

# EMISSIONE di **Composti Organici Volatili (VOC)**

## DALLE PIANTE:

### ASPETTI ECOFISIOLOGICI, METODOLOGICI ED APPLICATIVI.

**Francesca Rapparini**

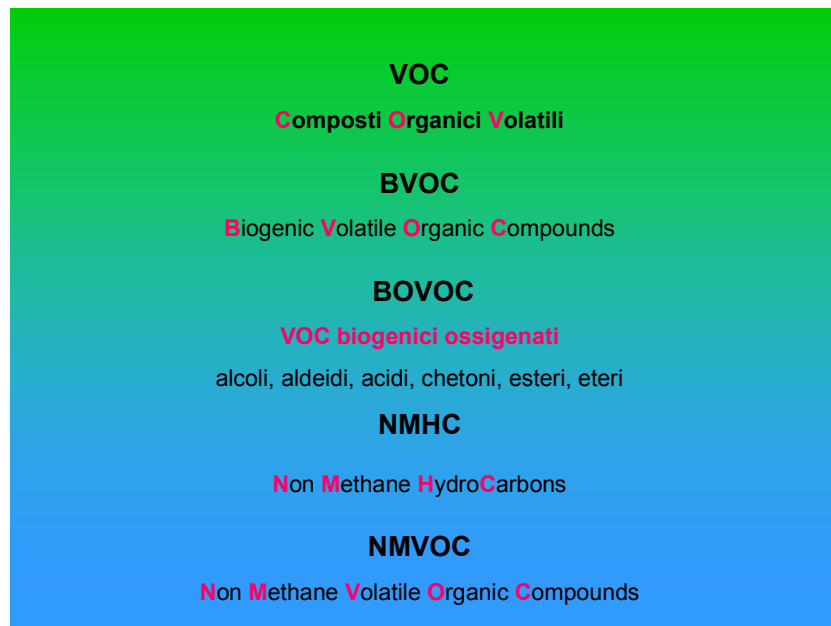
**Istituto di Biometeorologia, CNR, Via Gobetti 101, 40129 Bologna.**

Passeggiando nella natura, in una pineta o in un roseto, ci troviamo immersi in un'esperienza sensoriale piacevole ma complessa: notiamo i colori ed ascoltiamo i suoni, ma percepiamo anche i profumi degli alberi e delle erbe, ognuno diverso ed inconfondibile.

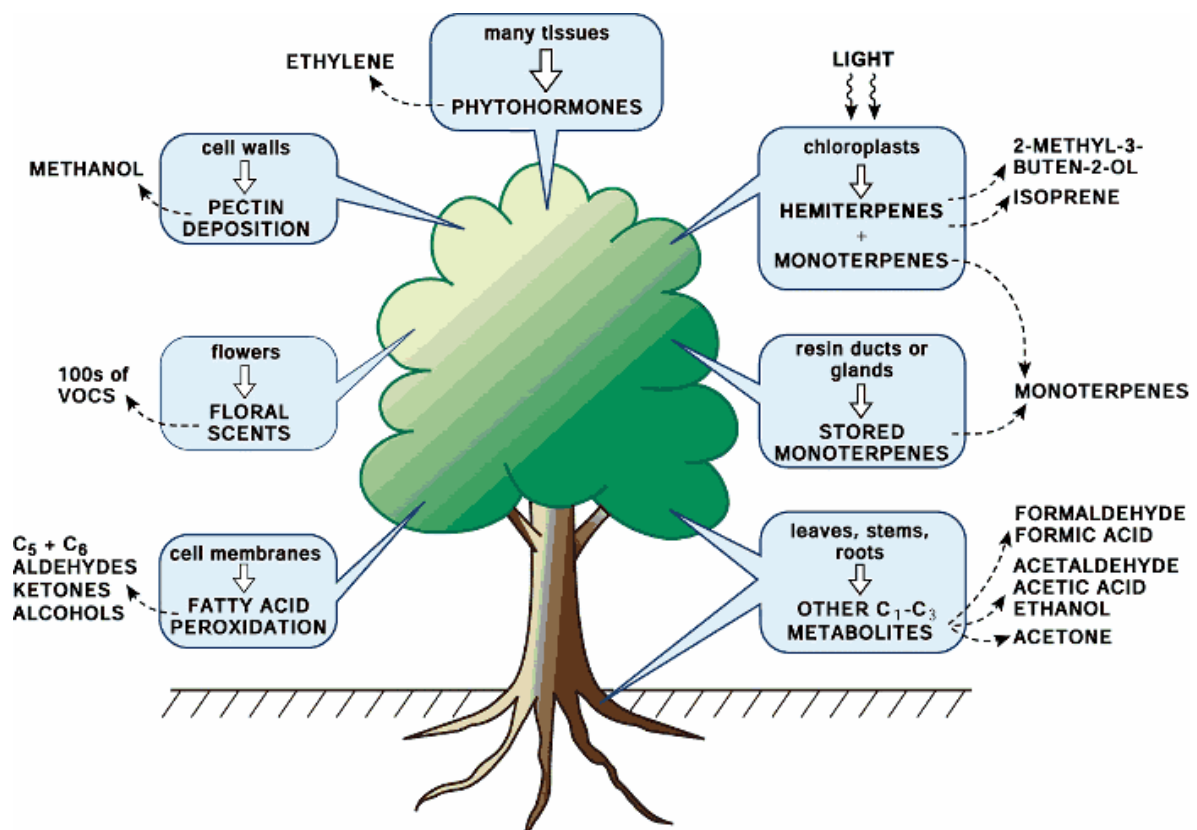
- ❖ Queste fragranze od aromi delle piante sono dovuti a **composti volatili a base di idrogeno, ossigeno e carbonio (quindi organici) (VOC-Volatile Organic Compound)** che le piante producono e rilasciano nell'atmosfera proprio come veri messaggi odorosi. Gli **oli essenziali** od essenze sono costituiti da queste sostanze che rapidamente si volatilizzano.

## **CHI SONO I VOC?**

- ❖ **Sono sostanze volatili**
- ❖ **Sono dotati di aroma** caratteristico e penetrante per ogni pianta.
- ❖ **Generalmente comprendono un ampio spettro di sostanze** molto eterogenee appartenenti a quattro gruppi principali: **composti alifatici e aromatici, terpeni e fenoli**. Ad esempio il profumo di un singolo fiore può consistere in una miscela di 150 diversi composti volatili. Un'elevata varietà di acronimi è infatti stata utilizzata per definire speciali classi di VOC:



❖ **I terpeni od isoprenoidi o terpenoidi** sono i VOC biogenici emessi dalle piante in maggiore quantità nell'atmosfera. Nell'ambito della classe dei terpeni, l'**isoprene**, i **monoterpeni** ed i **sesquiterpeni** sono sufficientemente volatili da essere emessi e quindi rappresentano il gruppo più consistente.



Questa figura (Fonte: <http://www.colorado.edu/Chemistry/grad/faculty/Fall/lab/>) illustra quello che viene definito **"l'albero dei VOC"** in cui sono evidenziate le potenzialità della pianta di produrre e rilasciare un'ampia varietà di VOC (Fall 1999).

## CHI EMETTE I VOC?

Premesso che l'isoprene ed i monoterpeni sono i composti volatili maggiormente studiati, tutt'oggi si stima che più di 200 piante, principalmente arboree, siano emettitrici di isoprene (Sanadze 1991), mentre l'emissione di piante coltivate sia relativamente bassa od insignificante (Winer et al. 1992).

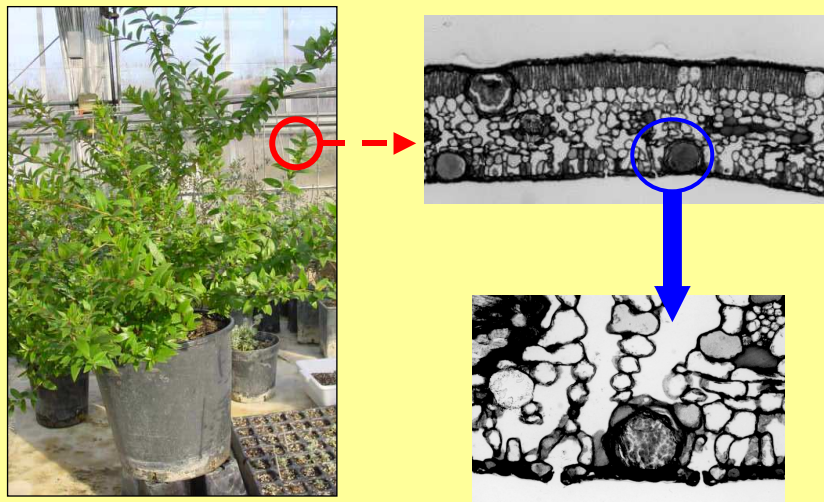
I monoterpeni ed i sesquiterpeni sono ubiquitari nelle piante superiori, ma sono particolarmente accumulati solo in 50 famiglie: Labiatae (rosmarino, lavanda, menta), Rutaceae (agrumi), Apiaceae (prezzemolo, anice), Compositae (camomilla), Rosaceae.

## DOVE SI TROVANO I VOC NELLA PIANTA?

I composti volatili aromatici vengono prodotti e si accumulano in tutti gli organi della pianta (steli, foglie, gemme, fiori, semi, frutti, legno e radici), sebbene siano maggiormente sintetizzati negli organi aerei.

I composti volatili (monoterpeni e sesquiterpeni) sono spesso accumulati negli spazi intercellulari o in strutture specializzate interne od esterne (es. dotti resiniferi, peli ghiandolari esterni, ghiandole lisigene, etc...).

Sezione trasversale della lamina fogliare di *Myrtus communis* al microscopio elettronico (Rotondi et al., 2003, in stampa)



## CHI SONO I TERPENI?

La struttura chimica dei terpeni, presenti in tutte le parti della pianta, è basata su uno **scheletro a 5 atomi di carbonio** (isoprene) (Mc Garvey & Croteau, 1995) e sono classificati in base al numero di tali unità presenti nella struttura principale della molecola:

McGarvey & Croteau 1995

**ISOPRENE**

$$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$$

$$\text{c}-\overset{\text{f}}{\text{c}}-\text{c}-\text{c}$$

$$\text{c}-\overset{\text{f}}{\text{c}}-\text{c}-\text{c}$$

|              |      |                 |                                    |
|--------------|------|-----------------|------------------------------------|
| Emiterpeni   | n=1  | C <sub>5</sub>  | (isoprene)                         |
| Monoterpeni  | n= 2 | C <sub>10</sub> | (limonene)                         |
| Sequiterpeni | n=3  | C <sub>15</sub> | (β-cariofillene, acido abscissico) |
| Diterpeni    | n=4  | C <sub>20</sub> | (gibberelline, fitolo, tocoferoli) |
| Sesteterpeni | n=5  | C <sub>25</sub> |                                    |
| Triterpeni   | n=6  | C <sub>30</sub> |                                    |
| Tetraterpeni | n=8  | C <sub>40</sub> | (plastochinone, ubichinone)        |
| Politerpeni  | n> 8 |                 |                                    |

## COME SI FORMANO I TERPENI?

Tutti gli isoprenoidi sono sintetizzati a partire dalla condensazione di due precursori a 5 atomi di carbonio: l' **isopentenil pirofosfato (IPP)** e il suo isomero **dimetilallil pirofosfato (DMAPP)**. Dal DMAPP per azione dell'enzima "isoprene sintasi", viene sintetizzato l'isoprene; la condensazione "testa-coda" di queste due unità isopreniche, il DMAPP e l'IPP, porta alla formazione di un precursore a dieci atomi di carbonio, il **geranyl pirofosfato (GPP)** dal quale prendono origine tutti i terpeni.

### Ma come si forma il precursore IPP?

Lo scheletro base rappresentato dall'IPP viene originato da **due distinte vie** a diversa localizzazione cellulare.

Nel compartimento citosolico, i sesquiterpeni, steroli, ubiquinone e politerpeni originano da un'unica via biosintetica che prende il nome dall'acido a sei atomi di carbonio che funge da intermedio metabolico, l'acido mevalonico (via **mevalonato-dipendente**).

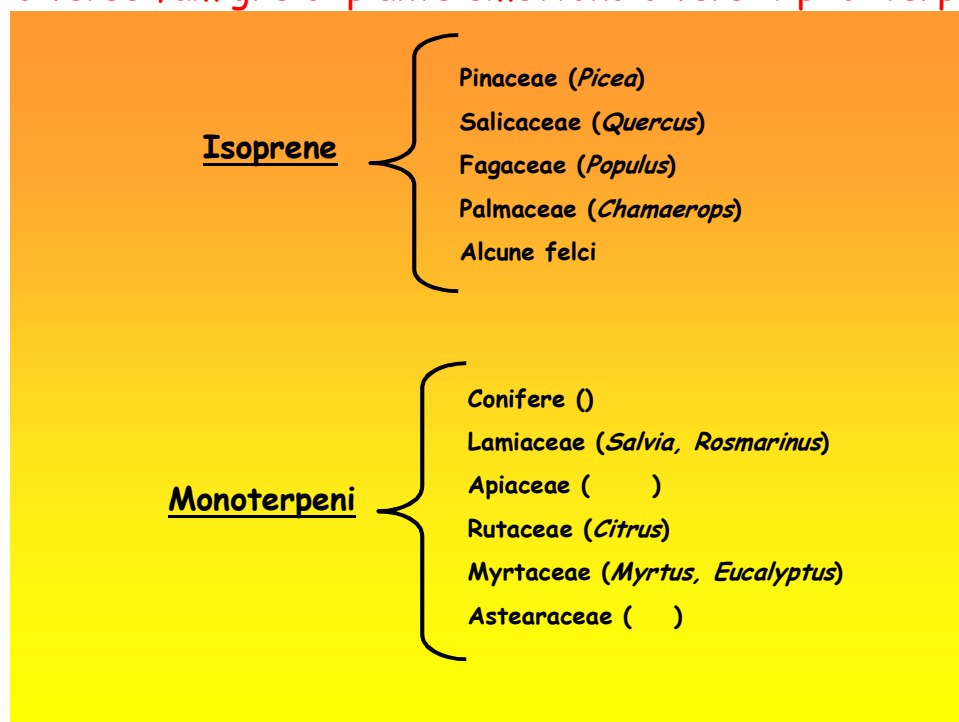
Nei compartimenti plastidici avviene la formazione di isoprene, monoterpeni, fitolo, e carotenoidi attraverso la **via indipendente dall'acido mevalonico**, anche denominata dall'intermedio **deossi-D-xilulosio-5-fosfato** (Lichtenthaler et al. 1997; Zeidler et al. 1997; Eisenreich et al. 2001).

## FATTORI CHE INFLUENZANO L'EMISSIONE DEI VOC

La produzione e l'emissione dei terpeni, in quanto processi che riflettono l'espressione degli enzimi preposti alla loro biosintesi, possono variare in funzione della **specie**, della **varietà**, dell'**organo** considerato, dello **stadio fisiologico** dell'organo stesso e dalle **condizioni ambientali**.

### Fattori genetici:

Le diverse famiglie di piante emettono diversi tipi di terpeni



La produzione di terpeni è anche fortemente dipendente dalla **SPECIE**.

Il profilo di emissione dei terpeni è specifico delle singole specie di piante

**Monoterpene emessi in giugno (G) ed ottobre (O)  
(Capo Caccia, Alghero, SS)**

|                | <i>Pistacia<br/>lentiscus</i> | <i>Juniperus<br/>phoenicea</i> | <i>Phillyrea<br/>angustifolia</i> | <i>Chamaerops<br/>humilis</i> |
|----------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| isoprene       |                               |                                |                                   | G O                           |
| α-pinene       | G O                           | G O                            | G O                               |                               |
| camphene       | G O                           | G O                            | G O                               |                               |
| sabinene       | G                             | G O                            |                                   |                               |
| β-pinene       | G O                           | G O                            | O                                 |                               |
| β-myrcene      | G                             | G O                            |                                   |                               |
| α-phellandrene | G O                           | G O                            |                                   |                               |
| 3-carene       | G O                           | G O                            | G                                 |                               |
| α-terpinene    | G O                           | G O                            |                                   |                               |
| p-cymene       | G O                           | G O                            | G O                               |                               |
| 1-8 cineole    |                               | O                              |                                   |                               |
| β-phellandrene | G                             | G O                            |                                   |                               |
| limonene       | G O                           | G O                            | G                                 |                               |

e può essere usato a fini **chemio-tassonomici** come supporto nella classificazione delle specie vegetali e discriminare i diversi ecotipi di una stessa specie

### Fattori ambientali:

l'emissione dei terpeni dipende fortemente dai fattori ambientali quali **intensità luminosa** e **temperatura**

La modalità di risposta a tali fattori cambia SE:

Se i VOC sono **emessi direttamente** dopo la loro sintesi, l'emissione di tali composti è **principalmente legata alla fotosintesi**, e di conseguenza alla **luce e temperatura**.

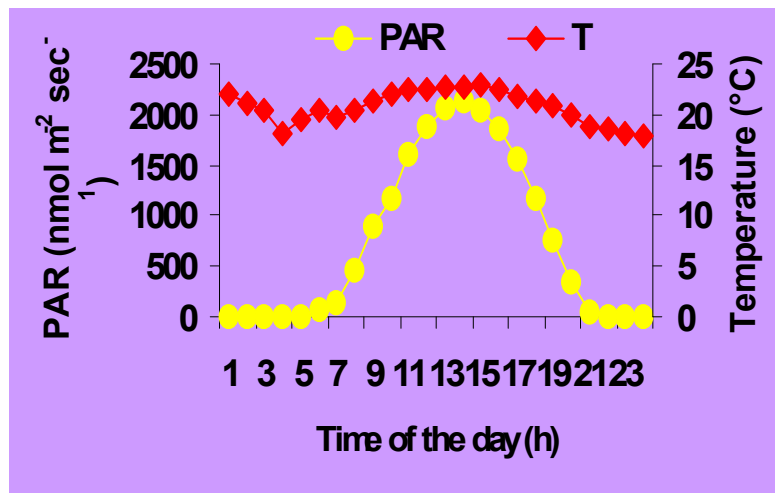
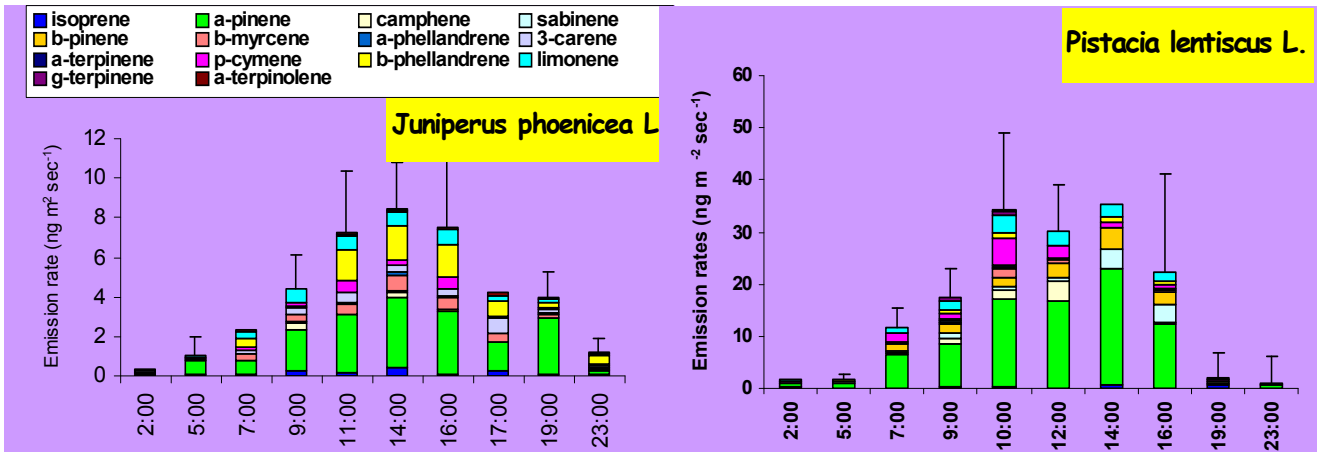
Se i VOC sono **emessi ed ACCUMULATI** in organi di riserva l'emissione è considerata un semplice processo di volatilizzazione dal pool di riserva: è **quindi fortemente dipendente dalla temperatura** che regola la pressione di vapore dei composti e quindi il loro passaggio dalla fase liquida a quella gassosa.

Il modello sviluppato da *Guenther et al.*, 1993 descrive l'emissione istantanea (E) come il prodotto della emissione basale (E<sub>s</sub>) e di due fattori di correzione che tengono conto della dipendenza dell'emissione dalla temperatura (C<sub>T</sub>) e dalla luce (C<sub>L</sub>)

$$E = E_s * C_T * C_L$$

## Andamento giornaliero

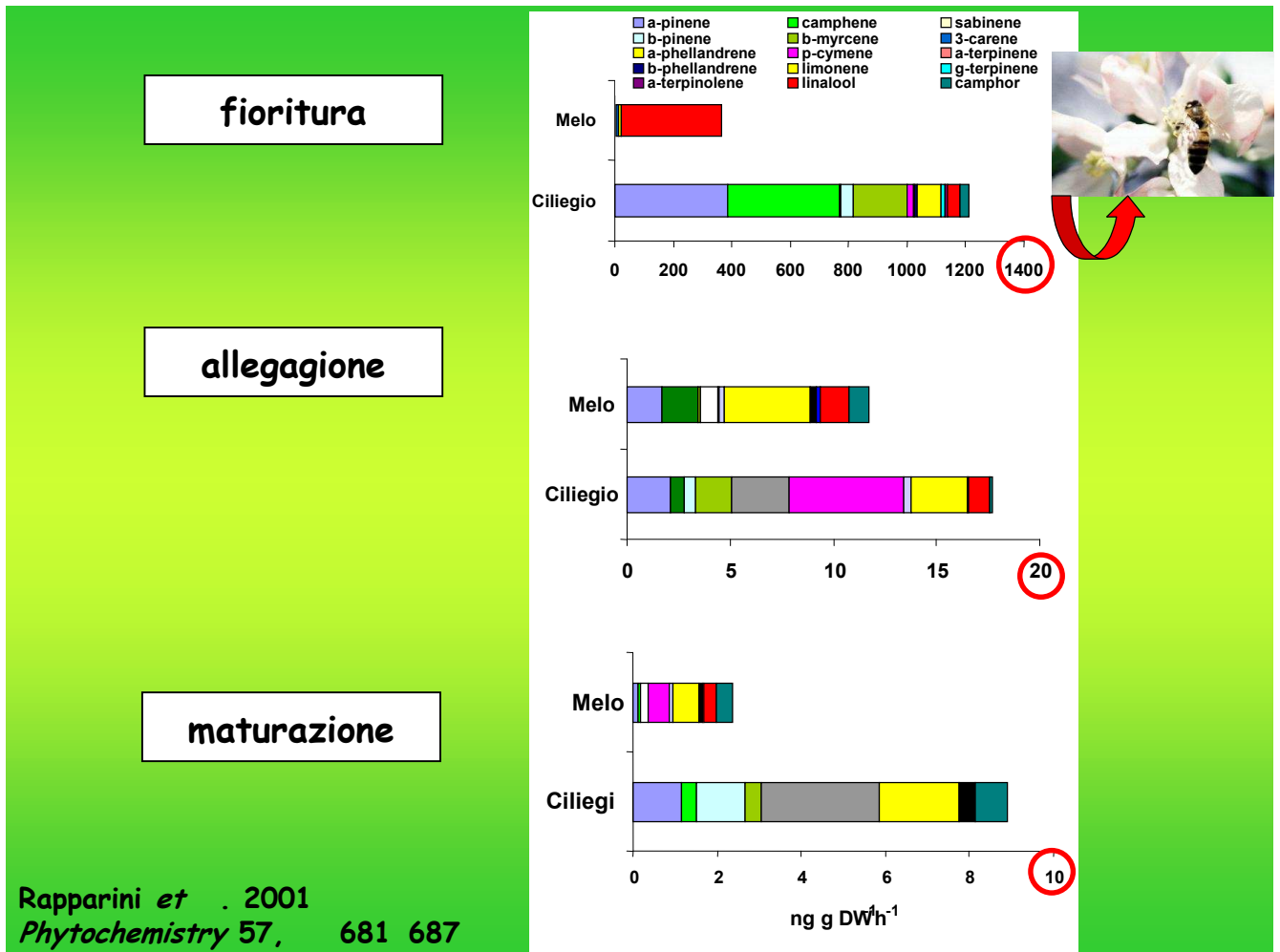
L'effetto della luce e della temperatura sull'emissione dei terpeni riflette anche l'andamento giornaliero di tali emissioni con **massimi di emissione nelle ore centrali**



della giornata quando le temperature e le intensità luminose sono maggiori.

## Andamento stagionale

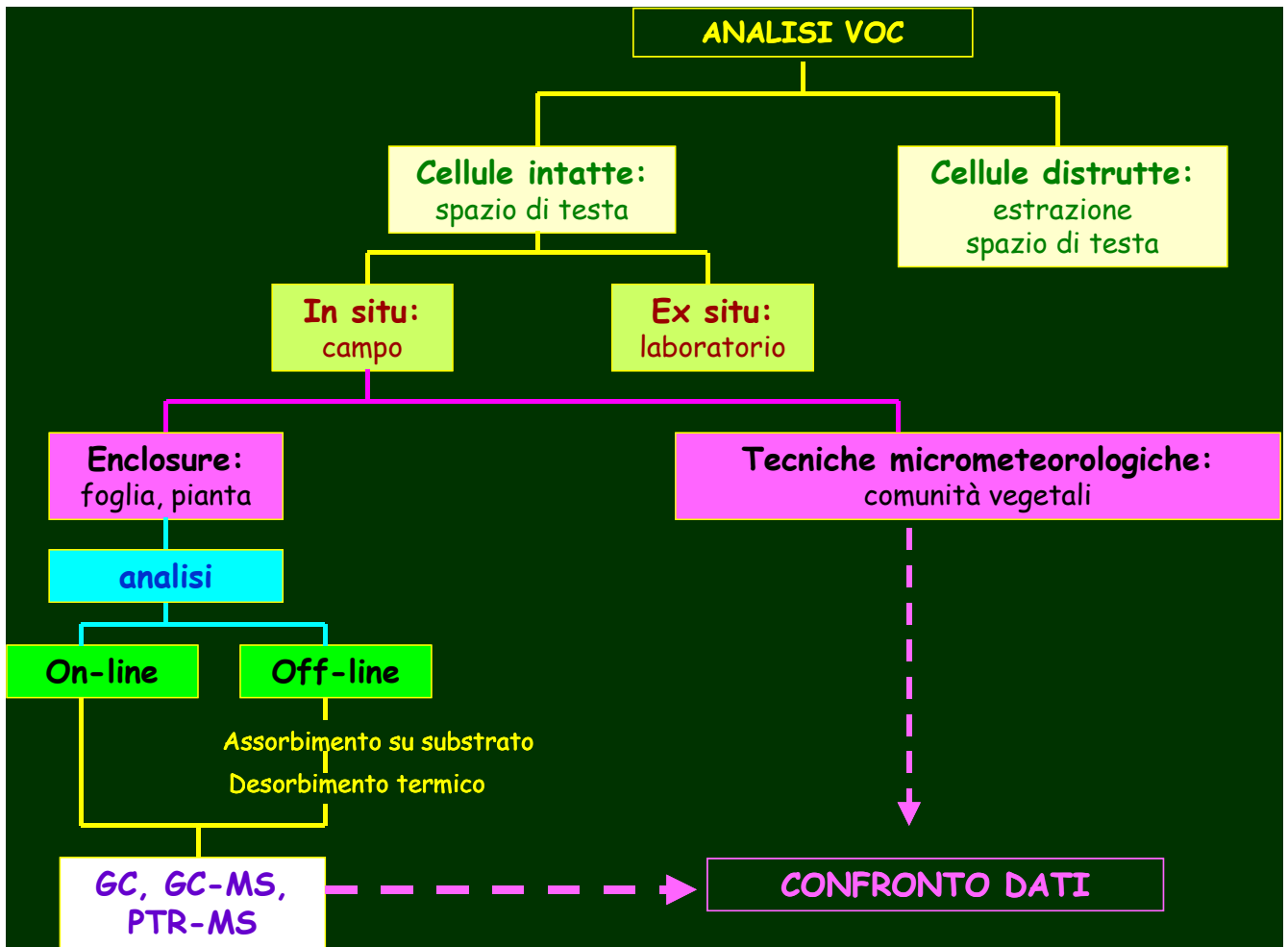
L'emissione varia anche durante la stagione vegetativa come risultato non solo delle **variazioni ambientali** (maggiori emissioni nei mesi più caldi e soleggiati; Ohta 1986) ma anche delle **variazioni fisiologiche** (foglie mature emettono, mentre foglie giovani non emettono o in misura molto minore). Diversi profili e tassi di emissioni si sono rilevati anche nelle **diverse fasi fenologiche**: è stata rilevata una maggiore emissione di terpeni in fase di e minori tassi di emissione in fase di allegagione e maturazione di piante di melo e ciliegio. Tale maggiore emissione in fase di fioritura può essere legata alla modalità di impollinazione (di tipo entomofilo) di tali piante, ovvero la pianta rilascia tali composti volatili per attrarre gli insetti impollinatori specifici di quella specie.



Altri fattori abiotici possono influenzare l'emissione di terpeni: **stress idrico e salino, umidità dell'aria, concentrazione elevata di anidride carbonica** nell'atmosfera.

### ASPETTI METODOLOGICI: Come catturare gli odori delle piante?

Nella messa a punto di metodologie di studio ed analisi dei volatili emessi dalle piante occorre considerare che i VOC sono presenti ed emessi a concentrazioni basse (da pochi ppt a diversi ppb), molti, in particolare i terpeni, sono altamente reattivi, appartengono a diverse classi chimiche di composti, e sono influenzati da diversi fattori quali luce e temperatura.



I composti volatili sono stati per lungo tempo campionati ed analizzati mediante omogeneizzazione e frantumazione del materiale vegetale fresco o secco da analizzare a cui seguiva l'estrazione dei composti volatili con solventi organici idonei e/o la distillazione in corrente di vapore. Tali tecniche quindi poiché determinano una rottura della struttura cellulare determinano i composti volatili che sono contenuti nelle piante.

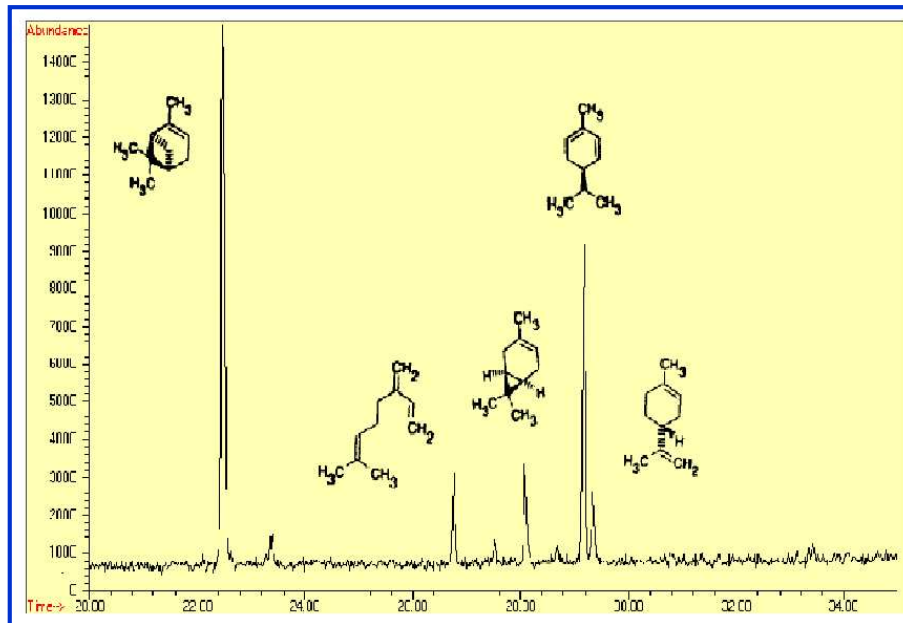
La tecnica di analisi "headspace" ovvero dello "spazio di testa" consente di analizzare le sostanze volatili realmente emesse dalle piante in quanto analizza le sostanze volatili presenti nello spazio di testa delle piante ovvero nell'aria circostante un campione di materiale vegetale (singola pianta, ramo, foglia, frutto, fiore) e quindi le sostanze emesse dalle piante. Lo spazio di testa può essere analizzato mediante la tecnica della "ENCLOSURE" così denominata perché la singola pianta od organo vegetativo vengono racchiusi in una cuvetta specifica con la possibilità a volte di impostare determinate condizioni di temperatura, di luce e di concentrazione dei gas nell'aria in entrata nella cuvetta.



L'analisi dei VOC può essere condotta in continuo (**on-line**) fornendo un' immediatamente i risultati del profilo e dei tassi di emissione, oppure in laboratorio (**off-line**) previo campionamento dei composti volatili su substrato assorbente. L'analisi chimica in entrambi i casi è generalmente condotta mediante **gas-cromatografia (GC)**, associata o no alla **spettrometria di massa (MS)**.



che consente di identificare e quantificare i composti emessi dalle piante



La stima delle emissioni (flussi) di VOC dalla vegetazione su ampia scala (quella di comunità vegetali ed ecosistema) può essere confrontata con la stima delle emissioni condotte a livello di singola pianta effettuando un **passaggio di scala** mediante la conoscenza della distribuzione e della biomassa della vegetazione considerata.

In alternativa, a livello di ecosistema le **tecniche MICRO-METEOROLOGICHE** forniscono una misura integrata delle emissioni sia su scala spaziale di alcune centinaia di metri sia su scala temporale (in genere annuale).

### ASPETTI ECOLOGICI:

#### perché la pianta sintetizza ed emette i VOC?

Sebbene alcuni VOC siano semplicemente il prodotto finale di un normale metabolismo o prodotti di scarto, altri possono svolgere ruoli fisiologici specifici. La sintesi e l'emissione dei terpeni rappresentano per la pianta una **perdita di carbonio fotosintetico**, di **potere riducente** e di **energia chimica** proveniente dal trasporto elettronico (Seufert et al., 1995). In specie che sono forti emettitori di isoprene la perdita di carbonio fotosintetico dovuto al rilascio di questo composto può rappresentare l'1-2% (Harley et al. 1998) ed in condizioni di stress anche il 40%. Specificatamente per l'**isoprene** sono state ipotizzate funzioni di protezione contro gli stress abiotici, ovvero quali **antiossidanti** e **termoprotettori** (Sharkey and Singaas 1995; Singaas et al. 1997; Sharkey et al. 2001) in quanto capaci di stabilizzare le membrane sottoposte ad elevate temperature ed evitarne la denaturazione o capaci di reagire con i radicali ossidrilici responsabili dei danni ossidativi (Loreto et al. 1993; Loreto & Velikova 2001; Affek & Yakir 2002)

In generale, i **terpeni** sono considerati degli importanti

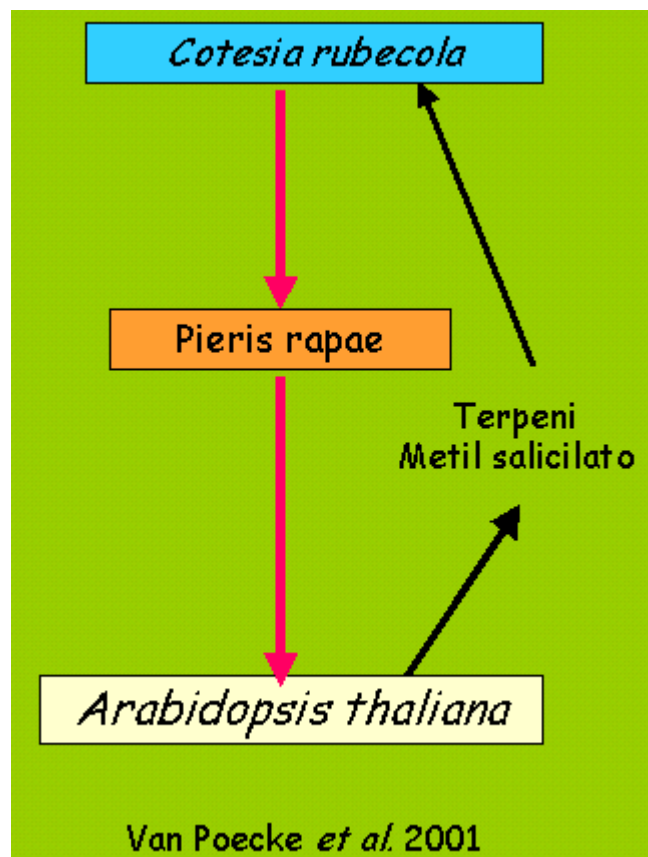
### MESSAGGERI CHIMICI

che la pianta invia la mondo esterno e che le conferiscono maggiori vantaggi della riproduzione dell'individuo e di sopravvivenza nell'ecosistema stesso e quindi nel corso del processo evolutivo. Data l'ampia varietà di VOC prodotti ed emessi dalle piante, un singolo messaggio può consistere in una miscela di diversi composti, permettendo diverse permutazioni in relazione ad un definito codice chimico: tali sostanze possono costituire un **linguaggio dettagliato di comunicazione** e quindi svolgere un ruolo di messaggeri biologici **a livello di singola cellula, di pianta intera, di comunità vegetative**, quindi **nelle interazioni pianta/pianta (allelopatia)**, e nelle **interazione pianta/insetti**.

I composti volatili emessi dalle piante possono fungere da **deterrenti e repellenti** verso numerosi insetti (**allomoni**), possono essere **attraenti** verso altri insetti per lo più impollinatori (**kairomoni**), possono **attrarre i predatori** degli insetti fitofagi (**sinomoni**).

Un esempio di compresenza di difesa diretta ed indiretta è offerto dalla *Nicotiana attenuata* che in risposta all'attacco del lepidottero *Manduca quinquemaculata* può emettere linalolo che agisce da diretto deterrente verso l'ovideposizione di tale insetto fitofago, come anche la miscela costituita da linalolo, *cis*-3-esenolo e *cis*- $\alpha$ -bergamotene, che funge da difesa indiretta attraendo l'insetto predatore *Geocoris pallens* che si nutre delle uova di *Manduca quinquemaculata*.

La recente scoperta di un'azione di difesa indiretta da parte di *Arabidopsis thaliana* in seguito all'attacco da parte delle larve di *Pieris rapae* offre ampie prospettive di ricerca per chiarire ed approfondire tali interazioni ed il ruolo dei composti volatili considerando l'ampia conoscenza del patrimonio genetico di tale specie



## ASPETTI APPLICATIVI: come possono essere utilizzati i VOC?

L'utilizzo dei composti volatili aromatici emessi e contenuti nelle piante, in particolare dei terpeni, è vastissimo. Una volta identificate, queste molecole possono essere estratte nelle quantità necessarie, ma anche riprodotte in laboratorio, e magari modificate in laboratorio per la creazione di fragranze sintetiche.

La crescita di interesse verso tali composti è stata esplosiva soprattutto da parte dell'industria farmaceutica per il loro utilizzo come antibiotici, antisettici, antinfiammatori, antitumorali etc.), dell'industria alimentare come agenti aromatizzanti, conservanti, dell'industria cosmetica, e in agricoltura come erbicidi, fitofarmaci, insetticidi e naturali.

Le piretrine sono ottenuti dai fiori e foglie del genere *Chrysanthemum* (= *Pyrethrum*) ed in particolare dalla specie *cinerariifolium* sono estratti gli esteri monoterpenici ed hanno una potentissima azione insetticida, e sono caratterizzati da una bassa persistenza nell'ambiente e da una bassa tossicità per gli animali.

Per controllare le infestazioni da acari infestanti le api sono già in commercio prodotti a base di miscele terpeniche.

Nell'ambito degli studi di interazione insetti-composti volatili emessi dalle piante l'IBIMET-CNR è stato coinvolto dal Prof. De Lillo dell'Università di Bari in un progetto volto allo studio della biologia sensoriale e riproduttiva di un coleottero buprestide: *Capnodis tenebrionis*, fitofago delle piante da frutto, in particolare di quelle appartenenti al genere *Prunus*.

Poiché non esistono strategie di controllo integrato efficaci, è stata formulata un'ipotesi di lavoro che permetta di approfondire i meccanismi di ricerca dell'ospite e del partner. Nell'ambito di tali studi l'IBIMET è coinvolto nello studio del ruolo delle sostanze volatili emesse dalle piante infestate nell'interazione con il capnode. Precedenti studi condotti dal Prof. De Lillo dell'Università di Bari hanno verificato l'attrazione del capnode verso un primo gruppo di sostanze volatili di origine vegetale mediante l'applicazione dell'elettro-antennografia ed olfattometria.

## Quale è il destino dei VOC in atmosfera?

La comparsa di una foschia blu in corrispondenza ad es. di boschi di pini e di foreste di eucalipti (es. in Australia), da cui deriva il nome di diversi rilievi montuosi (es: le Blue Ridge Highlands in Virginia (USA), le Great Smokey Mountains o le Blue Mountain in Australia, è legata all'emissione dei VOC da parte delle piante.

Proprio per la loro natura chimica di idrocarburi insaturi, i monoterpeni in presenza di luce reagiscono molto rapidamente con i costituenti dell'atmosfera quali ozono (O<sub>3</sub>), radicali ossidrilici (OH) e, nelle aree urbane, con i composti

antropogenici quali gli **ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>)**, come evidenziato dal loro tempo di sopravvivenza (da alcuni minuti a poche ore) in presenza di tali sostanze.

Tra i *prodotti della reazione* di ossidazione dei terpeni con O<sub>3</sub> e OH vi sono gli **aerosol e nuclei di condensazione**, che possono aumentare l'effetto albedo e ridurre l'effetto serra, come anche **monossido di carbonio (CO)**, **O<sub>3</sub> troposferico**, **PAN**, **composti carbonilici** ed **acidi organici** che possono aumentare la deposizione acidica nelle aree remote. Riducendo i radicali ossidrilici e producendo CO, può aumentare il tempo di vita media dei gas radiativi come metano, così aumentando l'effetto serra.

La formazione o riduzione di O<sub>3</sub> troposferico in seguito alle suddette reazioni dei VOC dipende dalla concentrazione degli NO<sub>x</sub>: quando i livelli di NO<sub>x</sub> sono bassi (< 10 fmol/mol), es. negli ambienti rurali e naturali, l'ossidazione dei VOC comporta una rimozione dell'O<sub>3</sub> troposferico, mentre quando i livelli di NO<sub>x</sub> sono elevati (> 10 fmol/mol), es. nelle aree inquinate dalla combustione di carburanti fossili, l'ossidazione dei VOC comporta un aumento dei livelli di O<sub>3</sub> troposferico ( ).

E' importante capire i fattori biochimici e fisiologici che controllano la formazione ed il rilascio di questi VOC nell'atmosfera, specialmente in considerazione della pianificazione di superfici agro-forestali con specie che sono forti emettitori di terpeni. Tali tematiche sono affrontate nell'ambito della gestione del verde urbano dall'università di Lancaster che considerando i vari potenziali effetti delle piante nelle città ha proposto una graduatoria delle specie che possono avere un effetto benefico o negativo in tale ambiente

<http://www.es.lancs.ac.uk/cnhgroup/iso-emissions.pdf>

<http://www.fs.fed.us/ne/syracuse/index.html>

<http://ies.jrc.cec.eu.int/Units/cc/events/torino2001/torinocd/Documents/Terrestrial/TP15.htm>

<http://www.ghasp.org/publications/trees/TreesAndOurAir.html>

### Bibliografia consigliata:

#### Pubblicazioni su riviste:

1. **Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC) An overview on Emission, Physiology and Ecology.** 1999. Kesselmeier J. and M. Staudt. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 33:23-88.
2. **Isoprene Emission from Plants.** 2001. T.D. Sharkey and S. Yeh. *Annu. Rev. Physiol. Mol. Biol.*, 52 :407-436
3. **Emission of low molecular mass hydrocarbons from plants.** 1996. T.D. Sharkey. *Trend in Plant Science*, v.1: 78-82.
4. **Trace Gas emissions and species-dependent ecosystem services.** M. Lerdau and L. Slobodkin. *Trends in Ecology & Evolution* v. 17:309-312.
5. **The formation and function of plants volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense.** 2002. E. Pichersky and J. Gershenzon. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 237-243.

6. **Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions.** 2000. A.A. Agrawal. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 329-335.
7. **Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants.** .S. Mahmoud and R. B. Croteau. *Trends In Plant Science*: <http://plants.trends.com>.
8. Csiky & Seufert 1999. *Ecological Applications* v.9 pp 1138-1146
9. Lichtenthaler 1999. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol.*50:47-65 Eisenreich *et al.* 2001. (*TREND in Plant Science* Vol. 6 n. 2 February)

## Libri

### **Biogenic Emissions of Volatile Organic Compounds from Higher Plants.**

C.N. Hewitt (ed.)

Reactive Hydrocarbons in the Atmosphere, 1999. pp. 43-96, Academic Press, San Diego.

### **Trace Gas Emissions by Plants**

T. D. Sharkey, E.A. Holland and H.A. Mooney

*Academic Press* 1991

### **Plant Volatile Analysis**

H.F. Linskens and J.F. Jackson

Springer 1996

### **Natural Terpenoids as Messengers: a multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications**

P. Harrewijn, A.M. van Oosten and P.G.M. Piron

*Kluwer Academic Publishers* 2001

### **Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants**

David McCaskill & Rodney Croteau

*Nature Biotechnology* 17, 31 - 36 (1999)

### Riferimenti utili per la messa a punto delle tecniche di analisi dei VOC:

[www.sigma-aldrich/supelco](http://www.sigma-aldrich/supelco)

[www.gerstelus.com](http://www.gerstelus.com)

[www.restekcorp.com](http://www.restekcorp.com)

Ciccioli *et al.* 1992. *J. High Resolution Chromatography* 15, pp75-84

Schrader *et al.* 2001. *Environ. Sci. Technol.* V. 35, 2717-2720.

Foley *et al.* 2001. *Environ. Sci. Technol.* v. 35, 1671-1679.

Fick *et al.* 2001. *Environ. Sci. Technol.* v. 35, 1458-1462

Pompe *et al.* 2000 *J. Environ. Monit.* V. 2, pp 133-138