteine necessarie alla loro sintesi.

Secondo l'articolo di Yan H. [3], la concentrazione delle varie sostanze contenute nelle miscele feromoniche svolge un ruolo decisivo per la chiarezza delle informazioni; di conseguenza, la variazione delle loro concentrazioni attuabile tramite la somministrazione, all'interno del formicaio, di alcune sostanze specifiche già presenti nella miscela di partenza causerebbe non solo una scarsa risposta da parte delle operaie, compromettendo in questo modo alcune tra le loro mansioni principali, ma provocherebbe dei fraintendimenti sulla codifica delle informazioni ricevute, creando confusione ed atteggiamenti aggressivi all'interno della colonia.

Lo studio di Hoffman [7] potrebbe essere applicato anche alle formiche andando ad agire direttamente sul citocromo P450: la sua inibizione comporterebbe l'ulteriore inibizione di alcuni importanti feromoni dato che, nella loro sintesi, il citocromo svolge un ruolo fondamentale. Gli studi sulle termiti hanno evidenziato atteggiamenti aggressivi una volta creato questo scompenso ed i due eventi sono necessariamente correlati. Di conseguenza, è plausibile supporre che la risposta comportamentale derivante da una mancata o parziale comunicazione sia istintivamente aggressiva; probabilmente questo fatto avviene per istinto di sopravvivenza in risposta ad un segnale non chiaro che potrebbe essere una minaccia.

Essendo i sistemi di comunicazione simili tra le termiti e le formiche, sarebbe possibile attuare questa forma di inibizione ai fini dell'eradicazione di una colonia; tuttavia, il fatto che questo metodo agisca non attraverso i feromoni ma tramite un enzima responsabile della loro sintesi, unito al fatto che questo enzima è presente in più specie di formiche, lo rende poco selettivo nel distinguerle l'una dall'altra.

Lo studio di Reinhard J. [8], evidenziando la struttura delle proteine che agiscono sul trasporto delle sostanze chimiche contenute nei feromoni, dimostra come sia di fatto possibile apportare lievi modifiche a livello dei gruppi funzionali per sintetizzare in laboratorio sostanze simili ai feromoni in modi molto più semplici e veloci. Tali sostanze potrebbero essere utilizzate allo stesso modo dei feromoni riportati nello studio di Hoffman [7]; in questo modo, si avrebbe il medesimo risultato, ma utilizzando sostanze sintetiche con una purezza maggiore, semplici da produrre rispetto ai feromoni e con modifiche strutturali in grado di accentuarne gli effetti. Allo stesso modo, la sintesi in laboratorio permetterebbe la produzione di sostanze in grado di autoinibire la produzione di uova da parte delle regine, come descritto nell'articolo di de Narbonne M. M. [15].

Tali sostanze potrebbero quindi essere utilizzate insieme a quelle prodotte per indurre atteggiamenti aggressivi. Facendo così, la rimozione di questi insetti avverrebbe più velocemente in quanto oltre all'aggressività indotta all'interno della colonia si avrebbe anche una considerevole diminuzione della prole.

Attualmente in commercio non sono presenti sostanze con lo scopo di eliminare, in maniera mirata, le varie specie di formiche attraverso i principi precedentemente citati; al fine di poterle produrre sono infatti necessari studi specifici sui feromoni di tutte le varie specie. Tuttavia, un punto di partenza significativamente importante sarebbe lo studio di queste sostanze a carico delle specie infestanti come ad esempio le formiche argentine (*Linepithema humile*). Questi insetti, alloctoni, non solo provocano ingenti danni all'ecosistema entrando in competizione con le specie locali, ma risultano particolarmente aggressive e tenaci. Degli studi, quindi, in primo luogo mirati ad eliminare le minacce principali ed in secondo luogo mirati all'eliminazione di ogni singola specie in modo specifico, permetterebbero lo sviluppo di sistemi di disinfestazione sempre più efficaci e a minor impatto ambientale.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- [1] Zeng, H.; Millar, J. G.; Chen, L.; Keller, L.; Ross, K. G. *J. Chem. Ecol.* **2022**, 48(2), 109–120
- [2] Karlson, P.; Lüscher, M. *Nature* **1959**, 183(4653), 55-56
- [3] Yan, H.; Liebig, J. *Genes Dev.* **2021**, 35(7-8), 470-482
- [4] Lahav, S.; Soroker, V.; Hefetz, A.; vander Meer, R. K. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1998**, 43(3), 203–212
- [5] Holman, L.; Leroy, C.; Jørgensen, C.; Nielsen, J.; D’Ettorre, P. *Behavioral Ecology* **2013**, 24(2), 380–385
- [6] Qiu, Y.; Tittiger, C.; Wicker-Thomas, C.; Le Goff, G.; Young, S.; Wajnberg, E.; Fricaux, T.; Taquet, N.; Blomquist, G. J.; Feyereisen, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109(37), 14858–14863
- [7] Hoffmann, K.; Gowin, J.; Hartfelder, K.; Korb, J. *Mol. Biol. Evol.* **2014**, 31(10), 2689–2696
- [8] Reinhard, J. *Chemosense* **2004**, 6(4), 2–6
- [9] Keller, L.; Ross, K. G. *Nature* **1998**, 394(6693), 573–575
- [10] Wang, J.; Wurm, Y.; Nipitwattanaphon, M.; Riba-Grognuz, O.; Huang, Y.-C.; Shoemaker, D.; Keller, L. *Nature* **2013**, 493(7434), 664–668
- [11] Dang, V-D; Cohanin, A. B.; Fontana, S.; Privman, E.; Wang, J. *Ecology and Evolution* **2019**, 9, 12754-12766
- [12] Eliyahu, D.; Ross, K. G.; Haight, K. L.; Keller, L.; Liebig, J. *J. Chem. Ecol.* **2011**, 37(11), 1242–1254
- [13] Gotzek, D.; Ross, K. G. *J. Insect Behav.* **2008**, 21(5), 337–350
- [14] Tribble, W.; Ross, K. G. *J. Evol. Biol.* **2016**, 29(3), 502–513
- [15] de Narbonne, M. M.; van Zweden, J. S.; Bello, J. E.; Wenseleers, T.; Millar, J. G.; D’Ettorre, P. *J. Exp. Biol.* **2016**, 219(11), 1632–1638