



Università
Ca' Foscari
Venezia

Dipartimento
di Scienze Ambientali
Informatica e Statistica

Corso di Laurea magistrale (*ordinamento ex D.M. 270/2004*) in
Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

**Potenziale attività di ficocolloidi e biometaboliti
algali su larve di *Aedes albopictus*
(Diptera: Culicidae)**

Relatore

Prof. Adriano Sfriso

Correlatrici

Simona Armeli Minicante

Sara Carlin

Laureanda

Marica Stocco

Matricola 819131

Anno Accademico

2014/2015

*... a mio nonno, la mia stella nel cielo.
la mia guida. . .*

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 I FICOCOLLOIDI	6
1.2 I BIOMETABOLITI	12
1.3 LA ZANZARA TIGRE	17
1.3.1 Habitat	20
1.3.2 Ciclo riproduttivo e biologia	21
1.3.3 Importanza sanitaria	24
2. OBIETTIVI DELLA TESI	25
3. MATERIALI E METODI	26
3.1 AREE DI STUDIO	26
3.2 DISEGNO DI CAMPIONAMENTO	28
3.3 PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DEI FICOCOLLOIDI	29
3.4 PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DEI BIOMETABOLITI	31
3.5 INFEZIONE DI LARVE DI Aedes albopictus CON ESTRATTI ALGALI	33
3.5.1 Prova di tossicità dei ficocolloidi ad alta concentrazione (prova preliminare)	35
3.5.2 Prova di tossicità dei biometaboliti ad alta concentrazione (prova preliminare)	37
3.5.3 Prova di tossicità dei biometaboliti a bassa concentrazione	37
4. RISULTATI	39
4.1 RESA DI ESTRAZIONE DEGLI ESTRATTI ALGALI	39
4.2 RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITÀ DEGLI ESTRATTI ALGALI VERSO LE LARVE DI ZANZARE	40
4.2.1 Risultati del test di tossicità dei ficocolloidi ad alta concentrazione (prova preliminare)	40
4.2.2 Risultati del test di tossicità dei biometaboliti ad alta concentrazione (prova preliminare)	40
4.2.3 Risultati del test di tossicità dei biometaboliti di <i>Dictyota dichotoma</i> a diverse concentrazioni	42
5. DISCUSSIONE	44
6. CONCLUSIONI	47
7. APPENDICE	49
7.1 BIOLOGIA DELLE MACROALGHE TRATTATE	49
7.2 PROTOCOLLI PER L'ESTRAZIONE DI POLISACCARIDI	57
7.3 STADI VITALI DI Aedes albopictus	58
8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	59

ABSTRACT

Il presente lavoro di tesi è basato su un'attività di ricerca che prende in considerazione l'estrazione di polisaccaridi e biometaboliti algali per valutare la loro potenziale attività larvicida. Nella Laguna di Venezia e nel Lago di Ganzirri (Messina) sono stati raccolti esemplari di *Undaria pinnatifida*, *Hypnea cornuta*, *Sargassum muticum*, *Fucus virsoides*, *Ulva rigida*, *Dictyota dichotoma*, *Cystoseira barbata* e *Asparagopsis taxiformis*. Gli estratti ottenuti sono stati in seguito testati su larve di *Aedes albopictus*, la specie di zanzara più diffusa nel nostro territorio nonché la più invasiva e pericolosa del genere *Aedes*, in grado di trasmettere gravi patologie negli animali e nell'uomo. Al giorno d'oggi esistono numerosi insetticidi chimici per il controllo delle zanzare che risultano essere però nocivi per l'ambiente e per chi ci vive. I risultati di tutte le specie algali utilizzate che si sono potuti osservare da questo studio hanno messo in evidenza un effetto larvicida dei biometaboliti estratti da *Dictyota dichotoma* annoverandola in questo modo come potenziale fonte di sostanze naturali da usare in futuro come alternativa agli insetticidi sintetici.

1. INTRODUZIONE

L'impiego di insetticidi sintetici, al giorno d'oggi, risulta essere particolarmente abbondante. Questi composti chimici, come ad esempio gli organoclorurati, gli organofosforici, i carbammati, le piretrine e i piretroidi, sono usati comunemente per controllare l'incremento di insetti, tuttavia risultano essere composti inquinanti, tossici e resistenti. I prodotti naturali, invece, sono una buona alternativa perché sono meno nocivi per gli organismi bersaglio e possiedono una biodegradabilità innata (Ali *et al.*, 2013).

Le alghe sono una fonte di sostanze naturali biologicamente attive quali polisaccaridi, biometaboliti, vitamine, acidi grassi, steroli, pigmenti ecc. che trovano impiego in molteplici ambiti.

Numerose specie algali sono utilizzate quale alimento sia per l'uomo che per gli animali, soprattutto nei paesi asiatici, rappresentando il 90% della produzione totale (McHugh D.J., 2002). Alcuni peptidi algali, ad esempio il fucosio¹ e l'acido ursolico² estratti da *Fucus* sp. e *Laminaria* sp., vengono utilizzati in cosmetica perché possiedono attività idratante per la pelle. Questi peptidi vengono utilizzati anche in preparati contro cellulite e obesità. Un'altra sostanza presente in alcune alghe (es. *Laminaria digitata*, *Ulva lactuca* e *Undaria pinnatifida*) è lo iodio, impiegato come integratore alimentare in quanto ha la funzione di stimolare il metabolismo. L'alga bruna *Ascophyllum nodosum* viene impiegata in agricoltura come fertilizzante e nel foraggio per animali.

Tra i composti naturali derivati dalle macroalghe i biometaboliti possiedono una vasta gamma di attività biologiche. Essi vengono infatti utilizzati come antibiotici, antivirali, antivegetativi, antiinfiammatori, antimitotici, antilarvicidi, antibatterici e anticancerogeni (Salvador *et al.*, 2007; Selvin & Lipton, 2004). I prodotti naturali con attività biocida possono aiutare ad eliminare i vettori di parassiti nelle loro fasi larvali o dopo metamorfosi completa in adulto, rimpiazzando i prodotti di sintesi, avendo una rapida degradazione e costi più bassi (Selvin *et al.*, 2004).

1. **Fucosio**: nella sua molecola contiene un gruppo aldeidico. Fa parte dei deossizuccheri.

2. **Acido ursolico**: idrossiacido triterpenico (terpene contenente 30 atomi di carbonio) penta ciclico.

Le Rhodophyta producono la maggiore quantità di metaboliti alogenati (costituiti soprattutto da bromo e iodio) rispetto alle alghe verdi e brune (Oumaskour *et al.*,2013).

1.1 I FICOCOLLOIDI

Le alghe marine sono ricche di polisaccaridi, sostanze naturali che vengono utilizzate nel settore alimentare, nell'industria cosmetica e farmaceutica (Ren, 1997; Tseng, 2001; Renn, 1990). La parola ficocolloide indica che queste sostanze, estratte dalle alghe (dal greco *phykos* = *alga*), hanno la capacità di formare soluzioni colloidali quando dispersi in acqua. Possiedono un elevato peso molecolare e sono composti da polimeri con unità zuccherine. Sono i componenti strutturali principali della parete cellulare delle alghe. La struttura di queste sostanze varia a seconda delle specie algali (Costa *et al.*,2010), mentre la loro attività biologica dipende dalla struttura chimica, dal peso molecolare e dalla conformazione della catena (Ye *et al.*, 2008). I polisaccaridi svolgono un ruolo benefico nell'attività biologica come anticoagulanti (Mao *et al.*,2009), antivirali (Ponce *et al.*, 2003), antiossidativi (Ruperez *et al.*, 2002), anticancerogeni (Synytsya *et al.*,2010) e antiinfiammatori (Na *et al.*,2010). I principali polisaccaridi che compongono la parete cellulare sono cellulosa, emicellulosa e pectine ma alcuni sostengono fisicamente il tallo in acqua (carragenine, alginati, fucani e laminarine).

I ficocolloidi si classificano in:

- **alginati, fucani e laminarani** → alghe brune (Phaeophyta)
- **agar e carragenani** → alghe rosse (Rhodophyta)
- **xilani, mannani e ulvani** → alghe verdi (Chlorophyta)

○ Alginati

Sono polimeri lineari ricavati dalla parete cellulare di molte alghe, generalmente dal gruppo delle alghe brune. Contengono gruppi carbossilici (poliuronide). La loro struttura chimica è costituita da polimeri di 1-4 β -D acido mannuronico (M) e di α -L acido guluronico (G). La quantità e la qualità del polisaccaride estratto dipende dalle specie algali e dalla stagione di raccolta dei campioni. Una molecola di alginato è un polielettrolita: sottoforma di sale monovalente risulta essere solubile in acqua a

qualsiasi intervallo di temperatura. Gli alginati sono in grado di formare un gel attraverso un'interazione con cationi, ad esempio il calcio. La forma acida prende il nome di acido alginico (Fig.1), mentre, la forma di sale (alginato di sodio, di potassio, di ammonio e di calcio), risulta essere molto importante nella parete cellulare.

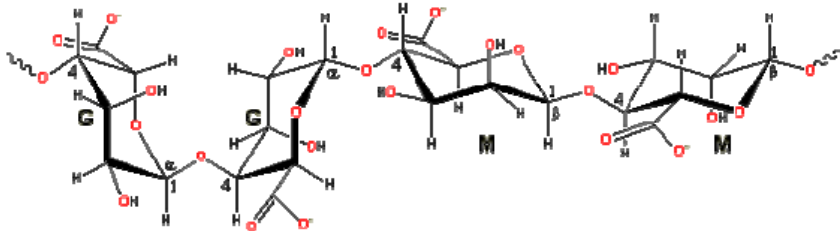


Fig.1: struttura chimica dell'acido alginico (G= gulurónico ; M= mannurónico)

Sono usati nella produzione di vernici, come agenti gelificanti e additivi (l'acido alginico è catalogato dall'UE come E-400), come stabilizzanti per ceramiche e nell'industria farmaceutica. Le specie più importanti da cui sono estratti gli alginati sono le alghe brune, quali *Laminaria sp.*, *Fucus serratus*, *Undaria pinnatifida* e *Dictyota dichotoma*.

○ **Fucani**

Costituiscono una complessa serie di polisaccaridi che si trovano nella parete cellulare delle alghe brune. Generalmente sono costituenti intercellulari però una frazione di questi si può trovare nella parete cellulare. I fucoidani (Fig.2) sono composti prevalentemente da fucopiranoside e solfato naturale (Bertheau & Mulloy, 2003).

Sono polisaccaridi idrosolubili e danno soluzioni altamente viscosi. Sono utilizzati maggiormente nell'industria alimentare ma il loro impiego si estende anche alla cosmetica. Utilizzati anche in applicazioni mediche come modulatori della coagulazione, antiinfiammatori, anticoagulanti, antitumorali, agenti antivirali (Rinaudo, 2007).

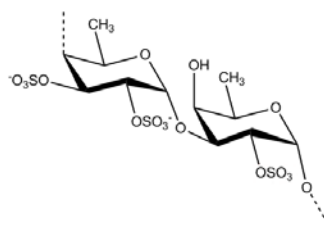


Fig.2: struttura chimica di un fucoidano (www.glycomix.co)

- **Laminarine**

Polisaccaridi di riserva delle alghe brune. La loro struttura è data da unità monomeriche di glucosio aventi legame β 1-3. Esistono in due forme: una solubile e l'altra insolubile (Rinaudo, 2007). Sia la forma solubile che quella insolubile sono costituite da legami(1-3)-D-glucosio con una porzione di legame (1-6)-glucosio e mannitolo (Fig.3). Generalmente si trovano nelle specie di *Laminaria*, da cui prendono il nome ma possiamo trovarle, anche se in misura minore, in *Ascophyllum*, *Fucus* e *Undaria*. Il contenuto di queste sostanze nelle alghe varia sia in base alla stagione sia in base all'ambiente in cui si trovano. Le laminarine hanno la funzione di proteggere da infezioni provocate da patogeni e rinforzano il sistema immunitario.

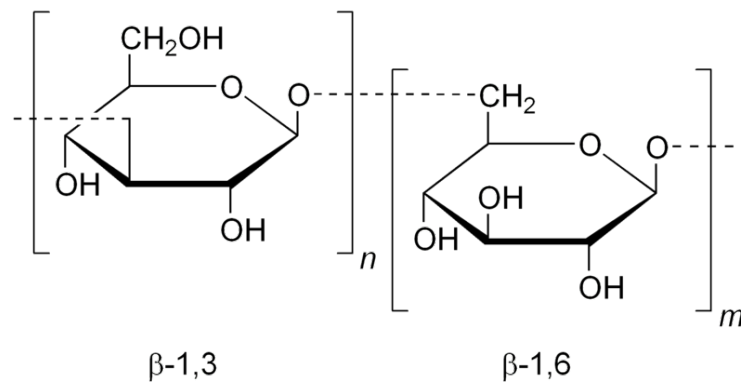


Fig.3: struttura chimica di una laminaria (www.wikipedia.it)

- **Agar**

Chiamato anche agar-agar, è noto sin dal XVII secolo in Giappone per la sua capacità gelificante. Viene estratto da varie specie di alghe rosse (tra le quali *Gelidium*, *Petrocladiella*, *Gracilaria* e *Hypnea*). La temperatura di gelificazione, la forza del gel, la composizione e la resa finale dei polisaccaridi estratti dipende da diversi fattori, ad esempio l'irradiazione solare, i parametri ambientali e le varie specie algali. Questo ficocolloide è composto dall'unità fondamentale di agarobiosio (Fig.4): uno zucchero costituito da D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio (D-L-galattopiranosio). L'agarobiosio tende a formare due tipi di polimeri: la frazione neutra è chiamata agarosio ed è la frazione responsabile della gelificazione, che avviene attraverso legami idrogeno tra le molecole di agarosio; l'altra frazione è l'agaropectina.

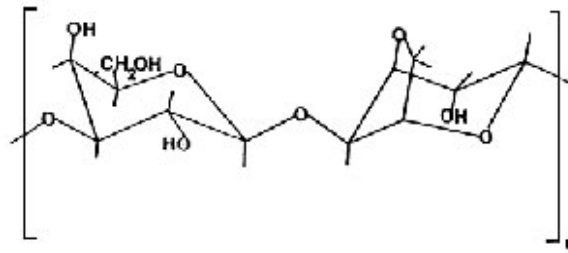


Fig.4: struttura chimica dell'agarobiosio

L'agar si scioglie se portato ad alte temperature, mentre è insolubile a temperatura ambiente. Quando viene fatto raffreddare le molecole tendono a legarsi tra loro e formare un reticolo in grado di intrappolare l'acqua e le altre molecole presenti, costituendo in questo modo un gel. Affinchè avvenga la gelificazione la temperatura non deve superare i 30 - 40 °C. L'agar trova impiego in numerosi settori: in campo medico e farmaceutico come lassativo e anticoagulante, nella separazione e purificazione per scopi chimici, come enzima, ormone o vaccino (Rinaudo, 2007), come additivo nell'industria alimentare (catalogato dall'UE come E406) (Selby & Wynne, 1973; Sand *et al.*, 1973).

- **Carragenine**

Fanno parte della famiglia dei galattani e sono solubili in acqua (Fig.5). Sono composti con unità alternate di galattosio modificato. Le carragenine naturali sono polisaccaridi solfati e sono costituite da due frazioni: k-carragenano e λ-carragenano. Il k-carragenano presenta una struttura ramificata, composta da residui di D-galattosio solfato e 3,6 anidro D-galattosio mentre il λ-carragenano è composto prevalentemente da D-galattosio solfato. Abbiamo anche le iota carragenine (Tab.1).

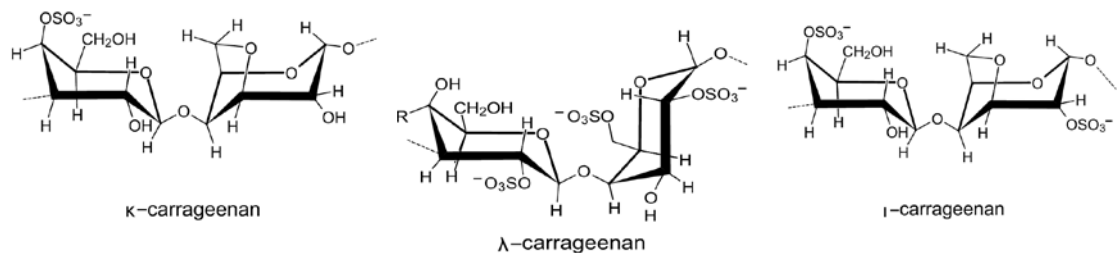


Fig.5: struttura chimica delle tre classi di carragenine (www.wikipedia.it)

Tab.1: Le tre classi di carragenani con descrizione e specie algale in cui sono presenti

Nome	Descrizione	Specie algale
KAPPA	Gel rigido e forte	<i>Kappaphycus cottonii</i> <i>Chondrus</i> <i>Hypnea</i> <i>Furcellaria</i>
IOTA	Gel morbido, flessibile ed elastico	<i>Euchema spinosum</i> <i>Hypnea</i> <i>Gigartina</i>
LAMBDA	Non forma gel	<i>Girgatina pistilata</i> <i>Chondrus crispus</i>

Per quanto riguarda il loro uso, le applicazioni industriali sono le più importanti, come descritto da numerosi autori (Sandford & Baird, 1983; Sand *et al.*, 1973; Towle *et al.*, 1973). Per l'uso industriale solitamente si utilizzano i kappa e lambda carragenani (Jiao *et al.*, 2011). Nel settore alimentare le carragenine vengono impiegate come additivi e identificate con il codice E 407. Questa caratteristica le inserisce nel gruppo degli addensanti e stabilizzanti. Sono usate anche per consolidare ed emulsionare soluzioni. Trovano uso anche in farmaceutica come antitumorali, antivirali e anticoagulanti (Rinaudo, 2007).

○ **Ulvani, Xilani e Mannani**

Gli ulvani sono i principali polisaccaridi presenti nelle alghe verdi dell'ordine delle *Ulvales*. I costituenti principali sono xylosio, ramnosio, acido glucuronico e iduronico (Percival *et al.*, 1967; Lahaye *et al.*, 1996). Nell'industria alimentare vengono usati come fibre dietetiche (Bobin-Dubigeon *et al.*, 1997; Andrieux *et al.*, 1998; Lahaye *et al.*, 1998). Molti generi hanno dimostrato di avere attività biologica (Noda *et al.*, 1990; Maeda *et al.*, 1991; Ivanova *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1999) o abilità di produrre gel (Haug, 1976; Lahaye *et al.*, 1996). Gli xilani (Fig.6) appartengono alla famiglia delle emicellulose. Come unità monometrica di base hanno lo xilosio.

Queste sostanze fanno parte della parete cellulare vegetale, quindi sono molto diffuse in natura. Fanno parte della struttura di materiali legnosi, semilegnosi, paglia, gusci ecc.

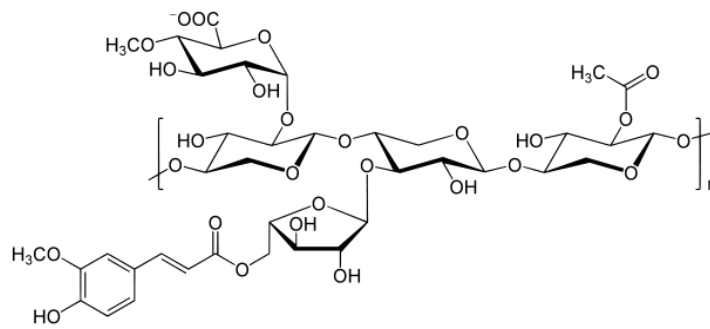


Fig.6: struttura chimica di uno xilano (www.wikipedia.it)

La loro catena principale è costituita da D-β-xilopiranosio con legame 1-4. Nella struttura principale possono estendersi delle ramificazioni composte da xilosio ma anche da arabinosio, mannosio, galattosio e acido 4-O-metil-glucuronico. Possiedono ridotta solubilità in acqua ma questa può aumentare con la riduzione della polimerizzazione della molecola. Nell'industria alimentare vengono utilizzati come fibre. Comunemente estratti dalle alghe verdi ma si possono trovare anche nella parete cellulare di altre alghe. I mannani (Fig.7) sono polisaccaridi ad alto peso molecolare che contengono numerose unità di mannosio. Si trovano comunemente nella parete cellulare vegetale e svolgono una funzione di riserva oppure di sostegno. In base ai diversi generi algali si trovano altrettanti diversi polisaccaridi prodotti (Percival, 1979).

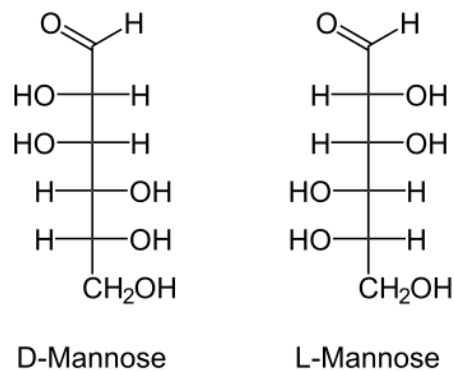


Fig.7: struttura chimica del mannosio (www.wikipedia.it)

1.2 I BIOMETABOLITI

Sono classificati in base alla via biosintetica da cui derivano. Le alghe marine sintetizzano composti bioattivi con diverse attività (Manilal *et al.*, 2011).

I biometaboliti includono fenoli, terpeni, proteine, composti organici alogenati volatili, acetogenine, metaboliti derivati da acidi grassi, carotenoidi. Alcuni autori sostengono che le alghe producono questi composti organici come un sistema di difesa contro le infezioni, il *grazing* (Goodwin *et al.*, 1997), l'allelapatia, e i danni causati da epifiti (Dworjanyn *et al.*, 1999). Hanno attirato l'attenzione anche molti composti volatili.

○ Composti organici alogenati volatili

Le macroalghe sono una fonte molto nota di composti organici alogenati volatili a basso peso molecolare (*volatile halogenated organic compounds*, VHOC) (Urhahn & Ballschmiter, 1998; Moore, 1976; Burreson *et al.*, 1976). Ekdahl *et al.* (1998) sostiene che i VHOC svolgono un ruolo di difesa contro epifiti o contro il *grazing* a causa della loro tossicità (Ekdahl *et al.*, 1998). La loro produzione varia notevolmente in base alla stagione e all'habitat, inoltre le specie algali tropicali rilasciano rese maggiori rispetto a quelle temperate (Ekdahl *et al.*, 1998).

○ Fenoli

Si trovano sia nelle alghe che nelle piante terrestri. Nella loro conformazione possiedono almeno un anello fenolico (Fig. 8). I fenoli sono composti aromatici che derivano dal benzene e, nella loro struttura, possiedono un ossidrilico legato all'anello benzenico. Sono sostanze molto eterogenee nella struttura chimica e nella funzione che svolgono. Efficaci nella difesa contro potenziali agenti patogeni come *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (Weinstein *et al.*, 1975; Lim *et al.*, 2000).

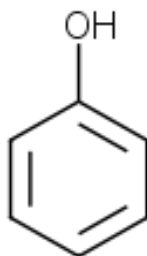


Fig. 8: struttura chimica del fenolo

- **Proteine**

Sono delle sostanze plastiche e svolgono azione costruttiva. Le proteine sono composte principalmente da azoto, carbonio, ossigeno, idrogeno ma possono contenere anche zolfo e fosforo. Le proteine presenti all'interno delle alghe hanno una struttura relativamente semplice e comprendono, in proporzione adeguata, tutti gli amminoacidi essenziali (www.algheria.it).

Il contenuto proteico varia in base alla specie algale. Generalmente, la frazione proteica che si trova nelle alghe brune, è piuttosto bassa (3-15% del peso secco), mentre le alghe verdi e rosse possono contenere dal 10 al 47% di proteine in relazione al peso secco (CEVA; Arasaki & Arasaki, 1983). L'alga bruna *Undaria pinnatifida* presenta un contenuto proteico che va dall'11 al 24% del peso secco, mentre la maggior parte delle alghe brune sfruttate industrialmente (come *Laminaria digitata* e *Fucus vesiculosus*) presenta un contenuto proteico inferiore all'11% del peso secco (Tab. 2).

Molte specie appartenenti al genere *Ulva*, possiedono un contenuto proteico che rappresenta il 10-26% del peso secco (Fujiwara-Arasaki *et al.*, 1984). Il contenuto proteico dipende anche dal periodo stagionale. Prendendo come esempio la specie *Palmaria palmata* è stato riscontrato che livelli proteici più elevati si hanno alla fine della stagione invernale e primaverile mentre, nei mesi estivi, si hanno bassi livelli proteici (Fleurence, 1999). Sono stati riportati studi della variazione stagionale del contenuto proteico anche per quanto riguarda *Ulva lactuca* e *Laminaria digitata* (Auguer & Santimoine, 1978; Abdel-Fattah & Sary, 1987). Le proteine algali vengono impiegate generalmente nell'alimentazione umana.

Tab.2: contenuto proteico in diverse specie algali usate in ambito industriale (Fleurence, 1999).

Seaweed species or genus	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Porphyra tenera</i>	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Fucus sp.</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>
Protein (in % of dry mass)	8-35	33-47	10-21	20-26	8-15	3-11	3-15

○ **Carotenoidi**

Polimeri a catena lineare, formati da una lunga catena di circa 35-40 atomi di carbonio che spesso termina in un anello. Esistono circa 600 tipi di carotenoidi diversi che possiedono importanti funzioni biologiche in batteri, alghe, piante e animali (Polivka & Sundstrom, 2004). Esistono varie tipologie di carotenoidi (Tab.3), tra questi β -carotene (Fig.9) e fucoxantina (Fig.10) trovano impiego in molteplici prodotti.

Tab.3: tipi di carotenoidi nelle alghe verdi, brune e rosse

Gruppo algale	Carotenoidi
Alghe verdi	β -carotene violaxantina neoxantina
Alghe rosse	α e β -carotene luteina zeaxantina
Alghe brune	violaxantina fucoxantina

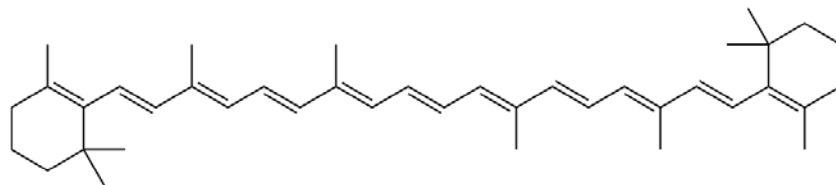


Fig.9: struttura chimica del β carotene

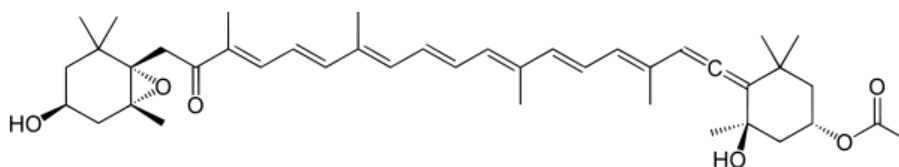


Fig.10: struttura chimica della fucoxantina

- **Steroli**

Sono importanti costituenti chimici delle macroalghe e i componenti principali della dieta degli organismi acquatici. I fitosteroli (Fig.11) sono un unico gruppo di composti aventi C28 e C29 in cui viene aggiunto un gruppo metile o etile al C24.

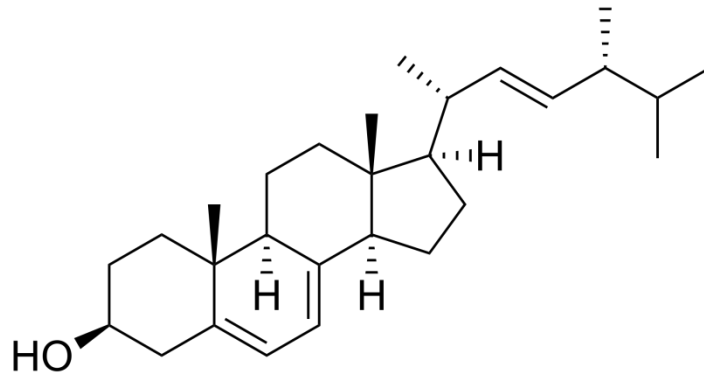


Fig.11: struttura chimica di un fitosterolo

- **Terpeni**

Idrocarburi composti da carbonio e idrogeno. È stato dimostrato che, nelle macroalghe, più della metà dei metaboliti secondari è costituita da isoprenoidi (Stratmann *et al.*, 1992). I terpeni sintetizzati a partire dalla molecola di Acetil-CoA o da intermedi della glicolisi. Sono costituiti dall'unione di più molecole di isoprene (Fig.12); possono contenere unità isopreniche modificate contenenti elementi diversi dal carbonio e dall'idrogeno (terpenoidi), come ad esempio le vitamine A, D, E, K. Sono insolubili in acqua.

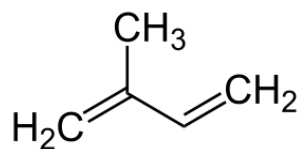


Fig.12: struttura chimica dell'isoprene

I terpeni vengono classificati in base al numero di unità isopreniche presenti (Tab. 4).

Tab.4: classificazione dei terpeni

Denominazione composto	Unità isopreni che (C ₅ H ₈)	Numero atomi di carbonio
Emiterpeni	1	5
Monoterpeni	2	10
Sesquiterpeni	3	15
Diterpeni	4	20
Sesterpeni	5	25
Triterpeni	6	30
Politerpeni	> 6	> 30

- **Polichetidi**

È la seconda grande classe di composti che si possono trovare nelle macroalghe comprendenti circa un quarto dei composti conosciuti (Blunt *et al.*, 2007). Sono composti da polimeri di acetato (C₂) e, a volte, da propionato (C₃). Risultano essere molto simili agli acidi grassi per quanto riguarda la loro origine biosintetica. Si possono trovare anche in piante, animali, batteri e funghi.

1.3 LA ZANZARA TIGRE

- ◆ **Phylum:** *Arthropoda*
- ◆ **Classe:** *Insecta*
- ◆ **Ordine:** *Diptera*
- ◆ **Sottordine:** *Nematocera*
- ◆ **Famiglia:** *Culicidae*
- ◆ **Genere:** *Aedes*

Le zanzare sono il gruppo di insetti più importante per quanto riguarda la salute pubblica perché trasmettono agenti che possono causare gravi patologie (Hales *et al.*, 2002).

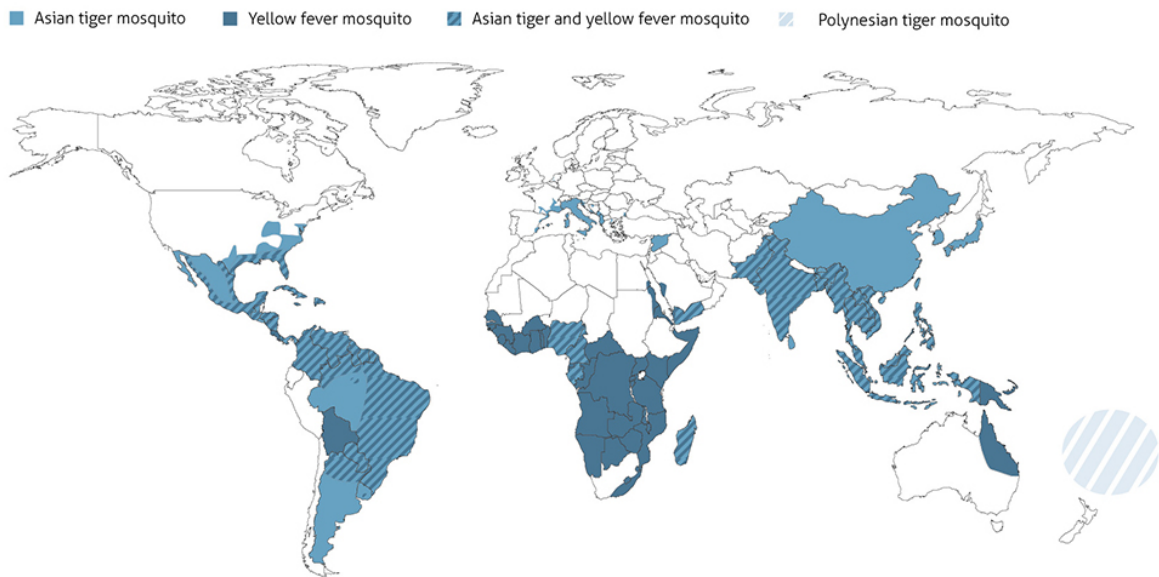
Le loro punture sono anche in grado di provocare reazioni allergiche e sistemiche (Peng *et al.*, 2004).

Tra le varie specie invasive che sono state scoperte in Europa *Aedes albopictus* (Fig.13) rappresenta la minaccia più grave per quanto riguarda la salute pubblica. È considerata la specie di zanzara più invasiva del mondo. Oltre a questa, ce ne sono altre tra cui: *Aedes japonicus* e *Ae. Aegyptie*. La zanzara tigre è originaria dell'Asia (a sud nella zona compresa tra la Nuova Guinea, il Madagascar e le Isole dell'Oceano Indiano; a nord tra Cina, Corea e Giappone). È attualmente presente nei paesi tropicali, subtropicali ed, in parte, nella zona mediterranea (Fig.14).



Fig.13: femmina di *Ae. Albopictus* (foto di Montarsi F.)

Distribution of established tiger mosquitoes*



* We present these data to the best of our knowledge and belief, but do not give any guarantee that the data are free of errors.

Fig.14: areale della zanzara tigre (www.biogents.com)

Negli ultimi 30-40 anni ha colonizzato tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide (Caminade *et al.*, 2012; Benedict *et al.*, 2007). In Europa la prima apparizione risale al 1979 in Albania (Benedict *et al.*, 2007), mentre in Italia la sua presenza è stata registrata dal 1990 nelle località di Genova e Padova, dalle quali si è diffusa in tutta Italia (Sabatini *et al.*, 1990; Dalla Pozza *et al.*, 1992). Come mostrato in figura 15, *Ae. albopictus*, con il passare degli anni, si è diffusa in tutte le regioni italiane ad eccezione della Val d'Aosta (Dutto, 2009).

Attualmente la specie risulta essere presente in tutti i paesi del Mediterraneo e si sta gradualmente espandendo verso nord e ovest europeo (Caminade *et al.*, 2012; Medlock *et al.*, 2012). Ultimamente è stata segnalata anche nel sud della Svizzera, in Olanda, in Bulgaria, in Russia, in Belgio e in Germania. Dal 1986 ha iniziato a colonizzare il continente americano (Moore, 1999; Reiter, 1998; Rossi *et al.*, 1999). Nelle zone dell'Africa è stata osservata per la prima volta nel 1989 quando larve vive di *Ae. Albopictus* sono state trovate nella città di Capo Town ma l'infestazione è stata subito controllata (Cornel *et al.*, 1991; Simard *et al.*, 2005).

Nel 1991 ha colonizzato la Nigeria, poi il Cameroon, la Guinea Equatoriale e il Gabon (Simard *et al.*, 2005; Paupy *et al.*, 2009).

La diffusione in nuove aree probabilmente è dovuta al commercio di copertoni usati (Reiter, 1998), di piante ornamentali, di altri materiali ed allo spostamento di persone in genere (Tatem *et al.*, 2006). Una volta che *Ae. albopictus* viene introdotta in una zona è molto difficile da eradicare.

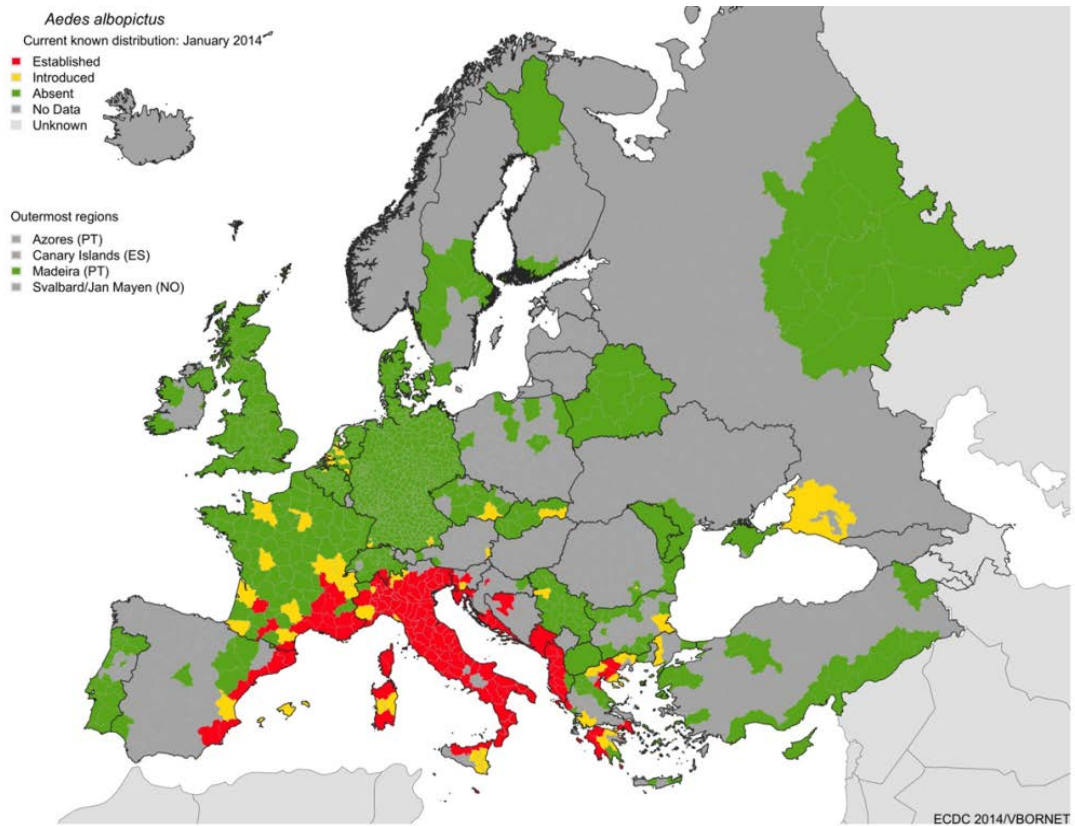


Fig.15: rapida diffusione di *Ae. albopictus* (www.ecdc.europa.eu)

1.3.1 Habitat

Gli habitat naturali di *Aedes albopictus* sono le foreste dove depone le uova nelle cavità degli alberi, del suolo ed in tutte le piante che trattengono acqua come le bromeliacee ed il bambù. Da qui si è poi adattata agli ambienti antropizzati come le zone urbane, sub-urbane e rurali. Le femmine depongono le uova sopra il pelo dell'acqua e la loro schiusa avviene una volta che queste vengono sommerse. Le uova risultano essere molto resistenti sia alle basse temperature che al disseccamento. In ambito urbano depongono le uova in qualsiasi tipo di contenitori sia naturale che artificiale. I contenitori possono essere di qualsiasi materiale: metallo, legno, vetro, plastica, gomma, pietra purchè siano in grado di contenere anche una piccola quantità di acqua dolce (Paupy *et al.*, 2009). (Fig.16)



Fig.16: Alcuni siti di riproduzione di *Aedes albopictus*: A e L) contenitori metallici, B) terrari, C) buchi di pietra, D) vasi di ceramica, E) contenitori di plastica, F) grondaie, G) discarica di pneumatici, H) accumulo di acqua superficiale, I) contenitori monouso, J) parcheggio martellante, K) vassoi fioriera (Bonizzoni *et al.*, 2013)

1.3.2 Ciclo riproduttivo e biologia

Il ciclo riproduttivo delle zanzare si divide in quattro fasi: uova, larva, pupa ed adulto. (Fig.17). La durata del ciclo è influenzata dalla temperatura (Romi *et al.*, 1997).

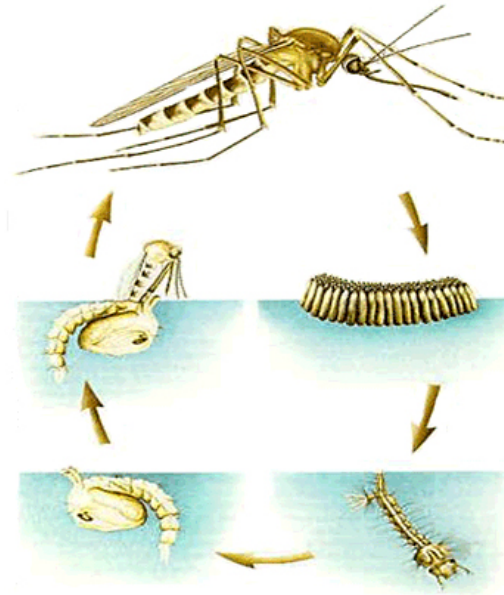


Fig.17: ciclo riproduttivo di una zanzara (www.myfcph.org)

Le uova di *Ae. albopictus* sono di forma ellittica e di colore nero (Fig.18). Hanno dimensioni pari a 0,6 mm x 0,2 mm. Vengono depositate in piccole raccolte d'acqua e quando le condizioni sono sfavorevoli vengono prodotte uova diapausanti. Queste non schiudono subito ma sono "programmate" per resistere a condizioni estreme.

Le uova diapausanti sono leggermente più grandi e sono più resistenti al disseccamento.



Fig.18: uova di *Aedes albopictus* (foto di Montarsi F.)

La fase larvale è acquatica e comprende quattro stadi di sviluppo; al quarto stadio le larve sono lunghe fino a poco più di un centimetro. Esse sono apode, di forma cilindrica e allungata, con un corpo diviso in capo (dotato di antenne), torace e addome diviso in 9 segmenti (Fig.19). Si muovono molto velocemente in acqua e respirano l'ossigeno atmosferico tramite un sifone presente sull'ottavo segmento. Lo sviluppo larvale dipende dalla temperatura, ma in media dura dai 5 ai 10 giorni (Hawley, 1988). Si nutrono di corpuscoli organici presenti in acqua attraverso dei filtri boccali (Harbarch, 2007). La pupa è lo stadio successivo a quello larvale (Fig.20). La sua vita è di circa due giorni ed è strettamente influenzata dalla temperatura (Hawley, 1988).

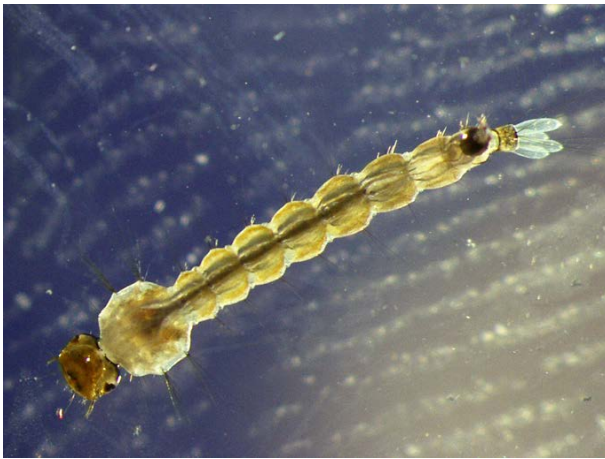


Fig.19: larva di *Aedes albopictus*
(foto di Montarsi F.)

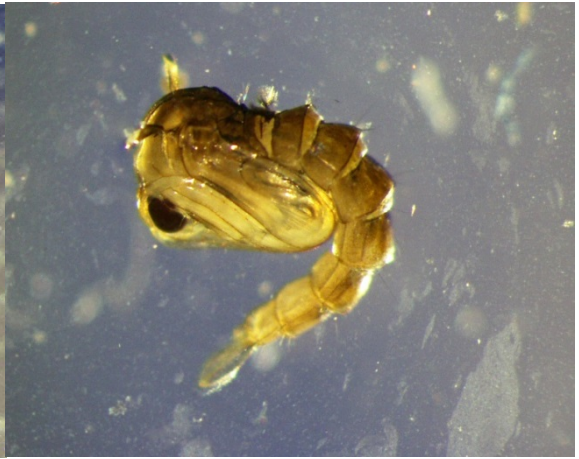


Fig.20: pupa di *Aedes albopictus*
(foto di Montarsi F.)

Dopo la metamorfosi, dalla pupa emerge l'individuo adulto (Fig.21). *Aedes albopictus* presenta una colorazione nerastra con bande bianche caratteristiche lungo la testa, il torace e le zampe. Ha dimensioni che vanno dai 2 ai 10 mm con i maschi più piccoli delle femmine.



Fig.21: adulto di *Aedes albopictus*
(foto di Montarsi F.)

In condizioni di laboratorio le femmine vivono in media dalle 4-8 settimane fino a 3-6 mesi mentre, in natura, hanno una durata di vita di 20 giorni (Calzolari, 2008). La femmina di *Aedes albopictus* si accoppia una volta ma può fare più cicli gonotrofici³, fino a 7 sotto condizioni di laboratorio. La fecondità media di ogni femmina è di circa 300-350, ovvero 42-88 uova ogni pasto di sangue (Robinson, 2005). Le rigide temperature invernali riescono ad inattivare una buona parte delle uova svernate. I mesi ideali per la schiusa delle uova sono tra aprile e maggio, quando le temperature superano i 10°C. Lo stadio larvale (ciclo preimmarginale) ha una durata di 15-20 giorni in primavera e fine estate-primi autunno; di 6-8 giorni in piena estate.

Tra agosto e settembre, generalmente, si ha la massima densità numerica della popolazione. Il ciclo giunge al termine tra ottobre e novembre quando gli adulti muoiono dopo aver deposto uova diapausanti che daranno inizio ad un nuovo ciclo l'anno seguente.

Il diffondersi di questa specie è legato generalmente ad una serie di fattori che possono essere naturali e/o antropici. Tra i fattori naturali abbiamo il clima (quello caldo – umido dei tropici è il più favorevole) e le precipitazioni le quali, oltre a fornire l'acqua per le larve, contribuiscono ad innalzare l'umidità relativa che è utile affinché gli adulti sopravvivano. Se le temperature sono elevate la zanzara è in grado di compiere una crescita esponenziale della popolazione (Romi, 2001).

Il fattore limitante, invece, è rappresentato dall'altitudine, infatti la specie tende a privilegiare le pianure e le basse zone collinari. Tra i fattori derivanti dall'uomo quello di maggior importanza è dato dalla disponibilità di contenitori. Zone in cui sono presenti orti, giardini, oppure terrazzi con piante sono i luoghi ideali per la proliferazione di *Ae. albopictus*. Oltre a questi ci sono anche dei fattori di secondaria importanza e ricordiamo la scarsa normativa vigente e la sottovalutazione del problema da parte delle autorità locali.

3. Ciclo gonotrofico: intervallo tra due deposizioni di uova o tra due pasti di sangue, compreso tra 2 e 5 giorni.

1.3.3. Importanza sanitaria di *Aedes albopictus*

Aedes albopictus è in grado di trasmettere patogeni e parassiti che causano patologie gravi sia nell'uomo che negli animali. Questa specie è un vettore per circa 22 arbovirus (virus trasmessi da artropodi). Tra questi numerosi Flavivirus, Bunyavirus e Alfavirus: includono West Nile, Sindbis, Febbre Gialla, Chikungunya e altri (Shroyer *et al.*, 1986; Vazeille *et al.*, 2010; Thiboutot *et al.*, 2010; Moore & Mitchell, 1997; Dohm *et al.*, 1995). In Europa, Italia compresa, il virus Chikungunya è stato diagnosticato in molti viaggiatori provenienti dalle aree affette dall'infezione (alcune aree dell'Africa, del sud-est asiatico e del subcontinente indiano) ma la trasmissione in loco da parte delle zanzare non era mai stata riscontrata (Angelini *et al.*, 2007).

Nell'agosto del 2007 un focolaio di Chikungunya con più di 250 casi umani confermati in due paesi nella provincia di Ravenna, Castiglione di Cervia e Castiglione di Ravenna, rappresentò il primo caso di trasmissione autoctona in Europa (Rezza *et al.*, 2007; Bonilauri *et al.*, 2008). Questi due episodi hanno fatto crescere l'allerta di un possibile aumento di diffusione di arbovirus in Europa, dove *Ae. albopictus* si è diffusa dalla prima segnalazione in Albania nel 1979 (Benedict *et al.*, 2007). La competenza vettoriale di *Ae. albopictus* per alcuni Alfavirus (Mayoro, Ross River, Encefalomielite Equina dell'Est, Sindbis), Flavivirus (Encefalomielite Giapponese, Febbre Gialla, West Nile) e Bunyavirus (Jamestown Canyon, Rift Valley Fever, Keystone) è dimostrata inoltre da diversi esperimenti eseguiti in campo (Shroyer *et al.*, 1986; Mitchell, 1995).

Aedes albopictus può anche contribuire alla diffusione di *Dirofilaria immitis* e *D. repens*, i due principali agenti della filaria canina, essendo stata dimostrata la sua competenza vettoriale in laboratorio (Cancrini *et al.*, 2003a, 2003b).

Tra il 2001 e il 2010 *Ae. albopictus* è stato l'unico vettore primario di focolai di Dengue nelle isole Hawaii, nelle isole dell'Oceano Indiano, nell'Africa Centrale e nella Cina meridionale (Paupy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Gasperi *et al.*, 2012) mentre, nel 2010, c'è stata la prima trasmissione in Europa (Schafner *et al.*, 2013).

Anche quando non sussistono pericoli sanitari non va sottovalutato il fastidio che le zanzare arrecano con le loro punture. In molti casi questi insetti ostacolano le attività all'aperto, rendendo invivibili le aree turistiche ed urbanizzate soprattutto se localizzate in prossimità di focolai larvali.

2. OBIETTIVI DELLA TESI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di valutare la potenziale attività biologica di estratti algali, polisaccaridi e biometaboliti, contro larve di *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), al fine di sperimentare possibili metodi alternativi nella lotta contro le zanzare, evitando in questo modo l'impiego massivo di composti chimici e minimizzando così i probabili effetti tossici che il loro uso ha sull'ambiente, sull'uomo e sugli animali.

Sono state testate le potenzialità come larvicidi di ficocolloidi estratti da quattro specie algali: *Undaria pinnatifida*, *Hypnea cornuta*, *Sargassum muticum* e *Fucus virsoides*. In letteratura sono presenti studi che certificano la loro attività biologica ma non di quella larvicida (Synytsya *et al.*, 2010; Plouguerné *et al.*, 2010). In aggiunta, sono state testate le potenzialità come larvicidi di biometaboliti estratti da altre specie di alghe. Per questa prova sono state utilizzate: *Ulva rigida.*, *Asparagopsis taxiformis*, *Dictyota dichotoma* e *Cystoseira barbata*. La scelta di queste specie algali è dovuta al fatto che sono già presenti studi in letteratura riguardo l'attività larvicida contro zanzare del genere *Aedes* dei generi *Ulva* e *Dictyota* (Poonguzhali & Nisha, 2012; Bantoto & Dy, 2013) mentre le altre due, soprattutto *Cystoseira*, sono due specie che presentano elevata attività biologica contro patogeni, funghi e parassiti (Abourriche *et al.*, 1999; Badea *et al.*, 2009).

Il lavoro è stato svolto presso l'Università Cà Foscari di Venezia ed il Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie, sede di Legnaro (PD).

3. MATERIALI E METODI

3.1 AREE DI STUDIO

LA LAGUNA DI VENEZIA

- **Posizione:** 45°10' N, 12°40' E
- **Lunghezza:** circa 51 km
- **Larghezza:** circa 12 km
- **Perimetro:** 157 km
- **Superficie totale:** 549 km², di cui l'8% è costituita da aree sopra il livello del mare (litorali, casse di colmata, isole, argini) e il 92% dal sistema idraulico: canali (11,9%), bassifondi, velme e barene (80,1%).
- **Profondità media:** ca. 1 m; variabile tra 15-5 m nelle bocche di porto e nei canali navigabili, e pochi centimetri nelle aree interne.
- **Profondità massima:** -52 m nella bocca di porto di Malamocco
- **Salinità media:** 18-37‰

La laguna di Venezia (Fig.22) è localizzata nel mar Adriatico lungo le coste venete. Circa l'8% della sua superficie totale è occupata da terra, l'11% è ricoperta da acqua o da canali dragati e il restante 80% è composto da piane di marea, paludi di acqua salata e casse di colmata. La laguna è collegata al mare da tre bocche di porto: Lido-San Nicolò, Malamocco e Chioggia. Si hanno evidenti cambiamenti nel livello delle acque con fenomeni di alta e bassa marea.

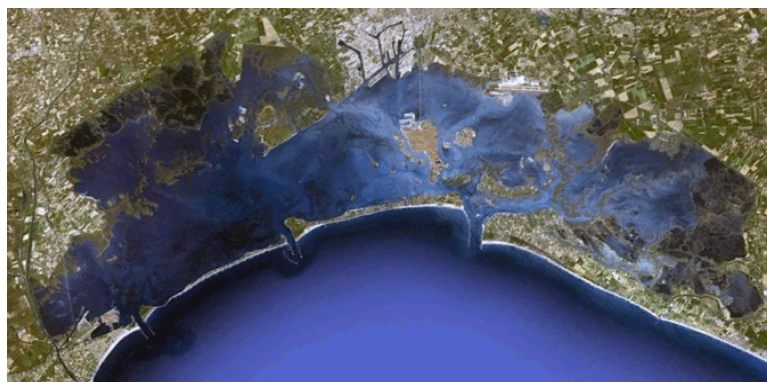


Fig.22: la Laguna di Venezia (www.corila.it)

IL LAGO DI GANZIRRI

- **Posizione:** 38°15' N; 15°36' E
- **Lunghezza:** circa 1.7 km
- **Larghezza:** circa 250 m
- **Superficie totale:** 0.33 km²
- **Profondità massima:** circa 7 m
- **Salinità:** tra 29 e 34 ‰

Il lago di Ganzirri (Fig.23) si trova a nord di Messina e la sua origine è dovuta a causa del fenomeno dell'insabbiamento. In passato si presentava con 1/3 di estensione rispetto a quella attuale mentre adesso si estende per circa 338.000 m² con una lunghezza di circa 1.7 km ed una profondità massima di circa 7 m. La sua forma è allungata in direzione Sud/Ovest- Nord/Est. Per quanto riguarda la batimetria il lago è diviso in due bacini; il più settentrionale, non è molto profondo (<2 m) e risulta essere caratterizzato da evidenti fenomeni di eutrofizzazione. La temperatura media è di 12°C in febbraio e di 30°C in luglio. Il livello di salinità ha un andamento variabile tra 29 e 34‰. Intorno al 1830 sono stati costruiti due canali (Il canale Carmine a nord e il canale Catuso a sud) che permettono l'ingresso dell'acqua del mare. Questi canali vengono tenuti o meno aperti a seconda della necessità di ossigenare le acque del lago, che tendono ad andare incontro all'eutrofizzazione. Un terzo canale ha la funzione di collegare il lago di Ganzirri al lago di Faro. Nel lago di Ganzirri sono presenti diverse specie macroalgali, quali *Gracilaria confervoides*, *Gracilaria compressa*, *Chaetomorpha linum*, *Hypnea cornuta* e *Agardhiella subulata*.



Fig.23: veduta aerea del lago di Ganzirri (www.wikipedia.it)

3.2 DISEGNO DI CAMPIONAMENTO

I campionamenti delle varie specie macroalgali sono stati condotti tra il 2011 e il 2013, in diversi siti della laguna di Venezia e del lago di Ganzirri (Messina). Le alghe sono state raccolte manualmente utilizzando un rastrello e avendo cura di non danneggiarle. Gli esemplari raccolti sono stati puliti cercando di eliminare la parte epibionte⁴. Dopo essere stati pesati, i campioni destinati all'estrazione dei ficocolloidi sono stati essiccati al sole e successivamente macinati. Per quanto riguarda i campioni destinati all'estrazione dei biometaboliti, questi sono stati congelati a -20 °C e successivamente liofilizzati (Fig. 24).

È stato stilato un database con i codici di riconoscimento, le specie algali, la data di campionamento, il sito di campionamento e le coordinate geografiche.

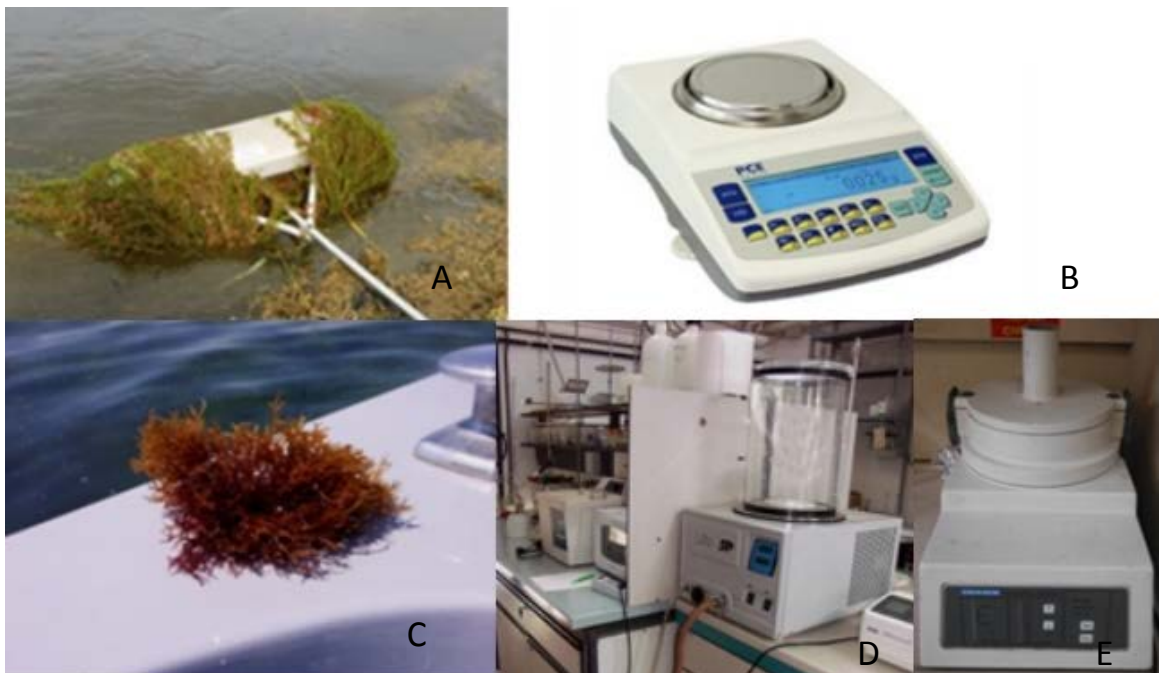






















Fig.24: le varie fasi del campionamento: A) raccolta campioni; B) pesatura; C) essiccazione al sole (ficocolloidi); D) liofilizzazione (biometaboliti); E) macinazione (ficocolloidi)

4. **Epibionte:** organismo sessile (spugne, idrozoi, antozoi, briozoi) che può ricoprire altri organismi, utilizzandoli come substrato.

3.3 PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DEI FICOCOLLOIDI

Materiale necessario:

-  polverizzatore
-  bilancia tecnica
-  becher di vetro
-  Falcon[®] (25-50 ml)
-  millig (Rho-bidistillata) con sistema Millipore Elix 5: per lavaggi
-  stufa
-  vaschetta ad ultrasuoni (Branson 5510)
-  spruzzetta in polietilene
-  parafilm
-  carta alluminio
-  spatole
-  cucchiaini
-  pipette
-  centrifuga (4000 giri)
-  cuvette di plastica
-  provette
-  mortaio
-  etanolo (EtOH 100% e 96 %)
-  acetone (C₃H₆O 100%)
-  NaOH 2N

L'estrazione dei polisaccaridi è stata eseguita con pretrattamento dei campioni in etanolo assoluto e acetone, al fine di eliminare pigmenti e lipidi. Successivamente ciascun campione è stato immerso in acqua bidistillata a 70°C per 24 ore. Il residuo è stato rimosso tramite centrifugazione, mentre al surnatante è stato aggiunto etanolo 96% (V/V) per ottenere l'estratto grezzo attraverso precipitazione (Fig.25) (in appendice vengono riportati i dettagli dei protocolli applicati).

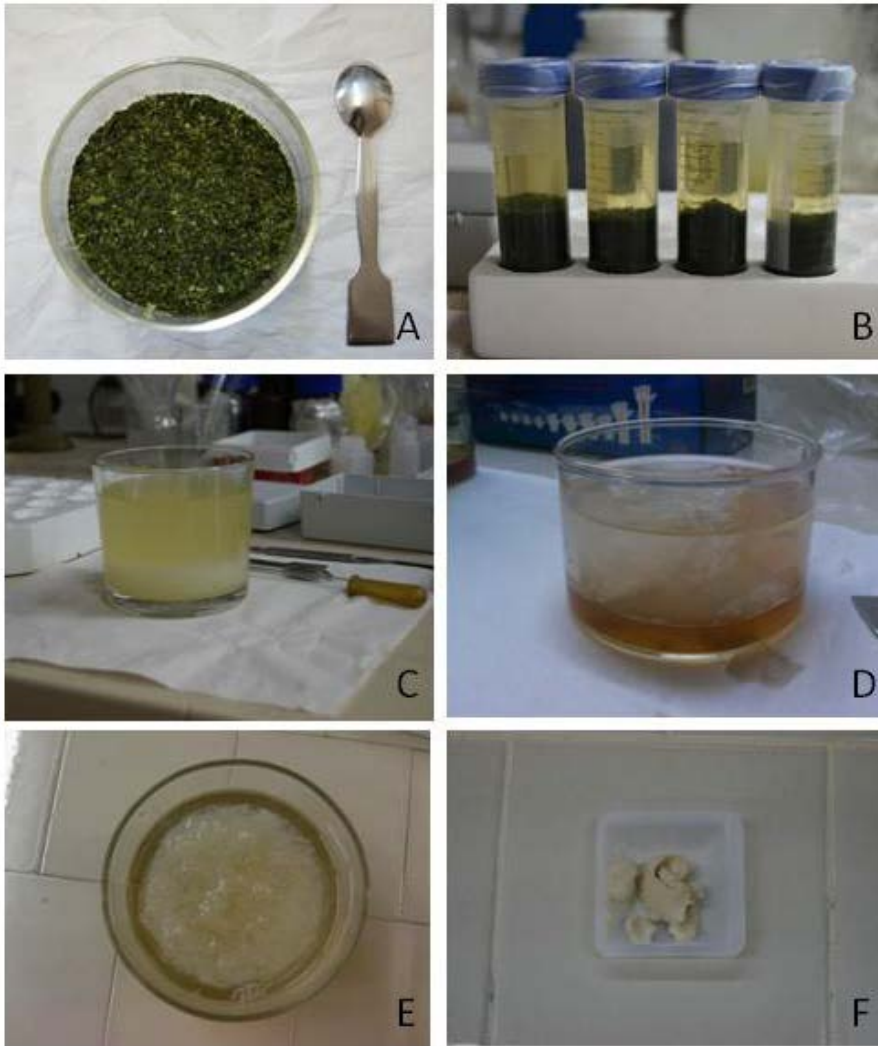












Fig.25: fasi dell'estrazione dei polisaccaridi algali: A) campione macinato; B) falcon con pellet e EtOH al 100%; C e D) precipitazione in EtOH 96%; E) dettaglio del precipitato; F) polisaccaride estratto (foto di Armeli Minicante S.)

3.4 PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DEI BIOMETABOLITI

Materiale necessario:

-  bilancia analitica
-  carta alluminio
-  pinzette e cucchiaini
-  bottiglie di vetro
-  filtro
-  etanolo (EtOH 96%)
-  acetone (C₃H₆O)
-  rotavapor
-  pallone rotante
-  eppendorf

L'estrazione dei biometaboliti è stata eseguita attraverso passaggi seriali in etanolo al 96% e, successivamente, in acetone. Dopo aver liofilizzato il campione algale, questo è stato fatto macerare per 24 ore in etanolo 96% . Successivamente il campione è stato separato dal solvente di estrazione tramite filtrazione, e messo a macerare in acetone al 100%per altre 24 ore, e infine filtrato nuovamente. Le soluzioni di etanolo e di acetone sono state trattate al rotavapor (max 30 °C), al fine di separare il solvente dal soluto. Il prodotto grezzo ottenuto è stato conservato in frigorifero fino all'impiego nelle successive analisi. In Fig.26 vengono illustrate le fasi dell'estrazione.



Fig.26: fasi dell'estrazione dei biometaboliti algali: A) campioni liofilizzati; B) campione in EtOH 96%; C) filtrazione; D) campione in acetone; E) estratti finali; F-G) campione in evaporatore rotante; H) estratti finali

3.5 INFEZIONE DI LARVE DI *Aedes albopictus* CON ESTRATTI POLISACCARIDICI E BIOMETABOLITI ALGALI

È stato messo a punto un test di laboratorio che permette di osservare il tasso di mortalità degli individui a seconda del tipo di estratto algale utilizzato. L'attività o tossicità del prodotto è stata valutata come LC₅₀ e LC₉₀, che rappresenta la concentrazione che provoca la morte rispettivamente del 50% e del 90% degli individui testati. I controlli sono stati eseguiti dopo 24 e 96 ore dall'inizio della prova. La percentuale di mortalità (P) è stata corretta in relazione alla mortalità osservata nel controllo negativo usando la formula di Abbotts (1925):

$$P = (PI - C)/(1 - C)$$

dove PI è la mortalità osservata nel campione e C quella osservata nel controllo.

La differenza di mortalità fra trattati e controllo è stata testata con il test esatto di Fischer.

Le larve sopravvissute sono state lasciate sfarfallare per valutare un eventuale effetto sul regolare sviluppo dell'adulto. Sono stati testati sia i polisaccaridi che i biometaboliti algali per vedere se possiedono un'azione tossica nei confronti della specie in questione, dato che ci sono stati studi in passato, su altre specie di ditteri, con esito positivo (Schimitt *et al.*, 1995; Bantoto & Dy, 2013; Poonguzhali & Nisha, 2012). Dapprima è stato eseguito un test preliminare utilizzando una concentrazione di estratto di 400mg/l. Nel caso in cui sia stato osservato un effetto positivo (mortalità delle larve) si è proceduto all'analisi con basse concentrazioni. Al contrario, nei casi in cui non è stato osservato nessun effetto positivo non si è proceduto oltre per i motivi già descritti nello scopo della tesi. Le prove sono state condotte presso l'insettario dell'IZS delle Venezie, una stanza adibita all'allevamento delle zanzare con condizioni controllate di temperatura, umidità e luce:

- temperatura dell'acqua 25°C
- umidità aria 60%,
- illuminazione con lampade che riproducono la radiazione luminosa naturale (5000 °kelvin) ed un fotoperiodo con 12 ore di luce e 12 ore di buio).

Specie algali utilizzate

ESTRAZIONE FICOCOLLOIDI

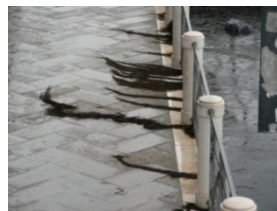
Undaria pinnatifida



Hypnea cornuta



Sargassum muticum



Fucus virsoides



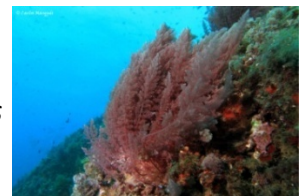
estratte con acqua

BIOMETABOLITI

Ulva rigida



Asparagopsis taxiformis



Dictyota dichotoma












Cystoseira barbata



estratte con etanolo e acetone

Strumentazione e materiale necessario:

-  bilancia analitica
-  Falcon[®]
-  acqua dechlorata
-  pipette monouso
-  cibo per gatti
-  garza protettiva
-  elastici
-  estratto algale
-  piastre petri

3.5.1 Prova di tossicità dei ficocolloidi ad alta concentrazione (prova preliminare)

L'esperimento è stato allestito aggiungendo per ciascuna prova, 10 larve di *Ae. albopictus* III stadio (ottenute dalla schiusa di uova di zanzare dell'allevamento pathogen free) in provette Falcon[®] con 25 ml di soluzione con l'estratto algale mediante etanolo. La concentrazione testata di 400 mg/l è stata preparata sciogliendo 10 mg di estratto in 25 ml di acqua riscaldata (c.ca 40°C). Alle larve è stato somministrato cibo per gatti in piccole quantità (come descritto da alcuni protocolli di allevamento delle zanzare) per evitarne la morte per eccessiva carica organica. Le provette sono state coperte con garza protettiva e lasciate in insettario fino al completo sviluppo degli insetti (sfarfallamento degli adulti). In contemporanea, è stato allestito anche un controllo utilizzando 10 larve in 25 ml di acqua dechlorata. Per ogni specie algale sono state eseguite tre repliche. In Fig.27 sono riportate alcune immagini della prova in corso.

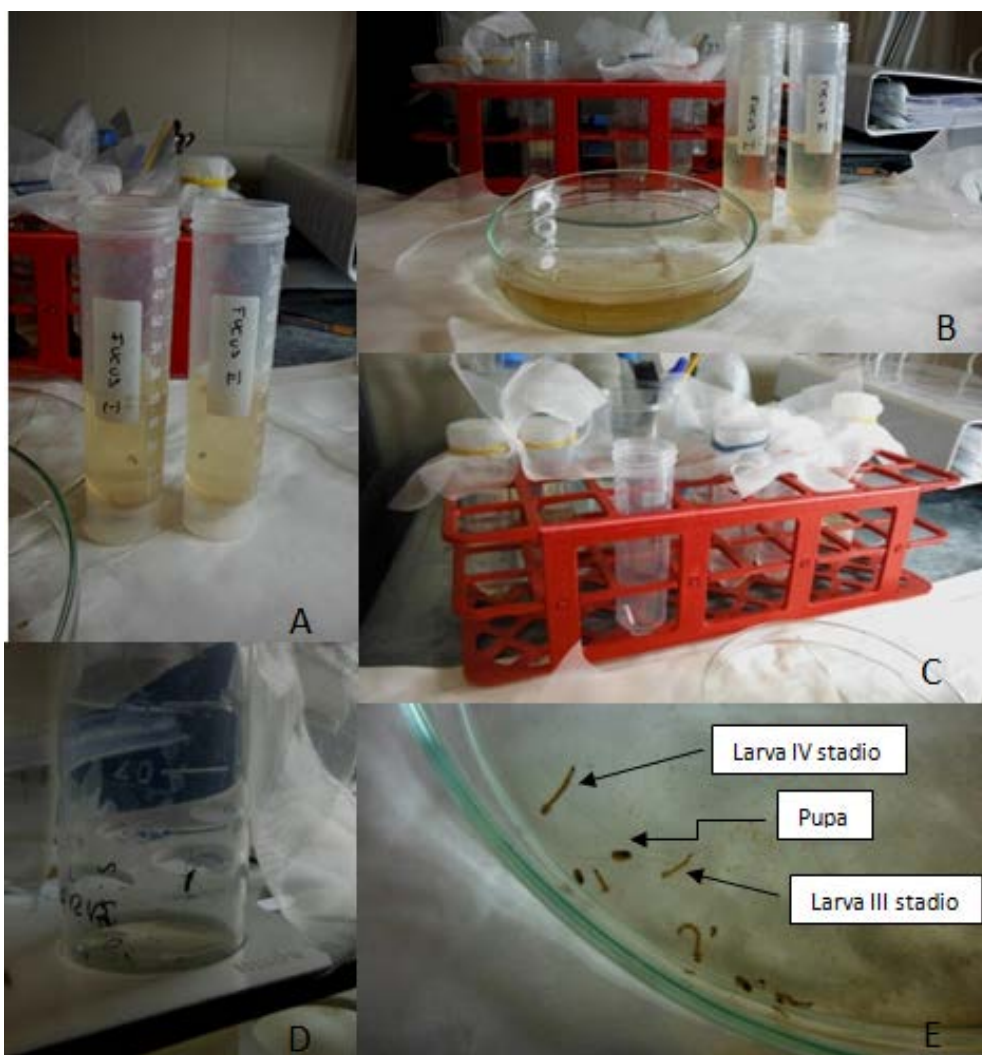


Fig.27: alcune fasi della prova preliminare dei ficocolloidi su *Ae. albopictus*.

A) Provette con 25ml di soluzione con estratto algale a 400mg/l. Si notano gli individui in fase larvale; B) Piastre Petri e provette durante i controllo di mortalità; C) Provette con esemplari chiuse da garza; D) Individuo sfarfallato in provetta con estratto di *Undaria pinnatifida*; E) Individui a contatto con estratti polisaccaridici di *Fucus virsoides* in piastra Petri

3.5.2 Prova di tossicità dei biometaboliti ad alta concentrazione (prova preliminare)

L'esperimento è stato allestito con le stesse modalità descritte per la prova di tossicità dei ficocolloidi ad alta concentrazione (prova preliminare). Sono stati eseguiti test sia con gli estratti con etanolo che con acetone. Per gli estratti con acetone di *Ulva rigida*, *Asparagopsis taxiformis* e *Dictyota dichotoma*, a causa della scarsa quantità di biometaboliti estratti, dovuto forse ad una poca biomassa algale di partenza, non è stato possibile effettuare il test alla concentrazione di 400 mg/l ma si è scelto di partire con una concentrazione di 100 mg/l. Quest'ultima è stata preparata sciogliendo 2 mg di estratto in 20 ml di acqua dechlorata anziché 25 ml, incubando poi sempre 10 larve per prova. Per ogni estratto etanologico sono state eseguite due repliche mentre ne è stata fatto solo una per gli estratti di acetone a causa della poca quantità di sostanza disponibile.

3.5.3 Prova di tossicità dei biometaboliti a basse concentrazioni

Questa prova è stata eseguita solamente per la specie che ha mostrato una certa efficacia nel test preliminare (*Dictyota dichotoma*, vedere nel capitolo dei risultati). Sono state provate diverse concentrazioni: 8 mg/l; 20 mg/l; 50 mg/l e 100 mg/l ottenute sciogliendo rispettivamente 0,2 mg; 0,5 mg; 1,25 mg e 2,5 mg di estratto algale con etanolo in provette Falcon® con 25 ml di soluzione acquosa. Invece, per la stessa specie estratta con acetone sono state testate concentrazioni più basse: 4 mg/l; 8 mg/l; 12 mg/l, 16 mg/l e 20 mg/l ottenute sciogliendo rispettivamente 0,1 mg; 0,2 mg; 0,3 mg; 0,4 mg e 0,5 mg. La scelta di queste concentrazioni piuttosto basse è dovuta al fatto che la quantità di sostanza a disposizione era minima e non era possibile effettuare test con concentrazioni più elevate. A ciascuna provetta sono state aggiunte sempre 10 larve al III stadio e mantenute poi con le modalità già descritte. Sono state eseguite tre repliche per l'estratto etanologico e due per l'estratto con acetone (Fig.28).

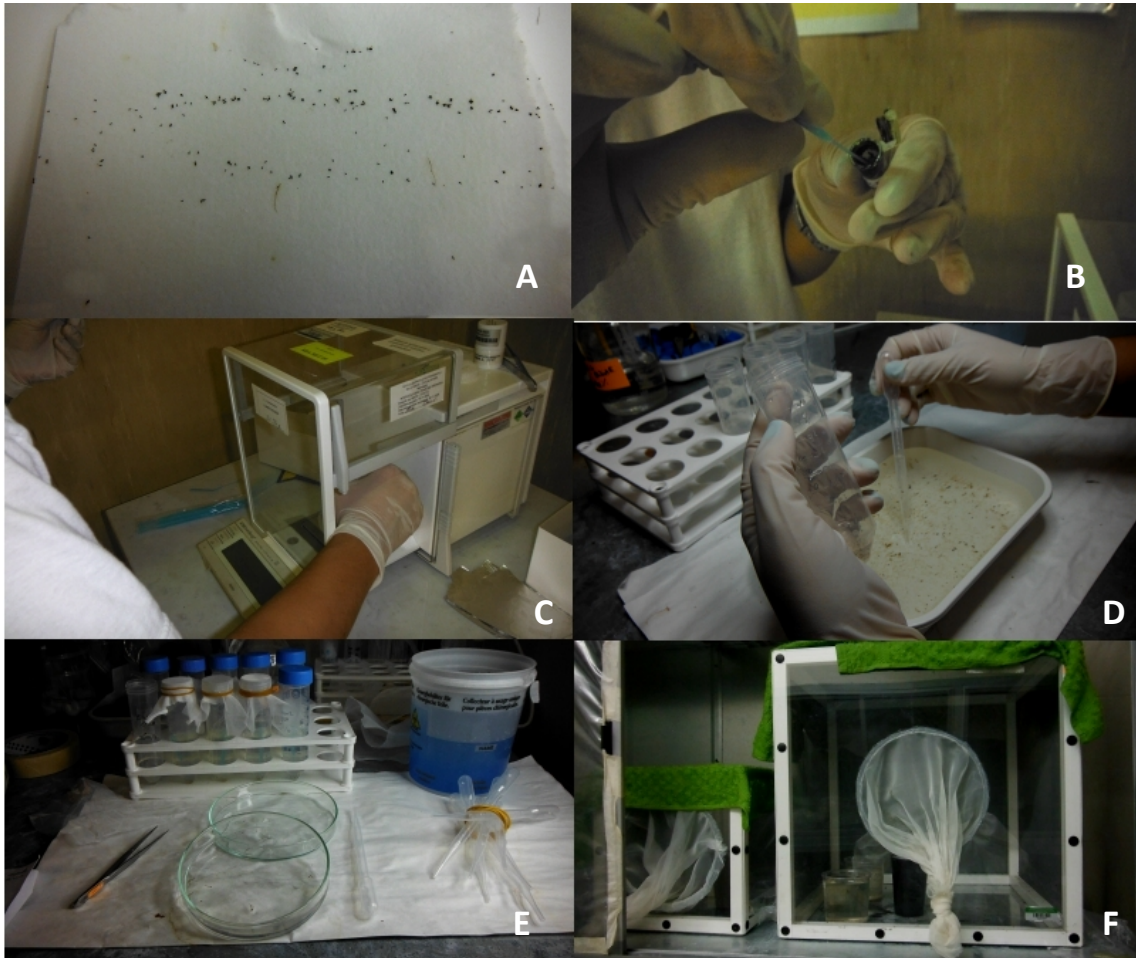


Fig 28: fasi del test larvicida con biometaboliti di *Dictyota dichotoma*. A) uova; B) prelievo dell'estratto; C) pesatura; D) inserimento larve in falcon; E) conteggio della mortalità larvale; F) gabbie per adulti

4. RISULTATI

4.1 RESA DI ESTRAZIONE DEGLI ESTRATTI ALGALI

Dall'estrazione dei ficocolloidi sono state ottenute le seguenti rese (Tab.5):

Tab. 5: resa finale espressa in grammi dei polisaccaridi estratti

Specie	Alghe essiccate (gr)	Polisaccaridi estratti (gr)
<i>Hypnea cornuta</i>	10.0g	0.39
<i>Undaria pinnatifida</i>	10.0g	0.33
<i>Sargassum muticum</i>	10.0g	0.59
<i>Fucus virsoides</i>	10.0g	0.09

Mentre, l'estrazione dei biometaboliti ha dato le seguenti rese finali (Tab.6):

Tab.6: resa finale espressa in grammi dei biometaboliti estratti

Specie	Alghe liofilizzate (gr)	Estratti biometabolici	
		Etanolo	Acetone
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	2.81	0.23	0.10
<i>Ulva rigida</i>	7.78	0.20	0.02
<i>Dictyota dichotoma</i>	10.74	1.09	0.02
<i>Cystoseira barbata</i>	22.67	0.72	0.03

4.2 RISULTATI DEI TEST DI TOSSICITA' DEGLI ESTRATTI ALGALI VERSO LE LARVE DI ZANZARE

4.2.1 Risultati del test di tossicità dei ficocolloidi ad alta concentrazione (prova preliminare)

In tabella 7 sono presenti i risultati delle tre repliche del test preliminare utilizzando i ficocolloidi estratti da *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum*, *Hypnea cornuta* e *Fucus virsoides*.

Tab. 7: prova preliminare del test di tossicità dei ficocolloidi

Attività	<i>U. pinnatifida</i>				<i>H. cornuta</i>				<i>S. muticum</i>				<i>F. virsoides</i>				C
	R1	R2	R3	\bar{X}	R1	R2	R3	\bar{X}	R1	R2	R3	\bar{X}	R1	R2	R3	\bar{X}	
inizio prova	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0
mortalità a 24h	0	0	0	0,0	1	0	0	0,3	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0
mortalità a 96h	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	1	0,3	1	0	1	0,7	0
mortalità totale	0	0	0	0,0	1	0	0	0,3	0	0	1	0,3	1	0	1	0,7	0
adulti ottenuti	10	10	10	10,0	9	10	10	9,7	10	10	9	9,7	9	10	9	9,3	10

Legenda: R1, R2, R3 = numero di repliche; C = controllo; \bar{X} = media aritmetica

Si può notare che non esiste nessuna attività larvicida dopo 24 h e 96 h dalla somministrazione delle sostanze. I risultati ottenuti indicano anche le metamorfosi complete in individui adulti.

4.2.2 Risultati del test di tossicità dei biometaboliti ad alta concentrazione (prova preliminare)

Di seguito sono riportati i risultati del test preliminare sui biometaboliti di *Ulva rigida*, *Asparagopsis taxiformis*, *Cystoseira barbata* e *Dictyota dichotoma* estratti con etanolo (Tab. 8) ed acetone (Tab. 9). per vedere se queste sostanze naturali possiedono attività larvicida nei confronti della zanzara.

Tab. 8: prova preliminare del test di tossicità degli estratti di etanolo

Attività	U. rigida		A. taxiformis		C. barbata		D. dichotoma		C
	R 1	R 2	R 1	R 2	R 1	R 2	R 1	R 2	
inizio prova	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mortalità a 24h	0	0	1	1	1	0	7	9	2
mortalità a 96h	1	0	1	2	1	1	3	1	0
mortalità totale	1	0	2	3	2	1	10	10	2
adulti ottenuti	9	10	8	7	8	9	0	0	8

Legenda: R1, R2 = numero di repliche; C = controllo

Tab.9: prova preliminare del test di tossicità degli estratti di acetone

Attività	U. rigida	A. taxiformis	C. barbata	D. dichotoma	C
	R 1	R 1	R 1	R 1	
inizio prova	0	0	0	0	0
mortalità a 24h	0	1	1	1	2
mortalità a 96h	1	0	0	6	0
mortalità totale	1	1	1	7	2
adulti ottenuti	9	9	9	3	8

Legenda: R1 = replica; C = controllo

Osservando le tabelle si può dedurre che, nell'arco delle 96 h, l'estratto etanolico di *Dictyota dichotoma* ha provocato la morte totale delle larve. Anche l'estratto di acetone di *Dictyota dichotoma* ha causato una evidente mortalità larvale (7 su 10); mentre tutte le altre specie algali hanno dato bassi o nulli valori di tossicità.

4.2.3 Risultati del test di tossicità dei biometaboliti di *Dictyota dichotoma* a diverse concentrazioni

È stato quindi pensato di effettuare il test a concentrazioni più basse utilizzando gli estratti di etanolo e acetone di *Dictyota dichotoma*, per calcolare gli indici LC50 e LC90 in caso ci fosse una significativa mortalità delle larve. In tabella 10 sono presenti i risultati del test di *Dictyota dichotoma* con l'estratto etanolic, mentre in tabella 11 si trovano i risultati del test effettuato sulla stessa alga utilizzando l'estratto di acetone.

Tab. 10: prova di tossicità a basse concentrazioni con estratto etanolic di *Dictyota dichotoma*

Attività	8 mg/l				20 mg/l				50 mg/l				100 mg/l				C
	R1	R2	R3	\bar{X}	R1	R2	R3	\bar{X}	R1	R2	R3	\bar{X}	R1	R2	R3	\bar{X}	
inizio prova	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0
mortalità a 24h	1	2	0	1,0	0	1	0	0,3	4	4	1	3,0	8	6	5	6,3	1
mortalità a 96h	1	2	2	1,7	0	0	0	0,0	2	3	4	3,0	2	3	5	3,3	0
mortalità totale	3	4	2	3,0	0	1	0	0,3	6	7	5	6,0	10	9	10	9,7	1
adulti ottenuti	7	6	8	7,0	10	9	10	9,7	4	3	5	4,0	0	1	0	0,3	9

Legenda: R1, R2, R3 = numero di repliche; C = controllo; \bar{X} = media aritmetica

Tab. 11: prova di tossicità a basse concentrazioni con estratto acetone di *Dictyota dichotoma*

Attività	4 mg/l		8 mg/l		12 mg/l		16 mg/l		20 mg/l		C
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	
inizio prova	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mortalità a 24h	0	1	0	6	0	1	0	5	0	0	0
mortalità a 96h	1	0	3	0	3	0	0	2	2	1	0
mortalità totale	1	1	3	6	3	1	0	7	2	1	0
adulti ottenuti	9	9	7	4	7	9	10	3	8	9	10

Legenda: R1, R2 = numero di repliche; C = controllo

Dall'osservazione dei risultati si può osservare che l'estratto etanolo ha mostrato una mortalità significativa delle larve in tutte le repliche per 100 mg/l ($p < 0.01$) e in due repliche per 50 mg/l ($p < 0.05$). Quindi per gli estratti etanolic di *Dictyota dichotoma* risulta una LC_{90} pari a 100 mg/l ed una LC_{50} di 50 mg/l.

Per quanto riguarda l'efficacia degli estratti con acetone, dall'osservazione generale di tutte le repliche non è stato possibile calcolare i valori di LC_{90} e LC_{50} . Tuttavia, prendendo in considerazione le singole repliche è risultata una mortalità significativa in una delle due repliche per 8mg/l ($p < 0.05$) ed in una per 16mg/l ($p < 0.01$). In generale possiamo dire che è stato possibile osservare una certa mortalità delle larve anche a queste concentrazioni piuttosto basse. E'importante aggiungere che in tutte le prove la metamorfosi in adulti è avvenuta con successo senza subire particolari arresti durante le varie fasi di sviluppo (larve di IV stadio e pupe).

5. DISCUSSIONE

Lo scopo di questa prova è stato quello di valutare se effettivamente può esserci un qualche effetto positivo di tossicità degli estratti nei confronti delle larve. Se uno degli estratti algali avesse mostrato una qualche attività larvicida potrebbe essere utilizzato come una sostenibile alternativa all'uso di insetticidi sintetici più tossici.

L'idea di utilizzare estratti algali contro lo stadio larvale delle zanzare non è nuova. Molti studi (Ciccia *et al.*, 2000; Elbanna *et al.*, 2011; Manilal *et al.*, 2009; Poonguzhali *et al.*, 2012) hanno testato, con risultati positivi, l'efficacia di sostanze naturali presenti sia nelle alghe che nelle piante sulle larve. La scelta di provare ad utilizzare gli estratti algali contro la zanzara tigre (*Aedes albopictus*) è dovuta al fatto che esso presenta una fase larvale acquatica e quindi gli estratti non devono essere somministrati direttamente all'individuo ma possono essere aggiunti nell'acqua dove vivono le larve. L'uso di larve al III stadio è dovuto al fatto che alcuni larvicidi agiscono nella fase di muta (momento in cui si ha il passaggio dallo stadio III allo stadio IV o dal IV stadio alla fase di pupa) bloccando in questo modo lo sviluppo e inducendo alla morte. Quindi anche il rallentamento della crescita risulta essere comunque un effetto positivo dal punto di vista pratico perché viene ridotta la popolazione di *Ae. albopictus* che si può sviluppare in una stagione.

Per il controllo delle zanzare è perciò necessario cercare di ridurre al minimo la crescita della loro popolazione concentrandosi maggiormente sullo stadio larvale, sia perché permette di avere risultati migliori e duraturi, sia perché il controllo delle larve ha un impatto sull'ambiente minore rispetto al trattamento contro gli individui adulti. Diversi Autori hanno utilizzato dei criteri propri di caratterizzazione della potenza larvicida di sostanze naturali (Kiran *et al.*, 2006; Chantraine *et al.*, 1998; Massebo *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2010). Per poter essere efficace come larvicida sul mercato dovrebbe essere in grado di uccidere almeno il 50% delle larve anche a concentrazioni minime, di solito indicate come una $LC_{50} < 100$ mg/l (Cheng *et al.*, 2003). Per questo motivo sono state effettuate delle prove preliminari con l'estratto ad una concentrazione molto elevata (400 mg/l). Gli estratti che non davano mortalità delle larve a questa concentrazione sono stati quindi considerati non efficaci.

I ficocolloidi ricavati da *Undaria pinnatifida*, *Hypnea cornuta*, *Sargassum muticum* e *Fucus virsoides* si sono rivelati non efficaci nei confronti delle larve di *Aedes albopictus* già con le prove preliminari ad elevata concentrazione. Prendendo in considerazione gli estratti delle altre quattro specie di alghe (*Ulva rigida*, *Asparagopsis taxiformis*, *Cystoseira barbata* e *Dictyota dichotoma*) invece, si sono potute notare alcune sostanziali differenze. Sia gli estratti etanoliche che di acetone di *Dictyota dichotoma* hanno provocato la morte delle larve, i primi alla concentrazione di 400 mg/l, i secondi a 100 mg/l; mentre le altre specie non hanno dato tossicità positiva. Dopo aver eseguito la prova di tossicità a basse concentrazioni abbiamo concluso che gli estratti di etanolo di *Dictyota dichotoma* risultano essere tossici nei confronti dello stadio larvale di *Aedes albopictus* avendo un LC50 di 50 mg/l e un LC90 di 100 mg/l. Le larve rimaste in vita si sono sviluppate allo stadio di pupa fino ad arrivare alla metamorfosi completa in adulto (sfarfallamento).

Bantoto *et al.*, (2013) ha studiato l'efficacia larvicida di estratti algali presenti in due specie di alghe brune (*Padina minor* e *Dictyota linearis*) contro larve di *Aedes aegypti*. La mortalità larvale aumentava all'aumentare della concentrazione di estratto. Per quanto riguarda l'estratto di *D. linearis* non si osservava nessuna mortalità a 20 mg/l; i valori di LC50 erano di 60 mg/l e quelli di LC90 di 91.6 mg/l. Quindi, i risultati da noi ottenuti sono paragonabili a quelli ottenuti da Bantoto *et al.* (2013) anche se la specie di zanzara e di alga non erano esattamente le stesse.

Le Dictyotaceae sono una fonte di terpeni bioattivi, che potrebbero essere una risposta evolutiva delle alghe brune agli erbivori. *Dictyota* e *Padina* producono terpeni e sesquiterpeni (De Paula *et al.*, 2011). Nel presente studio, *Dictyota dichotoma* ha mostrato una significativa attività larvicida contro *Ae. albopictus* suggerendo la presenza di metaboliti attivi, probabilmente terpenoidi; tuttavia, l'effetto larvicida delle alghe brune potrebbe anche essere dovuto a fenoli o acidi grassi insaturi (Bantoto *et al.*, 2013).

Altri autori (Poonguzhali & Nisha, 2012) hanno testato l'attività larvicida di estratti metanolici, acetone e benzene di *Ulva fasciata* e *Grateloupia lithophila*, contro il vettore *Culex quinquefasciatus*.

Gli Autori riportano per *Ulva fasciata* valori di LC50 con l'estratto metanolico e di LC90 con l'estratto di acetone piuttosto elevati (rispettivamente 432 mg/l e 885 mg/l).

Confrontando i valori di questi studi con quelli da noi ottenuti si può concludere che gli estratti delle alghe del genere *Ulva* sono effettivamente poco efficaci per il controllo delle zanzare.

Va inoltre evidenziato che esistono comunque alcune differenze tra i nostri studi e quelli effettuati in passato da altri autori, ma questo è dovuto al fatto che sono state usate specie algali, concentrazioni e metodi estrattivi diversi. Anche il dittero in questione non è lo stesso.

In generale, la bioattività di un composto di diverse specie dello stesso taxa varia con la zona geografica e può dipendere da parametri ecologici e geografici come irradiazione o nutrienti (Marti *et al.*, 2004). Si ritiene che la produzione di metaboliti secondari composti da carbonio sia maggiore nelle zone con elevata intensità luminosa, concentrazioni basse di nutrienti e pascolo elevato (Coley *et al.*, 1985).

6. CONCLUSIONI

Gli estratti algali possono essere ricchi fonti alternative di agenti per il controllo delle larve delle zanzare, in quanto costituiscono un serbatoio di composti bioattivi che sono biodegradabili in prodotti non tossici e possono essere potenzialmente utilizzati nel controllo dello stadio larvale dell'insetto.

Il presente studio dimostra che gli estratti polisaccaridici di *Hypnea cornuta*, *Sargassum muticum*, *Fucus virsoides* e *Undaria pinnatifida* non possiedono attività tossica nei confronti delle larve di *Aedes albopictus*. Mentre, per quanto riguarda l'estratto etanolic di *Dictyota dichotoma*, tenendo presente il valore ottenuto di LC50 (50 mg/l) e confrontandolo con il valore minimo di attività larvicida (LC50 < 100mg/l) si è arrivati alla conclusione che *Dictyota dichotoma* possa essere un efficace candidato nel controllo di *Aedes albopictus*.

Bisogna tenere presente però alcune problematiche emerse durante la sperimentazione come ad esempio la disponibilità algale (non tutte sono presenti in quantità elevate per poter effettuare abbastanza prove); il metodo di estrazione (alcuni protocolli risultano essere lunghi e laboriosi) e la specie di zanzara in questione (certi generi possono essere resistenti a certi principi attivi). Per il controllo della zanzara tigre attualmente esistono in commercio molti prodotti chimici che agiscono sia sullo stadio larvale (insetticidi larvicidi) che sull'adulto (insetticidi adulticidi). Per i primi si impiegano regolatori di crescita, come il Piriproxyfen, il Diflubenzuron ed il *Bacillus thuringiensis israelensis*, mentre come adulticidi vengono impiegati i piretroidi sintetici e naturali. I larvicidi non sono pericolosi per i vertebrati, ma hanno effetti negativi contro altri invertebrati acquatici innocui (altre larve d'insetti, copepodi, ecc.), mentre gli adulticidi sono più tossici, anche per i vertebrati. I ficocolloidi ed i biometaboliti sono sostanze naturali che possiedono efficacia come anticoagulanti, antivirali, antiossidanti e antitumorali ma, mentre i primi non possono essere utilizzati come larvicidi nella lotta contro le zanzare, i secondi sono dotati di questa capacità. Tornando allo studio in questione, visti i risultati ottenuti dalle prove, se in futuro si risolveranno le problematiche dovute al metodo estrattivo mettendo a punto ulteriori indagini

scientifiche, *Dictyota dichotoma* potrebbe essere annoverata come una specie potenzialmente interessante per una possibile alternativa agli insetticidi sintetici.

Avere a disposizione un prodotto naturale, non tossico per i vertebrati, biodegradabile e non residuale permetterebbe il suo utilizzo anche in ambito domestico, alla portata di tutti, senza ricorrere a ditte di disinfestazione specializzate. Per questi motivi riteniamo che gli studi su questo tipo di sostanze andrebbero approfonditi e incoraggiati.

7. APPENDICE

7.1 BIOLOGIA DELLE MACROALGHE TRATTATE



Hypnea cornuta

Phylum: Rhodophyceae

Ordine: Gigartinales

Famiglia: Hypneaccaeae

Genere: *Hypnea*

Fa parte della categoria delle alghe rosse. I talli (Fig.1) sono di colore rosso e di forma cilindrica, alti 6-20 cm, intrecciati con altre alghe o formanti ciuffi fissati al substrato. Gli assi sono ramificati in modo alterno, ricoperti da rami spiniformi lunghi 1-2 mm. La struttura del tallo è monoassiale: in sezione trasversale la cellula assiale è ben distinta ed è circondata da grosse cellule midollari rotondeggianti o ovoidi. Il cortex presenta un singolo strato di cellule di spessore tra i 25 e i 30 μ . Presenta un ciclo trigenetico aplodiplofasico isomorfo. In Fig.2 si osserva il dettaglio al microscopio ottico del ramo di *H. cornuta* con delle particolari estroflessioni che prendono il nome di processi stellati. Questa specie fa parte della Biocenosi delle alghe infralitorali. La troviamo nel Mediterraneo (Fig.3), nel Golfo di Guinea, nel mar dei Caraibi, nell'Oceano Pacifico e Indiano. È classificata come una specie invasiva.

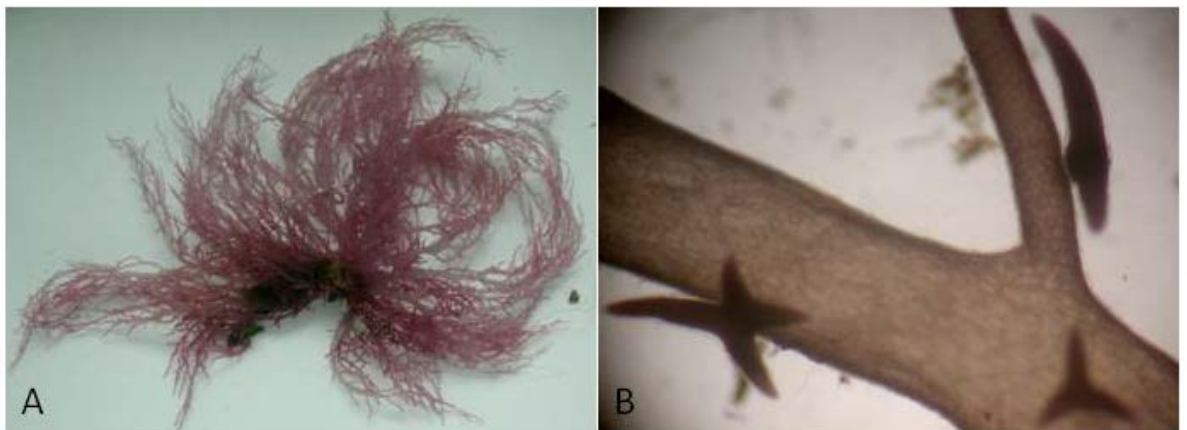


Fig.1: A) tallo di *Hypnea cornuta*; B) dettaglio al microscopio ottico del ramo di *Hypnea cornuta* 500- μ m con processi stellati (foto di Sfriso A.)



Undaria pinnatifida

Phylum: Phaeophyceae

Ordine: Laminariales

Famiglia: Alariaceae

Genere: *Undaria*

È una specie aliena di origine giapponese. Il suo tallo (Fig.2) è costituito da tre parti: base, stipite e fronda. I talli macroscopici (sporofiti) variano sia per quanto riguarda la forma sia per quanto riguarda le loro dimensioni. Possono andare dai 30-40 cm fino ai 2 m di lunghezza (Fig. 5) e dipendono dalla densità, dalle caratteristiche ambientali dei siti di appartenenza, dalle caratteristiche chimico-fisiche e trofiche della colonna d'acqua e dalla profondità in cui essi si trovano. Generalmente di colore bruno-rossiccio, carnoso e viscido al tatto a causa della presenza di muco superficiale. Si riproduce sia sessualmente che a sessualmente. Il suo ciclo riproduttivo presenta un'alternanza tra fase sporofitica e gametofitica. Nella parte inferiore dello sporofito, nei mesi primaverili, compaiono gli organi riproduttivi i quali danno origine e liberano zoospore. Dopo la loro germinazione si sviluppano gametofiti sia femminili che maschili i quali rimangono ancorati al substrato. A fecondazione avvenuta, da questi talli microscopici si origineranno nuovi sporofiti. La troviamo ancorata a substrati rocciosi che si trovano dal mesolitorale inferiore fino all'inizio dell'infralitorale. A volte, la si può trovare in stretta associazione con *Sargassum muticum*. In estate tende a scomparire a causa delle elevate temperature dell'acqua. Osservata nell'Oceano Atlantico e Pacifico e nel Mediterraneo. Introdotta attraverso l'acquacoltura.



Fig.2: talli di *Undaria pinnatifida* diverse fasi di accrescimento (foto di Sfriso A.)



Sargassum muticum

Phylum: Phaeophyceae

Ordine: Fucales

Famiglia: *Sargassaceae*

Genere: *Sargassum*

Presenta dimensioni molto grandi ed è originaria del Giappone. La sua colorazione è bruno-giallastra o marrone-oliva (Fig.3). Viene distinta dalle altre alghe per la presenza di piccole vesciche sferiche galleggianti che possono trovarsi singolarmente o a gruppi. Cresce specialmente su substrati duri (rocce, conchiglie) e si fissa a questi tramite un disco basale largo circa 3 cm. I suoi talli, filamentosi e ramificati, se si sviluppa isolata e in acque vivificate possono raggiungere i 7-8 m di lunghezza. Dal disco basale andando verso la parte apicale dell'alga si nota un assottigliamento e una suddivisione in ramificazioni primarie e secondarie. Può crescere in ambienti con salinità compresa tra 7 e 34‰ e temperature comprese tra i 10 e i 30 °C. È una specie invasiva, in grado di colonizzare rapidamente vaste aree e soppiantare le alghe che si trovano nei dintorni. È monoica cioè presenta sullo stesso individuo organi riproduttivi sia maschili che femminili. Il ciclo di vita presenta una predominanza della fase sporofitica rispetto a quella gametofitica. Quando lo sporofito giunge a maturità si formano gli organi di riproduzione (conzettacoli). Qui sono presenti organi specifici che portano i ricettacoli femminili (oogoni) e quelli maschili (anteridi). Gli oogoni danno poi origine alle ovocellule mentre gli anteridi ai gameti. Quando l'ovocellula viene fecondata si originerà una nuova plantula che presto diventerà sporofito. *Sargassum muticum* si può è distribuita in Gran Bretagna, Francia, Belgio, Paesi Bassi, nel Mediterraneo e nella laguna di Venezia. La sua introduzione è avvenuta attraverso l'acquacoltura (molluschicoltura).



Fig.3: talli di *Sargassum muticum* dettaglio di un ramo di *Sargassum muticum* che mostra le vesciche gassose (foto di Sfriso A.)



Fucus virsoides

Phylum: *Phaeophyceae*

Ordine: *Fucales*

Famiglia: *Fucaceae*

Genere: *Fucus*

Presenta talli frondosi, a gambo corto, che si dividono dicotomicamente in lamine nastriformi larghe da 1 a 3 cm, attraversate da una nervatura centrale ben visibile (Fig.4). È provvista di un disco basale che la ancora al substrato. La parte apicale può essere semplice o biforcuta e qui si trovano dei ricettacoli rigonfi e punteggiati in cui sono presenti gli organi riproduttivi. La sua pigmentazione è marrone scuro (in vivo) e nerastra (su esemplari secchi). Presenta una consistenza membranosa e una ramificazione dicotomica. Può arrivare fino a 20 cm di altezza. È capace di sopportare elevate escursioni mareali (con la bassa marea è in grado di essiccarsi per poi reidratarsi con l'alta marea) ed è pluriennale. La riproduzione, generalmente sessuata si ha nel periodo primaverile e avviene attraverso anteridi ed orgoni i quali, a maturità, escono dal concettacolo¹ attraverso l'ostiolo. La fecondazione si ha in acqua tra un gamete femminile di grosse dimensioni e non ciliato ed un gamete maschile di piccole dimensioni ma provvisto di due flagelli. Al termine, l'uovo si deposita sul fondale marino generando un nuovo individuo chiamato plantula. Presenta un ciclo monogenetico diploide. Il suo habitat ideale sono le rocce che si trovano nel mesolitorale superiore in luoghi calmi e caratterizzati da periodi regolari di emersione. Specie endemica del Golfo di Trieste e dell'Alto Adriatico (www2.units.it)

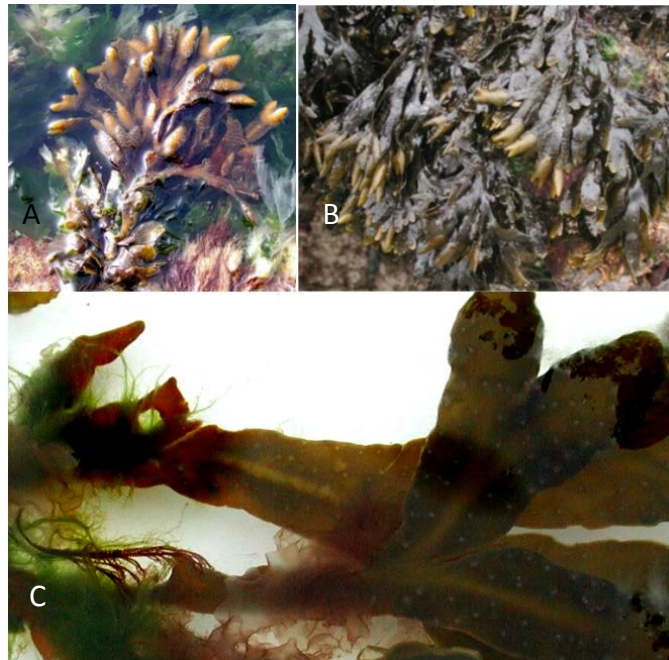


Fig.4: A) tallo di *Fucus virsoides*, B) altri esemplari di *Fucus virsoides*, C) dettaglio della nervatura centrale (foto di Sfriso A.)



Ulva spp.

Phylum: Chlorophyceae

Ordine: Ulvales

Famiglia: Ulvaceae

Genere: *Ulva*

La sua fronda presenta un aspetto laminare e foliaceo, con il bordo ondulato. I suoi talli si trovano generalmente in forma pleustofitica (galleggiano nell'acqua) ma possono attaccarsi anche al substrato tramite un corto peduncolo basale. Le cellule possono avere sia forma quadrangolare che poligonale e risultano simili in tutto il tallo algale (Fig.5). La colorazione dell'individuo vivo è sui toni di verde con qualche sfumatura azzurra alla base mentre, l'individuo secco presenta una colorazione verde. Alla base risulta essere rigida e coriacea. Non presenta ramificazioni. Sono presenti dei rizoidi che hanno la funzione di attaccare *Ulva* al substrato. La riproduzione può essere sia sessuata che asessuata e presenta un ciclo aplodiplonte e isomorfo in cui si alternano gametofiti dioici ed isogami e sporofiti. Il suo habitat principale sono le rocce e la si può trovare generalmente in luoghi esposti, ancorata o libera su banchi di sabbia che sono protetti dal mesolitorale-infralitorale superiore. Usata nel settore alimentare come piatto fritto e nel settore farmaceutico come vitamina A e antimicrobico. *Ulva* è un'alga che si trova comunemente ed è ubiquitaria. Se la si trova con un numero esteso di individui e in mezzo a poche altre specie, sta ad indicare una condizione di eutrofizzazione o di alterazione ambientale.

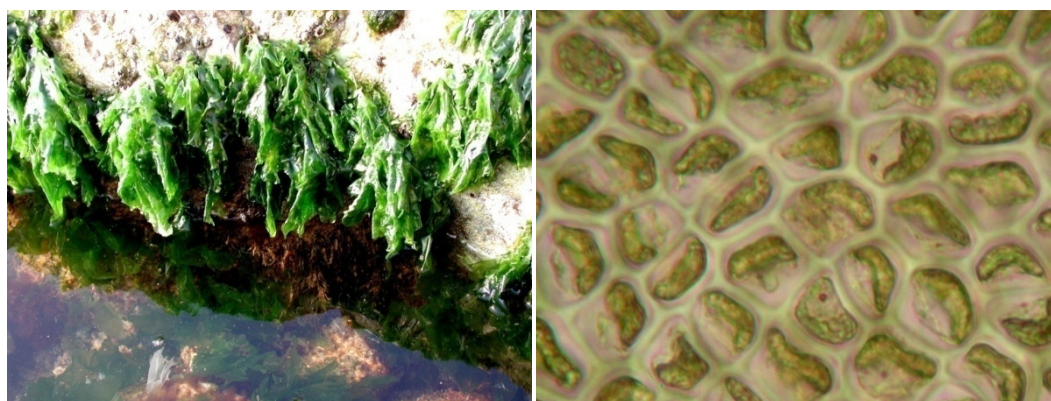


Fig.5: *Ulva rigida*; dettaglio al microscopio ottico di cellule e cloroplasti di *Ulva rigida* (foto di Sfriso A.)



Cystoseira barbata

Phylum: Phaeophyceae

Ordine: Fucales

Famiglia: Cystoseiraceae

Genere: Cystoseira

I suoi talli sono di grandi dimensioni, a forma di cespuglio. Alcuni esemplari arrivano a 1.30 m di altezza (Fig.6). Sono presenti vescicole aerifere sui rami secondari dell'alga. In vivo, presenta una colorazione che cambia a seconda della stagione: in inverno è bruna olivastro, in primavera giallastro. Non è iridescente. Gli esemplari secchi, invece, sono neri. Ha una ramificazione irregolare che a volte può essere dicotomica, altre volte regolarmente pennata. Si attacca al substrato attraverso un disco circolare stretto e tozzo. Presenta un ciclo monogenetico diploide e si riproduce per oogamia in concettacoli che si trovano distribuiti su tutto il tallo oppure in parti specializzate che si trovano sui rami laterali. È una specie reofila (è in grado di sopportare situazioni di idrodinamismo non intenso dell'acqua) e si trova su rocce dell' infralitorale. La si può trovare nel golfo di Trieste e di Venezia, e più in generale, nei mari Adriatico e Mediterraneo. È usata comunemente in farmacia come antilipemico. Il suo principio attivo è l'acido alginico.

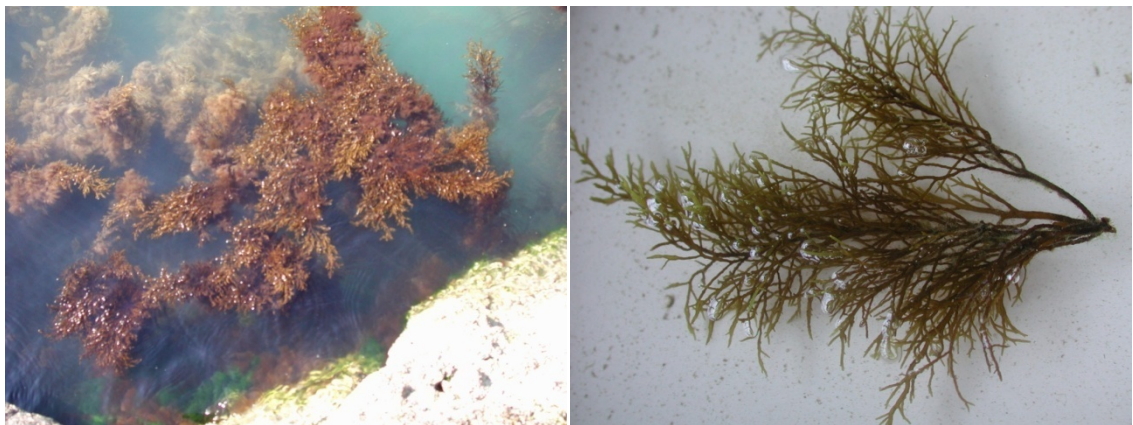


Fig.6: *Cystoseira barbata* (foto di Sfriso A.)



Dictyota dichotoma

Phylum: Heterokontophyta

Ordine: Dictyotales

Famiglia: Dictyotaceae

Genere: *Dictyota*

I suoi talli sono appiattiti, più o meno nastriformi e ad accrescimento apicale, alti fino a 20-30 cm (Fig.7). La sua forma è composta da lamine larghe da uno a pochi mm. In vivo presenta una colorazione bruno scuro o verde oliva e, sott'acqua, a blu elettrico per iridescenza. L'esemplare secco, invece, presenta una variazione di colore che va dal verde al giallo al bruno. Le fronde sono generalmente formate da tre o più strati di cellule. La superficie delle fronde è costituita da ciuffi di peli. Ha una ramificazione dicotomica regolare. Sono presenti rizoidi che terminano con un disco adesivo ed hanno la funzione di ancorare l'esemplare al substrato. Presenta un ciclo digenetico isomorfo e si riproduce in modo sessuale per oogamia. La troviamo generalmente su rocce o come epifita nella zona infralitorale. Presente nel golfo di Trieste e di Venezia, e più in generale, nei mari Mediterraneo, Adriatico e nel mar Rosso. È presente anche negli oceani Atlantico e Indiano. Il genere è usato in farmacia come antilipemico. Il suo principio attivo è l'acido alginico.



Fig.7: tallo di *Dictyota dichotoma* (foto di Sfriso A.)



Phylum: Rhodophyceae

Ordine: Bonnemaisoniales

Famiglia: Bonnemaisoniaceae

Genere: Asparagopsis

Fa parte della categoria delle alghe rosse. È chiamato anche “asparago marino” a causa della sua forma morfologica. *Asparagopsis taxiformis* è una macroalga cosmopolita. I suoi talli si trovano comunemente in ambiente sublitorale poco profondo. Il suo ciclo è trigenetico aplodiplofasico eteromorfo (le due fasi aploide e diploide sono diverse tra loro). Si ha l’alternanza di un macrotallo gametofitico e di un microtallo tetrasporofitico (Fig. 8) che, alle origini, era stato denominato *Falkenbergia hillebrandii* e si pensava fosse una specie distinta. I gametofiti hanno una struttura eretta e sono caratterizzati da un lungo stelo cilindrico molto ramificato e di forma piramidale. I talli sono di consistenza molle e flaccida, di dimensioni anche fino a 30 cm. La colorazione va dal rosso al rosa ma possono esserci anche esemplari con colorazioni che vanno dal verde al giallastro. I rami principali hanno una disposizione ad elica attorno all’asse e presentano un aspetto piumoso. Possono essere presenti anche dei corti ramuli spinosi uncinati o falciformi. I microtalli tetrasporofitici, invece, sono filamentosi e ramificati, raggruppati in ciuffi piumosi di forma sferica alti da 1 fino a 3 cm. Possono essere epifiti o epiliti. *Asparagopsis taxiformis* si riproduce sia in modo sessuato che in modo asessuato. I macrotalli gametofitici crescono su substrati duri e rocciosi ma si possono trovare anche come epifiti generalmente su alghe rosse coralline. La specie presenta un odore forte ed è nota come fonte di molti metaboliti secondari tossici che servono presubilmente come difesa contro il grazing. Queste sostanze sono principalmente alocarburi volatili (VHOC), in particolare bromocarburi.



Fig.8: gametofito di *A. taxiformis* e tetrasporofito (fase *Falkenbergia hillebrandii*) (foto di Armeli Minicante S.)

7.2 PROTOCOLLI PER L'ESTRAZIONE DI POLISACCARIDI

Alghe brune

Pesare in bilancia analitica circa 30gr di campione macinato. Per campioni in cui sono presenti pochi polisaccaridi incubare in soluzione di NaOH 2N (80g/l) ed essiccare in stufa a 60°C per 1 ora. L'NaOH aumenta la resa di ficocolloidi. I campioni vanno poi filtrati e lavati con acqua. Incubare in etanolo (EtOH) 100% e inserire in ultrasuoni per 30 min. Se il campione non è abbastanza compatto centrifugare (4000giri-10 min – T. ambiente) utilizzando delle falcon® e rimuovere il surnatante. Incubare il pellet in acetone 100% e inserire in ultrasuoni per 30 min. Centrifugare nuovamente per 10 min, recuperare il pellet e incubare in acqua bi-distillata. Essiccare in stufa a 70°C per una notte. L'etanolo e l'acetone servono per la depigmentazione dell'estratto mentre l'acqua bidistillata ha la funzione di estrarre il polisaccaride. Il giorno seguente centrifugare per 1h, recuperare il surnatante e precipitare in EtOH 96% (V/V). Attendere 15 minuti e recuperare il precipitato, se si ritiene necessario centrifugare per 10 min recuperare nuovamente il precipitato. Porre il polisaccaride estratto in cuvette di plastica e seccare in stufa a 40°C. Per conservare il polisaccaride è necessario inserirlo in una provetta dopo averlo accuratamente polverizzato con un mortaio e dopo averlo pesato per avere la resa finale.

Alghe rosse

Pesare in bilancia analitica circa 30gr di campione macinato. Incubare, se necessario, in NaOH 2N ed essiccare in stufa a 60°C per 1 h. Filtrare e lavare con acqua. Incubare il campione in EtOH 100% e inserire in bagno ad ultrasuoni per 30 min. Centrifugare per 10 min, rimuovere il surnatante, incubare in acetone 100% e inserire nuovamente in bagno ad ultrasuoni per 30 min. Recuperare il pellet e incubare in acqua bi-distillata. Essiccare in stufa a 40°C per una notte. Il giorno dopo centrifugare per 10 min, recuperare il surnatante e precipitare in EtOH 96% (V/V). Attendere 15 min recuperare il precipitato. Se si ritiene necessario centrifugare per 30 min e recuperare nuovamente l'estratto. Porre il polisaccaride in cuvette di plastica e seccare in stufa a 40°C.

Per conservare il polisaccaride è necessario inserirlo in una provetta dopo averlo accuratamente polverizzato con un mortaio e dopo averlo pesato per avere la resa finale.

7.3 STADI VITALI DI *AEDES ALBOPICTUS*



Fig.9: fasi di sviluppo di larva di *Aedes albopictus*



Fig.10: maschio adulto di *Aedes albopictus*



Fig.11: femmina adulta di *Aedes albopictus*

8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Ali M.Y.S., Ravikumar S., Beula J.M. (2013). Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 3(3): 196-201
- Abdel-Fattah A.F., Sary H.H.(1987). Selective isolation of glycoprotein materials from the green seaweed *Ulva lactuca*. *Pakistan Journal of Biochemistry* 20: 61-65
- Abourriche A., Charrouf M., Berrada M., Bennamara A., Chaib N., Francisco C. (1999). Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Fitoterapia* 70: 611-614
- Angelini R., Finarelli A.C., Angelini P., Po C., Petropulacos K., Macini P., Fiorentini C., Fortuna C., Venturi G., Romi R., Majori G., Nicoletti L., Rezza G., Cassone A. (2007). An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill* 12(36):pii=3260
- Andrieux C., Hibert A., Houari A.M., Bensaada M., Popot F., Szylit O. (1998). *Ulva lactuca*is poorly fermented but alters bacterial metabolism in rats inoculated with human faecal flora from methane and non-methane products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77:25–30
- Arasaki A. and Arasaki T.(1983). Low calories, high nutrition. Vegetables from the sea to help you look and feel better. Japan Publications Inc. 39-42
- Augier H., Santimoine M.(1978). Contribution a l'etude de la composition en azote total, en proteines et en acides amines proteiques des differentes parties du thalle de *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. dans le cadre de son exploitation industrielle et agricole. In *Bulletin the la Societe Phycology de France* 23: 19-28
- Badea V., Balaban D.P., Rapeanu G., Amariei C., Badea C.F. (2009). The antibacterial activity evaluation of *Cystoseira barbata* biomass and some alginates upon bacteria from oropharyngeal cavity. *Romanian Biotechnological Letters* 14(6): 4851-4857
- Bantoto V. and Dy D. (2013). The larvicidal activity of brown algae *Padina minor* (Yamada 1925) and *Dicyota linearis* (Greville 1830) against the dengue vector, *Aedes aegypti*(Linn 1762) (Diptera: Culicidae). *Journal of Vctor Borne Disease* 50: 68-70
- Benedict M.Q., Levine R.S., Hawley W.A., Lounibos L.P.(2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Disease* 7: 76–85
- Berteau O., and Mulloy B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13(6): 29R-40R
- Bobin-Dubigeon C., Lahaye M., BaryJ.-L. (1997). Human colonic bacterial degradability of dietary fibres from sea-lettuce (*Ulvasp*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 149–159

- Bonilauri P., Bellini R., Calzolari M., Angelini R., Venturi L., Fallacara F. (2008). Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emergent Infected Disease* 14(5): 852-4
- Bonizzoni M., Gasperi G., Chen X., James A.A. (2013). The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology* 29(9): 460-468
- Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H.G., Northcote P.T., Prinsep M.R. (2007). Marine natural products. *Natural Product Report* 24:31–86 (and previous reviews in this series)
- Burreson B.J., Moore R.E., Roller P.P. (1976). Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(4): 856-861
- Calzolari M. (2008). *Biologia ed etologia della zanzara tigre. Quali altri vettori potrebbero essere introdotti nel nostro paese.*
- Caminade C., Medlock J.M., Ducheyne E., McIntyre K.M., Leach S., Baylis M., Morse A.P. (2012). Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *Journal of the Royal Society* 9: 2708–2717
- Cancrini G., Frangipane di Regalbono A., Ricci I., Tessarin C., Gabrielli S., Pietrobelli M. (2003a). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary Parasitology* 118: 195-202
- Cancrini G., Romi R., Gabrielli S., Toma L., Di Paolo M., Scaramozzino P. (2003b). First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Medical Veterinary Entomology* 17: 448-451
- Centre d'Etude et de Valorisation des Algues (CEVA)
- Chantraine J.M., Laurent D., Ballivian C., Saavedra G., Iban̄ez R., Vilaseca L.A. (1998). Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. *phytotherapy research* 12: 350–354
- Cheng S.S., Chang H.T., Chang S.T., Tsai K.H., Chen W.J. (2003). Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology* 89: 99-102
- Ciccia C., Coussio J., Mongelli E. (2000). Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacol* 72: 185-189
- Coley P., Byrant J., Chapin F. (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230: 895–9
- Cornel A.J., Hunt R.H. (1991). *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *Journal of the American Mosquitos Control Association* 7: 107–108

- Costa L.S., Fidelis G.P., Cordeiro S.L., Oliveira R.M., Sabry D.A., Camara R.B.G., Nobre L.T.D.B., Costa M.S.S.P., Almeida-Lima J., Farias E.H.C., Leite E.L., Rocha H.A.O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64: 21-28
- Dalla Pozza G., Majori G. (1992). First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquitos Control Association* 8:1-3
- De Paula J.C., Vallim M.A., Teixeira L.V. (2011). What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(2): 216-228
- Dohm D.J., Logan T.M., Barth J.F., Turell M.J. (1995). Laboratory transmission of Sindbis virus by *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 32: 818-21
- Dutto M. (2009). Prima segnalazione certa di *Aedes albopictus* (Skuse, 1897) (Diptera, Culicidae) in provincia di Cuneo (Piemonte, Italia). *Biologia Ambientale* 23 (1): 33-5
- Dworjanyn S.A., de Nys R Steinberg P.D. (1999). Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra* *Marine Biology* 133:727–736
- Elbanna S.M., Hegazi M.M. (2011). Screening of some seaweeds species from South Sinai, Red Sea as potential bioinsecticides against mosquito larvae, *Culex pipiens*. *Egyptian journal of biological sciences* 4(2): 21-30
- Ekdahl A., Pedersen M., Abrahamsson K. (1998). A study of the diurnal variation of biogenic volatile halocarbons, *Marine Chemistry* 63: 1–8
- Fleurence J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*. 10: 25-28
- Fujiwara-Arasaki T., Mino N., Kuroda M. (1984). The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia* 116/117: 513-516
- Gasperi G., Bellini R., Malacrida A.R., Crisanti A., Dottori M., Aksoy S. (2012). A new threat Looming over the Mediterranean basin: emergence of viral diseases transmitted by *Aedes albopictus* mosquitoes. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6:1836
- Goodwin K. D., North W.J., Lindstrom M. E. (1997). Production of bromoform and dibromomethane by giant kelp: Factors affecting release and comparison to anthropogenic sources. *Limnology and Oceanography* 42: 1725–1734
- Hales S., Wet N., Maindonald J., Woodward A. (2002). Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. *Lancet* 360: 830-834
- Hawley W.A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquitos Control Association*. Supplement 4:2-39

- Haug A. (1976). The influence of borate and calcium ion on the gel formation of a sulfated polysaccharide from *Ulva lactuca*. *Acta Chemica Scandinavica* 30(6):562–566
- Ivanova V., Rouseva R., Kolarova M., Serkedjieva J., Rachev R., Manolova N. (1994). Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. *Preparative Biochemistry* 24: 83–97
- Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs* 9:196–223
- Kiran S.R., Bhavani K., Devi P.S., Rao B.R.R., Reddy K.J. (2006). Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour. Technology* 97: 2481–2484
- Lahaye M., Ray B., Baumberger S., Quemener B., Axelos M. A. V. (1996). Chemical characterisation and gelling properties of cell-wall polysaccharides from species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Hydrobiologia* 326/327:473–480
- Lahaye M., Ray B., Inizan F., Brunel M., Bobin-Dubigeon C., Quemener B. (1998). In F. Guillon, R. Amado, M. T. Amaral-Collac, O. H. Anderson, N. G. Asp, K. E. Bach Knudsen, M. Champ, J. Mathers, J. A. Robertson, I. Rowland, & J. Van Loo (Eds.), *Functional properties of non-digestible carbohydrates* (pp. 32–45). France, Nantes: INRA
- Lee J. B., Hayashi T., Sankawa U., Maeda M. (1999). Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. *Planta Medica* 65:439–441
- Lim C., Lee J., Cho Y. (2000). Structures and some properties of the antimicrobial compounds in the red alga *Symphyclocladia latiuscula*. *Han'guk Susan Hakhoechi* 33: 280–287
- Maeda M., Uehara T., Harada N., Sekiguchi M., & Hiraoka A. (1991). Heparinoid-active sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta. *Phytochemistry* 30:3611–3614
- Magalhães L.A.M., Lima M.P., Marques M.O.M., Facanali R., Pinto A.C.S., Tadei W.P. (2010). Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. *Molecules* 15: 5734–5741
- Mao W., Li H., Li Y., Zhang H., Qi X., Sun H., Chen Y., Guo S. (2009). Chemical characteristics and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). *International Journal of Biological Macromolecules* 44: 70–74
- Manilal A., Sujith S., Kiran G., Selvin J., Shakir C., Gandhimathi R., Panikkar M. (2009). Biopotentials of seaweeds collected from south-west coast of India. *Journal of Marine Science and Technology* 17 (1): 67–73
- Marti R., Uriz M.J., Turon X. (2004). Seasonal and spatial variation of species toxicity in Mediterranean seaweed communities: Correlation to biotic and abiotic factor. *Marine. Marine Ecology Progress Series* 282:73–85

- Manilal A., Sujith S., Seghal Kiran G., Selvin J., Shakir C., Gandhumathi R., Lipton A.P. (2009). Antimicrobial potential and seasonality of red algae collected from the southwest coast of India tested against shrimp, human and phytopathogens. *Annals of Microbiology* 59(2): 207-219
- Massebo F., Tadesse M., Bekele T., Balkew M., Gebre-Michel T. (2009). Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology* 8: 4183-4188
- McHough D.J. (2002). Prospects for seaweed production in developing countries. FAO Fisheries Circular 968
- Medlock J.M., Hansford K.M., Schaffner F., Versteirt V., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W. (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne Zoonotic* 12: 435–447
- Mitchell C.J. (1995a). Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *Journal of Vector Ecology* 20: 44-58
- Moore R.E. (1976). Volatile compounds from marine algae. *Accounts of Chemical Research* 40-47
- Moore C.G. e Mitchell C.J. (1997). *Aedes albopictus* in the United States: Ten-Year Presence and Public Health Implications. *Emerging Infectious Diseases* 3:329-334
- Moore C.G. (1999). *Aedes albopictus* in the United States: current status and prospects for further spread. *Journal of the American Mosquitoes Control Association* 15:221-227
- Na Y.S., Kim W.J., Kim S.M., Park J.W., Lee S.M., Kim S.O., Synytsya A., Park Y.I. (2010). Purification, characterization and immune stimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *International Immunopharmacology* 10: 364-370
- Noda H., Amano H., Arashime K., Nisizwa K. (1990). Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia* 204/205:577–584.
- Oumaskour K., Boujaber N., Etahiri S., Assobhei O. (2013). Anti-inflammatory and antimicrobial activities of twenty-three marine red algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida-Marocco). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(3): 145-149
- Paupy C., Delatte H., Bagny L., Corbel V., Fontenille D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infection* 11: 1177–1185
- Peng Z., Beckett A.N., engler R., Hoffman D.R., Ott N., Simons F.E.R. (2004). Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (5): 1189-94

- Percival E., McDowell R.H.(1967).Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. Academic Press, New York pp219
- Percival E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycology Journal* 14:2
- Plouguernè E., Ioannou E., Georgantea P., Vagias C., Roussis V., Hellio C., Ktaffe E., Stiger-Pouvreau V. (2010). Anti-microfouling Activity of Lipidic Metabolites from the Invasive Brown Alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Marine Biotechnology* 12: 52-61
- Polivka T and Sundstrom V. (2004). Ultrafast dynamics of carotenoids excited states from solution to natural and artificial systems. *Chemical reviews* 104: 2021-2071
- Ponce N.M., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L., Stortz C.A. (2003). Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies.*Carbohydrate Research* 338: 153-165
- Poonguzhali T.V., Nisha L.J. (2012). Larvicidal activity of two seaweeds, *Ulva fasciata* and *Grateloupia lithophila* against mosquito vector, *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Current Science* 4: 163.168
- Reiter P. (1998). *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come. *Journal of the American Mosquitos Control Association* 14:83-94
- Renn D.W. (1990).Seaweeds and biotechnology — inseparable companions. *Hydrobiologia* 204/205: 7-13
- Ren D. (1997). Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. *Trends in Biotechnology* 15: 9-14
- Rezza G., Nicoletti L., Angelini R., Romi R., Finarelli A.C., Panning M., Cordioli P., Fortuna C., Boros S., Magurano F., Silvi G., Angelini P., Dottori M., Ciufolini M.G., Majori G.C., Cassone A. (2007). Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*, 370(9602): 1840-6
- Rinaudo M. (2007). Seaweed polysaccharides. In: Kalmerling JP (ed) *Comprehensive glycoscience from chemistry to systems biology*, vol 2. Elsevier, London pag. 691–735
- Robinson W.H. (2005). *Urban Insects and Arachnids. A Handbook of Urban Entomology.* Cambridge University Press
- Romi R., Pontuale G., Sabatinelli G.(1997). Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimmaginali (Diptera, Culicidae). *Fragmentaenomologica* 29: 1-141
- Romi R, (2001). *Aedes albopictus* in intalia: un problema sanitario sottovalutato. *Annali-Istituto Superiore di Sanità* 37(2): 241-247
- Rossi G.C., Pascual N.T., Krsticevic F.J. (1999). First record of *Aedes albopictus* (Skuse) in Argentina. *Journal of the American Mosquitos Control Association* 15(3):422

- Ruperez P., Ahrazem O., Leal A. (2002). Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 840-845
- Sabatini A., Raineri V., Trovato G., Coluzzi M. (1990). *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. *Parassitologia* 32:301-4.
- Salvador N., Garreta A.G., Lavelli L., Ribera M.A. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina* 71(1): 101-113.
- Sand R.E and Glickmans M. (1973). Seaweed extracts of potential economic importance. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their derivatives*. Whistler R.L., Ed. Academic Press. New York 147-194
- Sandford P.A and Baird J. (1983). Industrial utilization of polysaccharides. *The polysaccharides*. Aspinall G.O., Eds. Academic Press. New York 2: 411-490
- Schafner F., Medlock J.M., Van Bortel W. (2013). Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 19: 685–692
- Schmitt T.M., Hay M.E., Lindquist N. (1995). Constraints on chemically mediated coevolution: multiple functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology* 76(1): 107-123
- Selvin, J., Huxley, A.J., and Lipton, A.P. (2004). Immunomodulatory Potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. *Aquaculture* 230: 241-248 (2004)
- Selvin J., Lipton A.P. (2004). Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of india. *Journal of Marine Science and Technology* 12(1): 1-6.
- Selby H. H., Wynne W.H. (1973). Agar. *Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives*, 2nd. Edition. R.L. Whistler. Academic Press, New York 29-48
- Shroyer D. (1986). *Aedes albopictus* and arboviruses: A concise review of the literature. *Journal of the American Mosquitos Control Association* 2: 424-428
- Simard F., Nchoutpouen E., Toto J.C., Fontenille D. (2005). Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *Journal of Medical Entomology* 42: 726-731
- Stratmann K., Boland W., Muller D.G. (1992). Pheromones of marine brown algae: a new branch of eicosanoid metabolism. *Angewandte Chemie International Edition* 31:1246–1248
- Synytsya A., Kim W.J., Kim S.M., Pohl R., Synitsya A., Kvasnicka F., Copikova J. (2010). Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydrate Polymers* 81: 41-48
- Tatem A., Hay S.I., Rogers D.J. (2006). Global traffic and disease vector dispersal. *Proceeding of the National Academy of Sciences. U.S.A* 103: 6242–6247

- Thiboutot M., Kannan S., Kawalekar O.U., Shedlock D.J., Khan A.S., Saragan G., Srikanth P., Weiner D.B., Muthumani K. (2010). Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? *PLoS Negl Trop Dis* 4(4):e623
- Towle G.A. (1973). Carrageenan. *Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives*. Whistler R.L. Academic Press, New York 83-114
- Tseng C.K.J. (2001). Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology* 14: 375-380
- Urhahn T and Ballschmiter K. (1998). Chemistry of the biosynthesis of halogenated methanes: C1-organohalogenes as pre-industrial chemical stressors in the environment. *Chemosphere* 37: 1017–1032
- Vazeille M., Jeannin C., Martin E., Schaffner F., Failloux A.B. (2010). Chikungunya: A risk for Mediterranean countries? *Acta Tropica* 105:200–202f
- Weinstein B., Rold T.L., Harrell C.E., Burns III M.W., Waaland J.R. (1975). Reexamination of the bromophenols in the red alga *Rhodospira laris*. *Phytochemistry* 14: 2667-2670
- Wu J.Y., Lun Z.R., James A.A., Chen X.G. (2010). Dengue fever in mainland China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 664–671
- Ye H., Wang K., Zhou C., Liu J. & Zeng X. (2008). Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry* 111: 428-43

Siti internet consultati:

www.myfcph.org

www.merial.ca

www.glycomix.co

www.wikipedia.it

www.fao.org

www.biogents.com

www.imgarcade.com

www.zoomuseum.net

www.corila.it

www2.units.it

www.ecdc.europa.eu

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio particolarmente il mio relatore Adriano Sfriso e le mie due correlatrici Simona Armeli Minicante e Sara Carlin che mi hanno seguito in questa nuova esperienza.

Un grazie particolare alla dottoressa Gioia Capelli e al dottor Fabrizio Montarsi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, per avermi dato la possibilità di usufruire dei loro laboratori e per avermi aiutato e indirizzato nella stesura finale dell'elaborato.

Grazie alla mia famiglia, che ha sempre creduto in me e mi ha sostenuta. Senza di loro, oggi, non sarei quella che sono diventata.

Ringrazio i miei amici più cari: Francesca, Angelika, Alice, Sofia, Cristina, Paola, Enrico, Andrea, Alessandro, Elena, Sara, Ilenia e tutti gli altri, per i bei momenti passati assieme, per la loro amicizia, i loro preziosi consigli e per essermi sempre vicino.

Un ringraziamento particolare va alla mia cagnolina, nuova compagna di avventure, e ai miei due angeli a quattro zampe che porterò sempre nel mio cuore.

Infine il mio grazie va anche ad una persona per me speciale, che mi sta dando la forza giorno dopo giorno per affrontare tutto anche nei momenti peggiori e riesce sempre a strapparmi il sorriso.