

Feromoni - biološka važnost i spektroskopska karakterizacija

Marković, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:232541>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Iva Marković
0058222122

**FEROMONI – BIOLOŠKA VAŽNOST I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Organska kemija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Feromoni – biološka važnost i spektroskopska karakterizacija

Iva Marković, 0058222122

Sažetak:

Feromoni su složeni organski spojevi koji su odgovorni za komunikaciju između pripadnika iste vrste. U početku su bili definirani kao kemijski spojevi koji su odgovorni samo za spolno privlačenje insekata, međutim danas su poznate još mnoge druge uloge kao što su agregacija (združivanje), društvena hijerarhija, upozoravanje na opasnost, obilježavanje puta do hrane i dr. Karakteristični su za cijeli živi svijet, a budući da imaju široko područje djelovanja karakterizira ih i velika strukturna raznolikost – od malih hlapljivih molekula do velikih proteinskih kompleksa. Omjer komponenata feromonske smjese izravno je vezan uz učinak feromona. Izoliraju se iz organizama ili kemijski sintetiziraju, a unatoč velikoj strukturnoj raznolikosti, da bi komunikacija između vrsta bila uspješna nužno je da signal u obliku feromona bude odgovarajuće strukture, konformacije i kiralnosti.

Njihova detekcija i karakterizacija se vrši pomoću raznih spektroskopskih metoda poput ultraljubičaste (UV) i infracrvene (IR) spektroskopije te spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR), kao i najčešće korištene spregnute tehnike plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Ključne riječi: feromoni, agregacija, privlačenje, struktura, spektroskopija

Rad sadrži: 25 stranica, 14 slika, 1 shemu, 31 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 16. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Pheromones – biological significance and spectroscopic characterization

Iva Marković, 0058222122

Abstract:

Pheromones are complex organic compounds that are responsible for communication between members of the same species. Originally, they were defined as chemical compounds responsible only for the sexual attraction of insects, but today many other functions are known, such as aggregation, social hierarchy, warning of danger, marking the way to food, etc. They are characteristic of the entire living world, and since they have a broad field of activity, they are characterized by a great structural diversity - from small volatile molecules to large protein complexes. The ratio of the components of the pheromone mixture is directly related to the effect of the pheromone. They are isolated from organisms or chemically synthesized, and despite the great structural diversity, it is necessary for successful communication between species that the signal in the form of pheromones has the appropriate structure, conformation and chirality.

Their detection and characterization is carried out using various spectroscopic methods such as ultraviolet (UV) and infrared (IR) spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR) and the most commonly used mass spectroscopy in combination with gas chromatography (GC-MS).

Keywords: pheromones, aggregation, attraction, structure, spectroscopy

Thesis contains: 25 pages, 14 figures, 1 scheme, 31 reference

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Associate Professor Monika Kovačević

Thesis defended: July 16, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FEROMONI.....	2
2.1.1. OTKRIĆE FEROMONA	3
2.1.2. STRUKTURA FEROMONA	4
2.1.3. PODJELA FEROMONA.....	6
2.2. BIOLOŠKA DOSTUPNOST I ULOGA FEROMONA	9
2.2.1. INSEKTI	9
2.2.2. SISAVCI.....	11
2.2.3. LJUDI.....	12
2.3. IZOLACIJA I SINTEZA FEROMONA	12
2.3.1. ALARMNI FEROMON (TRANS-B-FARNEZEN) IZ LISNE UŠI	12
2.3.2. AGREGACIJSKI FEROMON IZ TERMITA <i>RETICULITERMES SPERATUS</i>	14
2.4. DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA FEROMONA.....	15
2.4.1. PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA	15
2.4.2. MASENA SPEKTROSKOPIJA (DART, MALDI, LDI I ESI)	16
2.4.3. <i>ONLINE</i> METODE ZA DETALJNIJU ANALIZU STRUKTURE.....	18
2.4.4. PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA POVEZANA SA DETEKCIJOM ELEKTROANTENOGRAMA (GC-EAD)	18
2.4.5. NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCA (NMR)	19
3. ZAKLJUČCI	20

4.POPIS LITERATURE22

1. UVOD

Feromoni su kemijski spojevi koji omogućavaju komunikaciju između pripadnika živoga svijeta. Izlučuje ih jedinka u obliku različitih sekreta pri čemu izaziva specifičan odgovor kod jedinke iste vrste. Karakteristični su za cijeli živi svijet, a njihovo djelovanje posebno je istraženo na kukcima. U isto vrijeme njihova aktivnost i postojanje kod ljudi još uvijek nije dovoljno istraženo.

Najčešće se njihovo djelovanje veže uz upozoravanje drugih jedinki na opasnost, obilježavanje puta do hrane, spolno privlačenje, agregaciju tj. združivanje (npr. mravinjaci), društvenu hijerarhiju (npr. matica i *radnici*) i prepoznavanje srodnika te kontroliranje ponašanja kukaca parazita (kod biljaka). Životinje ih izlučuju pomoću specijaliziranih žlijezda ili su prisutni u sklopu drugih tjelesnih izlučevina. Nadalje, životinje detektiraju feromone pomoću vomeronazalnog organa (VNO) koji je smješten u prednjoj nosnoj šupljini i sadrži bipolarne receptorske stanice. Poznato je da VNO ili Jakobsonov organ postoji i kod ljudi te da je smješten između nosa i usta. VNO se u embrionalnoj fazi potpuno razvija, tijekom rasta zakržlja, no aktivira se s vremena na vrijeme kao npr. nakon poroda kod majke i bebe, kod biranja partnera i pri udahu eteričnih ulja.

Budući da imaju široko područje djelovanja, karakterizira ih i velika strukturna raznolikost – od malih hlapljivih molekula do velikih proteinskih kompleksa. Omjer komponenata feromonske smjese izravno je vezan uz učinak feromona. Unatoč velikoj strukturnoj raznolikosti, da bi komunikacija između vrsta bila uspješna, nužno je da signal u obliku feromona bude odgovarajuće strukture, konformacije i kiralnosti.

Cilj ovoga Završnoga rada bio je istražiti i opisati feromone, njihovu strukturu, podjelu, biološku dostupnost i djelovanje te opisati načine izolacije, sinteze i detekcije feromona pomoću raznih spektroskopskih metoda poput ultraljubičaste (UV) i infracrvene (IR) spektroskopije, spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i najčešće korištene spregnute tehnike plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

2. TEORIJSKI DIO

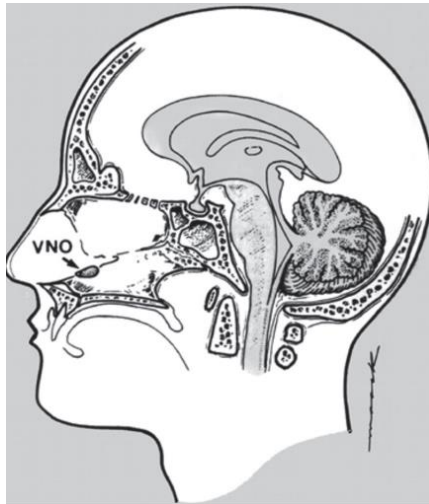
2.1. Feromoni

Feromoni su složeni organski spojevi koji služe za komunikaciju između pripadnika iste vrste [1]. Riječ *feromon* dolazi od starogrčkih riječi *pherein* što znači *prenijeti* i *hormones* što znači *uzbuditi* [2]. U početku su bili definirani kao kemijski spojevi koji su odgovorni samo za spolno privlačenje insekata, međutim, danas je poznato da su važni za cijelo životinjsko carstvo [3]. Izlučuje ih jedinka izazivajući pri tome poseban odgovor kod druge jedinke iste vrste. Životinje ih izlučuju pomoću specijaliziranih žlijezda ili mogu biti prisutni u sklopu njihovih drugih tjelesnih izlučevina [4].

Njihovo djelovanje obuhvaća različite vrste reakcija koje su vezane uz upozoravanje na opasnost, obilježavanje puta do hrane, spolno privlačenje, agregaciju tj. združivanje (mravi, termi), društvenu hijerarhiju i prepoznavanje srodnika, te kontroliranje ponašanja kukaca parazita (kod biljaka). S obzirom da su insekti jako rasprostranjeni, veliki broj životinja oponaša ovakve tipove njihove kemijske komunikacije da bi privukli plijen ili oprašivače. Primjerice, neke vrste orhideja izgledaju i mirišu isto kao različite vrste moljaca kako bi privukle oprašivače [1, 5]. Danas je poznata upotreba feromona u primjeni feromonskih mamaca za otkrivanje kretanja nametnika i kao takvi mogu prodnijeti smanjenju upotrebe insekticida [6].

Postojanje feromona kod ljudi još uvijek je nedovoljno istraženo. Postoje neka istraživanja koja potvrđuju da ljudski hormoni dobiveni iz aksilarnog znoja i suza imaju utjecaj na lučenje različitih hormona, ovulaciju, privrženost prema partnerima, raspoloženje i sinkronizaciju menstrualnog ciklusa kod *cimerica*, ali postoje i ona koja to opovrgavaju [3].

Primjerice, poznato je da Jakobsonov organ ili vomeronazalni organ (VNO) (slika 1) koji se nalazi u vomer kosti (između nosa i usta) postoji i kod ljudi, a njime se detektiraju feromoni koje luče ostali sisavci, te se osjete npr. eterična ulja. Jacobsonov organ sadrži senzorne neurone u unutrašnjosti koji su zaduženi za otkrivanje različitih kemijskih spojeva. Kod odraslih ljudi, vomeronazalni organ javlja se samo djelomično, kao nedovoljno razvijen organ koji nije u potpunosti u funkciji. Smatra se da se on u embrionalnom periodu u potpunosti razvije, ali kasnije zakržlja. Ipak, aktivira se s vremena na vrijeme, pa su odlični primjeri aktivacije nakon poroda kod majke i bebe, te kod biranja partnera (pretpostavlja se da se partnera/ica 'namirišu') i naravno pri udahu eteričnih ulja.



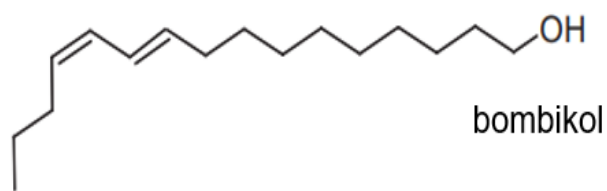
Slika 1. Jakobsonov organ ili vomeronazalni organ (VNO), smještaj kod ljudi (*prema 1*)

Životinje poput vodozemaca, gmazova i nekih sisavaca feromone detektiraju preko VNO koji je smješten u prednjoj nosnoj šupljini i sadrži bipolarne receptorske stanice. Kod fetusa čovjeka, dokazana je prisutnost VNO i bipolarnih receptorskih stanica, ali kako je prije navedeno, oni nakon rođenja ne pokazuju aktivnost. Geni koji kodiraju za proteinske receptore su pseudogeni, stoga translacijom ne nastaje funkcionalni protein koji se može detektirati kao receptor. Međutim, neki feromoni se kod neljudskih sisavaca detektiraju putem osjetila za njih. Budući da su ljudska osjetila jednako dobro razvijena, slično bi se moglo pretpostaviti i za ljude, iako je kod ljudi osjetilo za njih poznato kao najmanje važno [7]. Glavni olfaktorni epitel mogao bi biti odgovoran za otkrivanje ljudskih feromona jer ljudski mirisni receptori detektiraju androgene iz znoja za koje se pretpostavlja da djeluju kao feromoni [3].

2.1.1. Otkriće feromona

Adolf Butenandt i suradnici su identificirali feromone prvi put 1959. godine, a prvi kemijski identificirani feromon nazvan je bombikol – spolni feromon ženke dudova svilca (*Bombyx mori*) koji pruža informaciju o dostupnosti i lokaciji ženke (slika 2). Timu je bilo potrebno dvadeset godina da prikupe dovoljnu količinu uzoraka abdominalnih žlijezdi 500 000 ženki dudova svilca i provedu istraživanje. Nakon provedene frakcijske destilacije, dio svake frakcije razrijeđen je i testiran na sposobnost da privuče mužjake što se detektiralo lepršanjem krila kod mužjaka. Ustanovljeno je da je koncentracija od 200 molekula/cm³ dovoljna da privuče mužjake. Danas bi uzorak izuzet iz jedne ženke bio dovoljan za analizu spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Ovaj biološki test koji se sastoji od frakcijske destilacije i praćenja bihevioralnog odgovora ostao je uobičajeni način identifikacije mnogih feromona. Primjerice, na isti način ustanovljen je da 2-metilbut-2-enal

predstavlja feromon iz zečje dojke, a kao bihevioralnim odgovorom smatralo se sisanje mladunčeta. Naravno, ovim testom ne utvrđuje se postojanje svih feromona, pa identifikacija ostalih feromona zahtjeva drukčije vrste bioloških testova koji imaju fiziološke učinke [5, 8].



Slika 2. Prikaz strukture bombikola (*prema 1*)

2.1.2. Struktura feromona

Feromone karakterizira velika strukturna raznolikost koja uključuje male hlapljive molekule, derivate steroida, masne kiseline, peptide i velike komplekse protein-ligand [3]. Kao glavne molekule navode se ugljikohidrati (linearni ili razgranati), esteri masnih kiselina, alkoholi, kiseline, epoksidi, ketoni, terpeni, trigliceridi. Unatoč velikoj strukturnoj raznolikosti, da bi komunikacija između vrsta bila uspješna, nužno je da signal u obliku feromona bude odgovarajuće strukture, konformacije i kiralnosti [1].

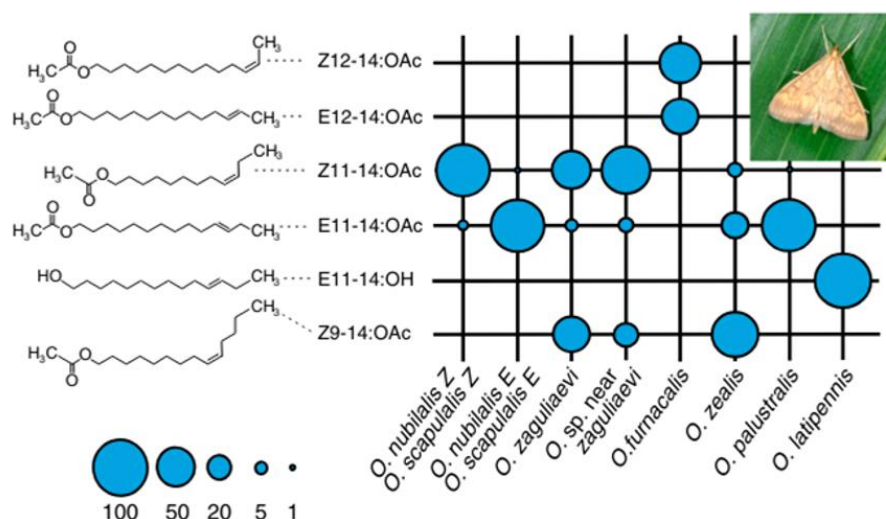
Biosinteza feromona insekata započinje iz sličnih prekursora, uglavnom iz masnih kiselina i izoprena, a najčešće modifikacije obuhvaćaju dodavanje funkcijskih skupina alkohola, aldehida, acetata, epoksida ili ketona, pripajanje razgranatih aminokiselina ili masnih kiselina ili promjene u stereokemiji molekula. Primjerice, agregacijski je tip feromona kod insekata evoluirao, ali većinom se sastoji od sličnih komponenti. Kod resokrilaca sadržava estere, kod stjenica smjesu hlapljivih spojeva koji sadržavaju sumpor, aldehide i ketone, kod pčela i osa hlapljive terpenoide, kod moljaca hlapljive ketone, aldehide, monoterpene i alkohole. Kornjaši koriste različitu smjesu spojeva kao agregacijski feromon ovisno o taksonomskoj skupini, tako da crvene brašnjare sadržavaju hlapljive aldehide, potkornjaci većinom terpenoide, a strizibube smjesu ketona, alkohola, terpenoide i aromatskih komponenti [9].

Kod termita *Reticulitermes speratus* prisutan je višekomponentni agregacijski feromon koji se sastoji od dva duga alifatska ugljikovodična lanca (C25 i C27), dviju masnih kiselina (palmitinska i *trans*-vaccenska kiselina), aromatskih komponenti (2 fenilna prstena C11) i kolesterola. Svaka od ovih komponenti samostalno ima učinak okupljanja jedinki u kratkom vremenu, ali sinergističkim djelovanjem pojačava se njihova aktivnost privlačenja. Uz ova

četiri glavna sastojka, također su prisutni nestabilni aldehidi, esteri, ketoni i terpenoidi koji pojačavaju agregacijski učinak. Ustanovljeno je da se u odsustvu feromona, termiti slobodno kreću i zaustavljaju, dok u slučaju kad su neke od navedenih feromonskih komponenti prisutne, termiti se okupljaju i zadržavaju oko njih. Važno je spomenuti da kraći ugljikovodični lanci ili *cis* izomer vakcenske kiseline ne bi imali isti učinak, stoga je važno osigurati specifičnost ovih molekula [9].

Budući da se biosinteza spojeva koji se koriste kao feromoni insekata (alkoholi, aldehidi, esteri, ugljikovodici, karboksilne kiseline i terpeni) provodi preko metaboličkih putova lipida, osnovne strukture agregacijskog feromona sintetiziraju se iz lipidnih derivata, a dodavanjem odbijajućih spojeva (jedinствене strukture npr. aromatska struktura) na osnovnu strukturu osigurava se razlikovanje od feromona drugih vrsta [9].

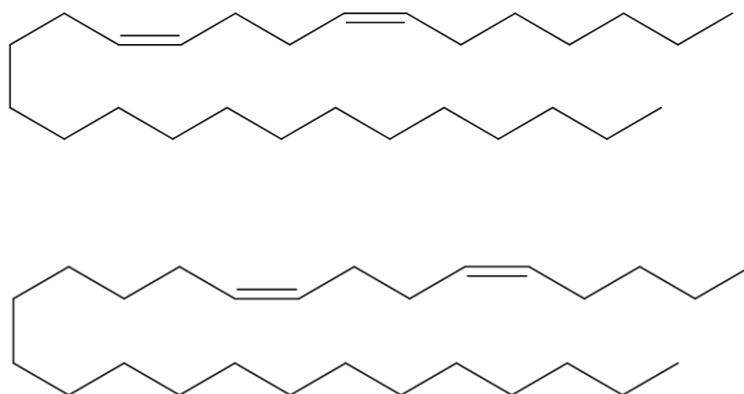
Feromoni su uglavnom smjesa molekula specifičnog omjera, ali neke vrste primaju signal u obliku samo jednog izomera, dok druge vrste pak na temelju omjera komponenti u smjesi feromona raspoznaju ne samo svoju vrstu, nego i druge populacije unutar vrste kao što su kaste, kolonije, rodbinske grupe i sl. To je važno jer se promjenom omjera komponenti, signal koji pojedinac prima može promijeniti. Kako je vidljivo iz primjera na slici 3., većina feromona specifična je mješavina molekula pa tako različite vrste kukuruznog moljca *Ostrinia* dijele različite kombinacije i koncentracije šest molekula.



Slika 3. Višekomponentni sastav feromona (prema 8)

Prisutnost i položaj dvostruke veze, kiralnost, duljina lanca i derivatizacija s drugim molekulama znatno utječu na kemijsku raznolikost feromona, ali i na njihovu funkcionalnu specifičnost [1]. Položaj dvostruke veze među srodnim vrstama može se značajno razlikovati, a biti presudan za funkcionalnost. Tako ženski afrodizijak vinske mušice *D.*

melanogaster heptakozadien sadrži konstitucijske izomere: kozmopolitske populacije proizvode (Z,Z)-7,11-heptakozadien (slika 4., *gore*), dok afričke i karipske populacije proizvode (Z,Z)-5,9-heptakozadien (slika 4., *dolje*) [10]. Mala razlika u strukturi, kao što pokazuje ovaj primjer, može značajno utjecati na diskriminaciju partnera.



Slika 4. Prikaz strukture (Z, Z)-7,11-heptakozadiena (*gore*) i (Z, Z)-5,9-heptakozadiena (*dolje*)

Apsolutna konfiguracija također je važna za aktivnost feromona. Konfiguracijski izomeri (*R*) i (*S*) često nemaju jednaku aktivnost [1]. Primjerice, feromon muhe masline (*Bactrocera oleae*) olean aktivan je kao (*R*)-izomer za mužjake, a kao (*S*)-izomer za ženke [11]. Također, kod mrava rezača lišća (*S*)-4-metil-heptan-3-on, feromon koji se izlučuje kao alarm u opasnosti, djelotvorniji je 400 puta od (*R*)-izomera [12]. Zanimljivo je da prirodna konfiguracija feromona nema uvijek najdjelotvorniji učinak [1].

Različite duljine ugljikovodičnih lanaca nemaju jednako djelovanje, pa već spomenuti C25 i C27 lanci iz *Reticulitermes speratus* imaju agregacijski učinak, dok je ustanovljeno da bi kraći lanci manje pridonosili istom [9].

Aktivnost feromona također je određena udjelom drugih molekula u smjesi i njihovim međusobnim interakcijama. Na primjer, egzobrevikomin, agregacijski hormon kornjaša zapadnog bora *Dendroctonus brevicomis* pokazuje najveću aktivnost u kombinaciji dvaju bicikličkih acetala: (1*R*, 5*S*, 7*R*) egzobrevikomina i (1*S*, 5*R*)-frontalina [13].

2.1.3. Podjela feromona

Budući da su feromonske molekule strukturno vrlo raznolike, podjela feromona vrši se prema njihovom djelovanju. Postoje četiri glavne grupe feromona:

- otpuštajući,
- signalni,
- modulirajući i
- primarni.

Osim njih, navedene se još neke obzirom na to tko ih otpušta i koja je njihova funkcija.

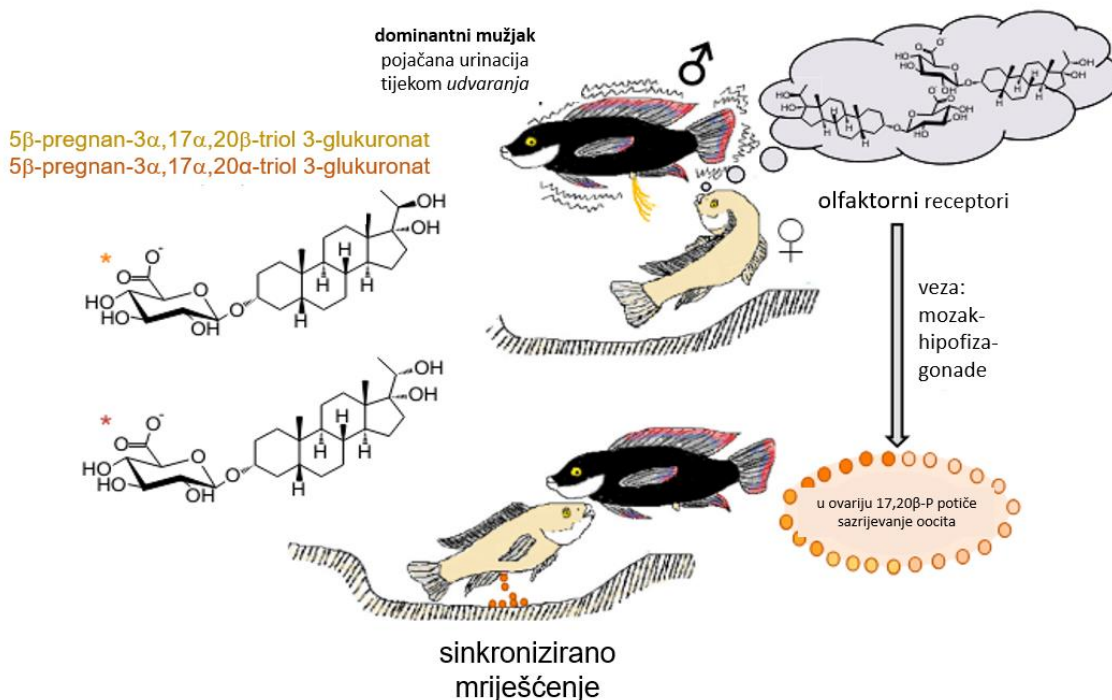
Otpuštajući feromoni izazivaju vrlo brze specifične odgovore i imaju najveći utjecaj na ponašanje životinja. Primjer otpuštajućega feromona bio bi androstenon (5α -androst-16-en- 3α -on) koji otpuštaju veprovi, a kod ženki izaziva spremnost na parenje.

Signalni feromoni su većinom odgovorni za prijenos informacija vezan uz društveni poredak i dostupnost hrane, pružaju informacije o pojedincu u populaciji – njegovom položaju i nedavnoj ishrani. Također su važni za odabir partnera.

Modulirajući feromoni imaju utjecaj na neuropsihološka stanja tj. raspoloženje i osjećaje, no kod životinja su teško mjerljivi, stoga su istraživanja modulirajućih feromona uglavnom vezana za ljude.

Primarni feromoni djeluju na neuroendokrini sustav koji je, između ostalog, povezan s razvojem i reproduktivnosti uključujući menstrualni ciklus [7]. Promjene koje oni uzrokuju su dugotrajne [3].

Primjerice, spolni feromoni u urinu dominantnih mužjaka mozambičke tilapije (*Oreochromis mossambicus*) odvrćaju podređene mužjake, privlače ženke i pokreću ovulaciju kod ženki (slika 5). Primjeri su to učinaka otpuštajućih i primarnih feromona. U mokraći dominantnih mužjaka u velikoj količini proizvode se dva steroidna glukuronata (5β -pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\beta$ -triol-3-glukuronat i njegov 20α -epimer) koji djeluju na specifične olfaktorne receptore kod žena i induciraju proizvodnju i otpuštanje glavnog hormona $17,20\beta$ -dihidroksipregn-4-en-3on ($17,20\beta$ -P) koji potiče sazrijevanje jajnih stanica kod ženki [8].



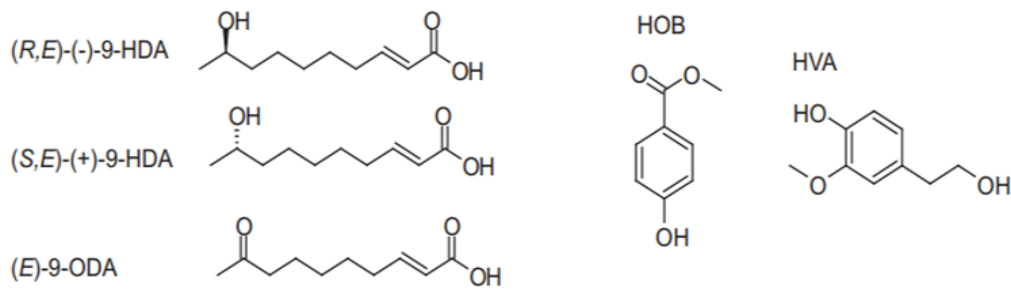
Slika 5. Višestruko djelovanje feromona kod mužjaka mozambičke tilapije (*prema 8*)

Također, skupina feromona koja putem mirisa ima utjecaj na endokrini sustav nazivaju se početni feromoni. Od otpuštajućih feromona razlikuju se jer otpuštajući induciraju brze promjene u ponašanju kao što su parenje, agresija i strah. Kod miševa se nalaze u mokraći i imaju utjecaj na početak i na odgodu estrogenskog ciklusa kod ženki. Estrogenski ciklus predstavlja povećani spolni nagon tj. želju za parenjem kod ženki sisavaca koji se javlja jednom ili više puta godišnje. Dokazano je da su početni feromoni kod miševa regulirani testosteronom jer je njihova prisutnost utvrđena u mokraći mužjaka, dok kod ženki i kastriranih mužjaka nije [3].

Poznato je da eusocijalne populacije insekata karakterizira kooperativna podjela rada između matice i radnika. Feromoni koje izlučuje matica određuju društvenu hijerarhiju oglašavanjem plodnosti matice i suzbijanjem plodnosti radnika (slika 6). Stoga, može se reći da matičini feromoni imaju značajni utjecaj od feromona radnika. Analizom 64 različitih vrsta bumbara, mrava i osa utvrđeno je da feromoni matice sadrže zasićene linearne i razgranate ugljikovodike. Zanimljivo je da ista kombinacija linearnih alkana (*n*-C27, *n*-C29, i 3-MeC29) ima sposobnost inhibirati razvoj jajnika kod osa, bumbara i mrava, triju neovisno evoluiranih kukaca. Na temelju toga, pretpostavlja se da matičin feromon potječe iz uobičajenih signala za plodnost koji je koristio kukac, predak svih eusocijalnih kukaca [5].

Društveni poredak

pčela medarica (*Apis mellifera*)



komponente feromona matice

Slika 6. Primjeri feromona kod kukaca i njihova struktura (prema 1)

2.2. Biološka dostupnost i uloga feromona

2.2.1. Insekti

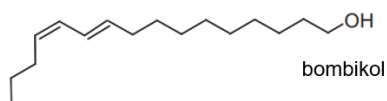
Kod insekata, veliku ulogu u prijenosu signala imaju ugljikovodici smješteni u kutikuli. Odgovorni su prepoznavanje srodnika i agresiju kod mrava, osa, pčela i termita. Signal je kvalitativno jednak između srodnika, ali kvantitativno različit. Većinom se izlučuju u obliku smjese specifičnoga omjera, a rjeđe u obliku pojedinačne molekule.

U kontaktu sa stranim feromonom, kod insekata je zapaženo agresivno ponašanje u obliku pojačanog kretanja ticala i donje čeljusti [1]. Utvrđeno je da se kod mrava stolara (*Camponotus japonicus*) u ticalima nalaze osjetilne stanice koje su odgovorne za prepoznavanje nesrodnika. U osjetilnim neuronima ticala, zabilježena je povećana električna aktivnost nakon izlaganja staklenom štapiću koji je bio obložen kutikularnim ugljikovodicima iz pripadnika drugog mravinjaka. Povećane električne aktivnosti nije bilo u dodiru s pripadnicima istog mravinjaka [14]. Dokaz ključne uloge kutikularnih ugljikovodika u prepoznavanju srodnika dobiven je u istraživanjima ose *Polistes biglumis* koja nakon ispiranja pentanom nije prepoznala svoje srodnike, a nakon ponovnog dodatka kutikularnog ekstrakta, jest [1].

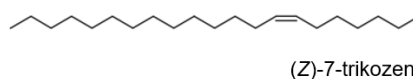
Nadalje, na površini kutikule mnogih dvokrilaca (kućne mušice, vinske mušice, komarci) nalaze se dugolančani dienski i monoenski ugljikovodici koji služe kao spolni feromoni i afrodisijaci, utječu na izbor partnera i potiču udvaranje [15,16]. Iz kućne mušice *Musca domestica* izoliran je prvi kutikularni ugljikovodik (*Z*)-9-trikozen koji se nalazi u izmetu i kutikuli ženke privlačeći mužjake (slika 7) [17]. Također, kutikularni ugljikovodici mogu djelovati i kao anti-afrodisijaci i imati ulogu u sprječavanju privlačenja među vrstama [1].

Privlačnost i parenje

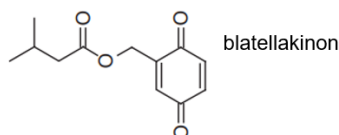
afrodizijak
dudov svilac (*Bombyx mori*)



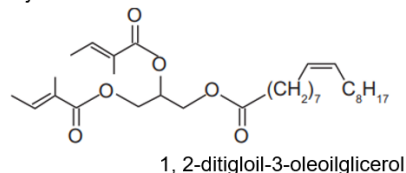
prepoznavanje srodnika
vinska mušica (*Drosophila*)



smeđi žohar (*Blattella germanica*)



anti-afrodizijak
D. mojavensis i *D. arizonae*



Slika 7. Feromoni odgovorni za privlačnost i parenje kod navedenih kukaca (*prema 1*)

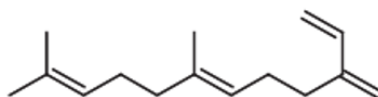
Slično kao i spolni feromoni, agregacijski feromoni imaju ulogu privlačenja pripadnika iste vrste, samo što agregacijski djeluju i na mužjake i na ženke. Poznato je da agregacijske feromone koriste kornjaši, grinje, termiti [9], muhe, pčele, skakavci, a izlučuju se najčešće kao mješavina mirisa u paru s drugim privlačnim podražajem, npr. hranom. Okupljanje oko izvora hrane olakšava pronalaženje partnera, promiče zajedničko hranjenje i pruža zaštitu od okolišnih uvjeta i predatora [1]. Zajedničko hranjenje posebno je važno npr. za potkornjake kod kojih je potrebno više pojedinaca za prevladavanje obrambenih mehanizama drveća kao što su toksini i sokovi [18].

Alarmni feromoni obično su manje specijalizirani od drugih vrsta feromona i uglavnom služe kao opći komunikacijski signali koje mogu primati i druge vrste [1]. Jedan od najbolje istraženih alarmnih feromona je (*E*)- β -farnezen (slika 8), seskviterpen koji oslobađaju mnoge vrste lisnih ušiju koje nakon predacije signaliziraju srodnicima da se prestanu hraniti i rasprše [19]. Također, (*E*)- β -farnezen sredstvo je za sprječavanje lisnih ušiju da se hrane biljkama [20].

Alarm

lisne uši

(*E*)- β -farnezen



koristi se u poljoprivredi

Slika 8. Alarmni feromon lisnih ušiju (*E*)- β -farnezen (*prema 1*)

2.2.2. Sisavci

Prirodni izvori feromona kod sisavaca kao što su mokraćna, znoj, slina i suze sadrže smjese prirodnih spojeva koje se razlikuju ovisno o vrsti, spolu, dobi, genotipu i endokrinom stajnu, a utječu na agresiju, prepoznavanje pojedinaca (srodnika i pripadnika drugih vrsta), seksualnu privlačnost, reproduktivnost, dojenje, ponašanje majke i novorođenčeta. Slično kao i kod insekata, izlučuju se u slučaju opasnosti, pružaju informacije o društvenoj hijerarhiji i dostupnosti hrane [3].

Mnogo hlapljivih tvari u mokraći regulira reproduktivnost, privlačnost i agresivno ponašanje. Identificirani spojevi u mokraći strukturno su različiti i razlikuju se kod mužjaka i ženki, ali izazivaju odgovore podjednako visokog afiniteta u glavnom olfaktornom epitelu te kod apikalnih vomeronazalnih osjetilnih neurona. Točan mehanizam detekcije je i dalje nepoznat [3]. Feromoni prisutni u mokraći mužjaka miševa potiču sinkronizaciju estralnog ciklusa kod ženki čime osiguravaju da ženke budu plodne u vrijeme susreta sa mužjacom (Whittenov efekt), potiču ubrzan razvoj ženki tj. razvoj maternice i sam početak estralnog ciklusa (Vandenberghov efekt) [21] i utječu na odgodu estralnog ciklusa ukoliko 8-10 ženki živi u skupini [3].

Nadalje, androgeni steroid, već spomenuti androstenon 5α -androst-16-en-3-on djeluje kao seksualni feromon kod svinja (*Sus scrofa*). Proizvodi se u slini mužjaka svinja i žvakanjem prelazi u aerosol. Kod ženki u estralnom ciklusu izaziva privlačnost što rezultira zauzimanjem specifičnog položaja za parenje. Detekcija steroida ide putem glavnog olfaktornog epitela, a ne preko VNO. Kod ljudi se srodan feromon nalazi u znoju, a detekcija ide preko mirisnih receptora [3].

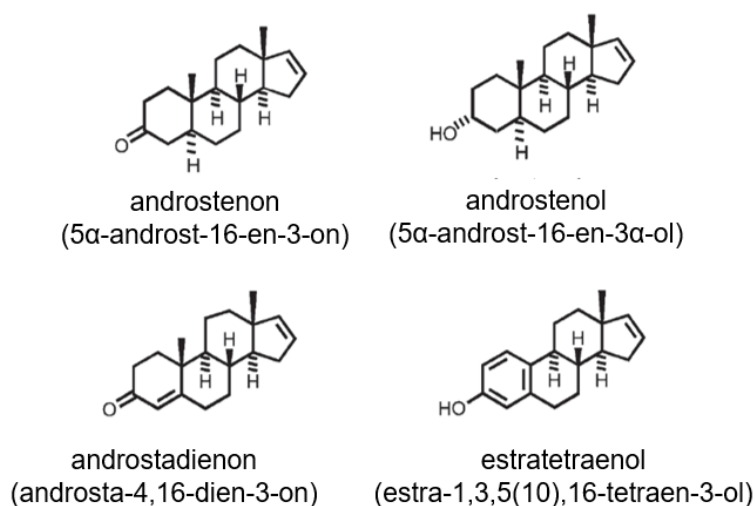
Glavni sastojci mišjih suza i sline su egzokrini peptidi koje izlučuju žlijezde ESP (engl. *Exocrine Gland-Secreting Peptides*), koji su slabo istraženi. ESP je skupina sličnih proteina veličine 7-10 kDa koji se proizvode u egzokrinim žlijezdama miša i suznoj žlijezdi koja proizvodi suznu tekućinu. Različiti su za mužjake i ženke i imaju utjecaj na privlačnost.

Novorođeni sisavci odmah nakon rođenja pokazuju instinktivnu reakciju sisanja [3]. Primjerice, feromon koji potječe iz zečjeg mlijeka iz dojke, 2-metilbut-2-enal izaziva urođenu reakciju sisanja kod novorođenčadi koja prethodno nije dojena [22].

Agresivno je ponašanje kod sisavaca temelj obrane teritorija, potomaka i partnera od neprijatelja. Dokaz da na agresivno ponašanje izravno utječu feromoni jest da u dodiru sa strancem, domaći mužjaci napadaju strane mužjake, ali ne ženke i kastrirane mužjake. Nadalje, ukoliko se kastriranog mužjaka dovede u kontakt sa muškim urinom ili njegovim pročišćenim sastojcima, vraća mu se agresivnost [3].

2.2.3. Ljudi

Feromoni kod ljudi (slika 9) prisutni su u tjelesnim izlučevinama kao što su mokraćna, sperma, vaginalni sekret, majčino mlijeko, potencijalno slina i znoj koji je najviše istražen. Znoj izlučuju žlijezde znojnice i lojnice kao tekućinu bez mirisa, ali u kontaktu sa odjećom i mikroflorom kože poprima miris. Glavne komponente znoja su jednostavne organske kiseline (npr. *E*-3-metil heks-2-enska kiselina i 3-metil-3-hidroksiheksanska kiselina), a pretpostavljeni feromoni znoja su komponente steroidne strukture, osobito mirisni 16-androsteni: androstadienon (4,16-androstadien-3 α -on), androstenon (gore spomenut) i androstenol (5 α -androst-16-en-3-ol). Androstadienon ima najjači učinak na oba spola, ali je učinak izraženiji na ženama. Koncentracije 16-androstena veće su kod muškaraca, nego kod žena pa su tako žene osjetljivije na njih od muškaraca pozitivno utječući na njihovo raspoloženje. Feromon koji luče samo žene naziva se estratetraenol (estra-1,3,5(10),16-tetraen-3-ol) i prvi put je izoliran iz urina trudnica. Pretpostavlja se prisutan i u znoju [7].



Slika 9. Glavni feromoni kod ljudi (prema 7)

2.3. Izolacija i sinteza feromona

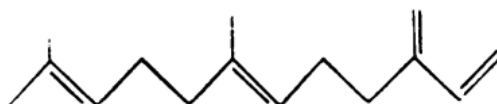
2.3.1. Alarmni feromon (trans- β -farnezen) iz lisne uši

Lisne uši u slučaju napada predatora iz svojih rožnica izlučuju kapljice koje svojim mirisom uzrokuju bijeg lisnih ušiju koje se nalaze u blizini, najčešće na mjestu hranjenja. Upravo se te kapljice smatraju alarmnim feromonom.

Tkiva lisnih ušiju homogenizirana su u smjesi dietil-etera i metanola u omjeru 3:1 i zatim filtrirana. Filtrat je osušen pomoću natrijeva sulfata. Nakon uparavanja otapala u vakuumu, ostatak je otopljen u heksanu i provedena je kromatografija na Florisil koloni. Samo je ugljikovodična frakcija tj. heksanski eluat pokazao biološku aktivnost. Ugljikovodici su dalje odvojeni kolonskom kromatografijom na Florisil koloni impregniranom srebrovim nitatom. Elucija se provodila rastućim koncentracijama dietil-etera u heksanu. Biološka aktivnost bila je prisutna u frakciji sa 6 %-tnim dietil-eterom u heksanu.

Rezultati provedenih kromatografija, ukazali su na prisutnost spoja koji sadrži tri do četiri dvostruke veze. Na aktivnoj frakciji provedena je plinsko-tekućinska kromatografija na Carbowax 20-M i utvrđena je prisutnost dva istaknuta pika. Biološka aktivnost u frakcijama nakon plinske kromatografije obnovljena je hlađenjem u kapilarama. Jedan od ova dva pika sadržavao je alarmni feromon koji je detektiran spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Identificirani feromon sadržavao je molekularni ion 204 koji prema cjelokupnom ugljikovodičnom sastavu odgovara molekulskoj formuli $C_{15}H_{24}$ s četiri nezasićenem dvostruke veze. Predložena struktura bila je ugljikovodična struktura farnezena koja je bila poznata je jer *trans,trans*- α -farnezen idetificiran iz mrava (slika 10).



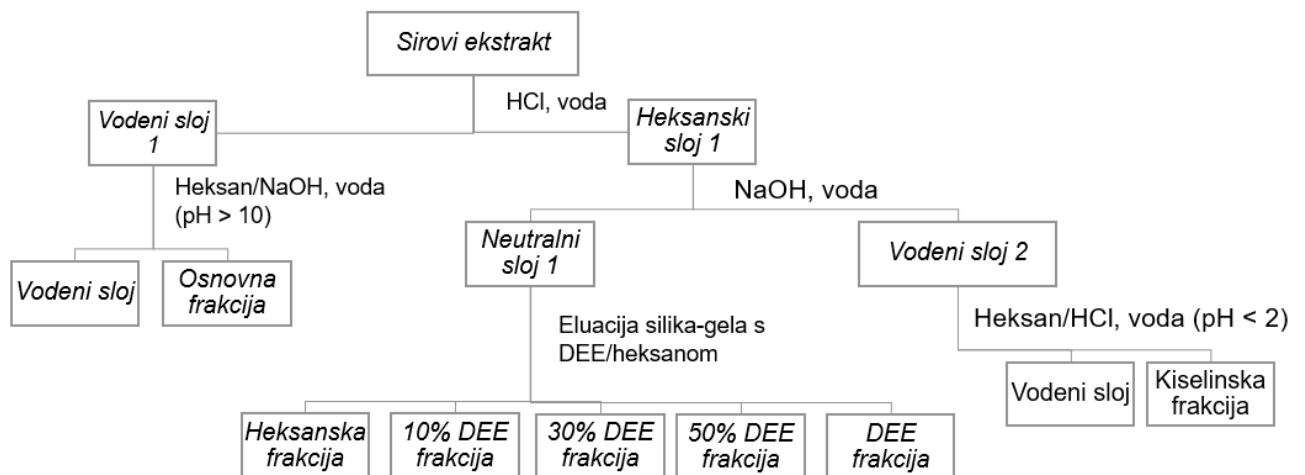
Slika 10. Prikaz strukture *trans*- α -farnezena (*prema* 19)

Da se istraži moguća sličnost struktura kod lisnih uši, sintetiziran je *trans*- β -farnezen [19]. Sinteza se provodila zagrijavanjem 10 g nerolidola u 100 mL dimetil-sulfoksida u staklom obloženoj posudi na 150 °C kroz 20 h. Pripravljeno je 74 % ugljikovodika iz čega je preparativnom plinskom kromatografijom izoliran *trans*- β -farnezen. Struktura je potvrđena rezultatima IR, UV i NMR analiza.

Navedenim tehnikama i metodama, *trans*- β -farnezen identicifiran je kao alarmni feromon u lisnoj uši ruže, graška, zelene stjenice i pamuka. Budući da izloženost ovome feromonu uzrokuje raspršivanje lisnih ušiju sa mjesta hranjenja, *trans*- β -farnezen ima veliki potencijal u istraživanju metoda u borbi protiv insekata [19].

2.3.2. Agregacijski feromon iz termita *Reticulitermes speratus*

Već spomenuti agregacijski feromon iz termita *Reticulitermes speratus* višekomponentna je smjesa koja se sastoji od ugljikohidratnih lanaca, masnih kiselina, aromatskih komponenti i kolesterola. Njegova ekstrakcija provedena je iz tijela 2000 jedinki po koloniji u staklenu bočicu od 100 mL koja je sadržavala 10 mL *n*-heksana. Četiri uzorka uzeta su za četiri kolonije (A, B, K i L). Sirovi heksanski ekstrakti (otprilike 200 jedinki/mL) prebačeni su u nove epruvete i čuvani u zamrzivaču na -30 °C. Sljedeći koraci ekstrakcije provedeni su prema Shemi 1.



Shema 1. Shematski prikaz ekstrakcije agregacijskog feromona iz termita *Reticulitermes speratus* (prema 9)

Prvo je sirovi ekstrakt ekstrahiran s 1M klorovodikom i potom frakcioniran u *heksanski sloj 1* i *vodeni sloj 1*. *Vodeni sloj 1* je alkaliziran dodatkom 1M natrijeva hidroksida na pH 10 pa potom ekstrahiran heksanom. Koncentriranje ekstrakta provedeno je korištenjem rotacijskog uparivača da se dobije *osnovna frakcija*.

Heksanski sloj 1 je dodan u volumen heksana i ekstrahiran sa 1M natrijevim hidroksidom i frakcioniran u *neutralni sloj 1* i *vodeni sloj 2*. *Vodeni sloj 2* je zakiseljen dodatkom 1M klorovodika na pH 1 i ekstrahiran heksanom. Dobiveni ekstrakt se zatim koncentrira bez isušivanja na rotacijskom uparivaču da se dobije *kiselinska frakcija*.

Neutralni sloj 1 ide na kromatografski stupac silikagela. Kolona se uzastopno eluira heksanom, trima koncentracijama dietil-etera u heksanu (10 %, 30% i 50%) i dietil-eterom. Dobiveni alikvoti svake frakcije koncentrirani su u manje volumene i izloženi parama dušika.

Potom su podvrgnuti GC-MS-u i stavljeni u zamrzivač na -30 °C na čuvanje za kasnije analize [9].

2.4. Detekcija i karakterizacija feromona

Metode koje se koriste za detekciju feromonskih molekula su ultraljubičasta (UV) i infracrvena spektroskopija (IR), nuklearna magnetska rezonancija (NMR) i najčešće korištena spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Navedene metode omogućavaju strukturno definiranje feromona.

Masa molekuskog iona pruža preliminarno određivanje elementog sastava i određivanje svojstava kao što je stupanj zasićenosti. Disocijacijom molekuskog iona dobivaju se detaljnije informacije o strukturi molekule feromona. Uglavnom se za fragmentaciju koriste tandem MS i ionizacija elektronima (EI, eng. Electron ionisation). U nastavku teksta slijedi opis pojedinačnih metoda za detekciju i karakterizaciju feromona uz recentna istraživanja vezana za polarnost i molekule s većom molekulskom masom.

2.4.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija najčešće je korištena metoda za detekciju, kvantifikaciju i strukturnu karakterizaciju hlapljivih feromona. Ekstrakti kutikularnih lipida ubrizgavaju se u kromatografsku kolonu i dolazi do odvajanja spojeva na temelju njihove hlapljivosti i afiniteta za stacionarnu fazu. Spojevi sadržani u eluatu dalje se analiziraju plameno ionizacijskim detektorom (FID) ili spregom sa spektrometrijom masa (MS). Uzorak se, nakon izlaska iz kolone, miješa sa smjesom zraka i vodika i zapali pri čemu dolazi do pirolize (kemijske razgradnje) uzorka. Pri tom iz organskih spojeva nastaju ioni koji se skupljaju na katodi pri čemu se stvara električni signal koji je proporcionalan koncentraciji C-atoma u plamenu. Identitet spoja određuje na temelju retencijskih vremena koja su prethodno određena pomoću standarda.

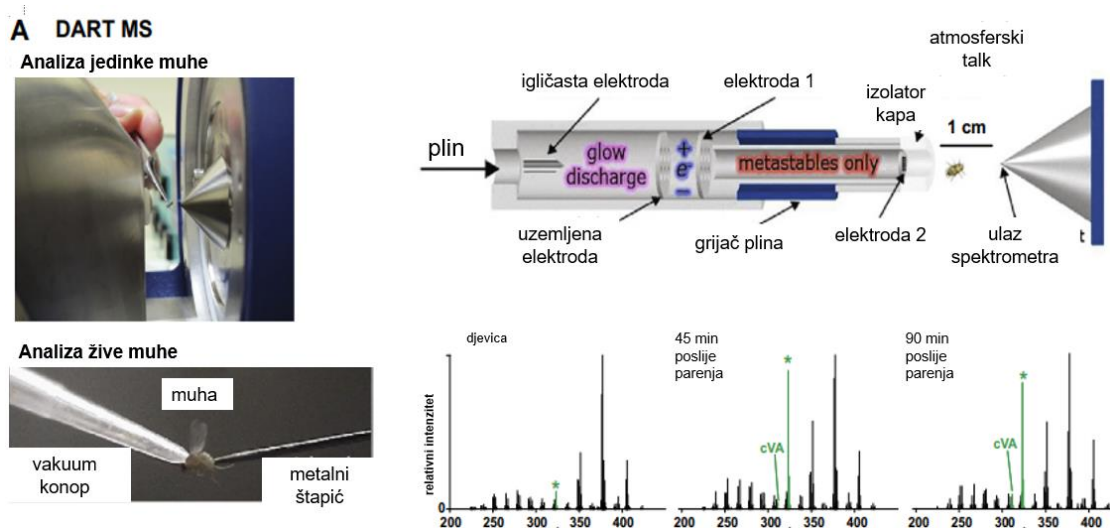
Eluat dobiven plinskom kromatografijom može se detektirati MS-om nakon provedene ionizacije elektronima (EI). EI proizvodi tipične molekulske ione i na različite načine fragmentira molekule koje se mogu pretražiti u bazama podataka (The Wiley Registry of Mass Spectral Data i The National Institute of Standards and Technology). GC-MS analiza posebno je korisna za razlikovanje razgranatih alkana na temelju karakterističnog indeksa vremena zadržavanja. Međutim, određivanje položaja i stereokemije funkcijskih skupina i dvostrukih veza uglavnom zahtjeva kemijsku pretvorbu prije GC-MS analize.

Iako je GC analiza najčešće korištena, ima i nekih nedostataka. Primjerice, provođenje GC-a u standardnim uvjetima koji se koriste za detekciju i karakterizaciju ugljikovodika

ograničava analizu na nepolarne lipide niske molekulske mase. Korištenjem visokotemperaturnih kolona i prilagođavanjem temperaturnih i ionizacijskih parametara, analiza se može proširiti i na spojeve veće molekulske mase kao što su trigliceridi [23]. Nadalje, uporabom EI oslobađa se velika količina unutarnje energije koja se prenosi na analit i može uzrokovati brzu fragmentaciju molekuskog iona što otežava određivanje molekulske mase. Utemeljen je GC-MS na hladnoj EI koji omogućava detekciju molekularnih iona s nižom temperaturom eluiranja [24]. Također, priprema uzorka može bit dugotrajna i složena jer zahtijeva prikupljanje iz više pojedinaca.

2.4.2. Spektrometrija masa (DART, MALDI, LDI i ESI)

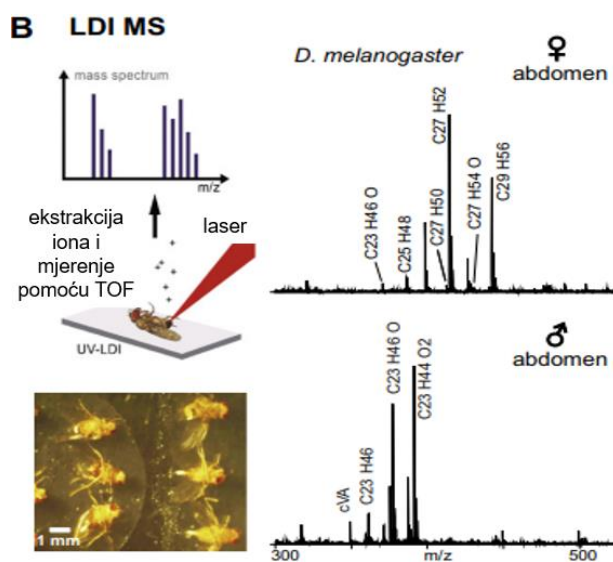
Izravna analiza u stvarnom vremenu (DART, eng. *Direct analysis in real time*) metoda je koja se koristi za stvaranje molekulskih iona. Provodi se u uvjetima atmosferskog tlaka gdje visoki električni potencijal stvara struju plinovitog helija i generira ione (filtriraju se za DART analizu) i atome helija u pobuđenom stanju. Pobuđeni atomi helija izravno reagiraju s vodom u atmosferi čime nastaju nabijeni klasteri vode koji lako prenose proton na mnoge vrste molekula analita generirajući protonirane molekule ($[M+H]^+$) (slika 11). Neke od prednosti DART-MS su laka priprema uzorka i njihovo izravno stavljanje u izvor (npr. kod istraživanja insekata, jedinka se pincetom stavlja u izvor), otkrivanje polarnijih molekula i molekula veće molekulske mase (npr. trigliceridi, dugolančani masni alkoholi i steroli).



Slika 11. Prikaz DART-MS metode (prema 1)

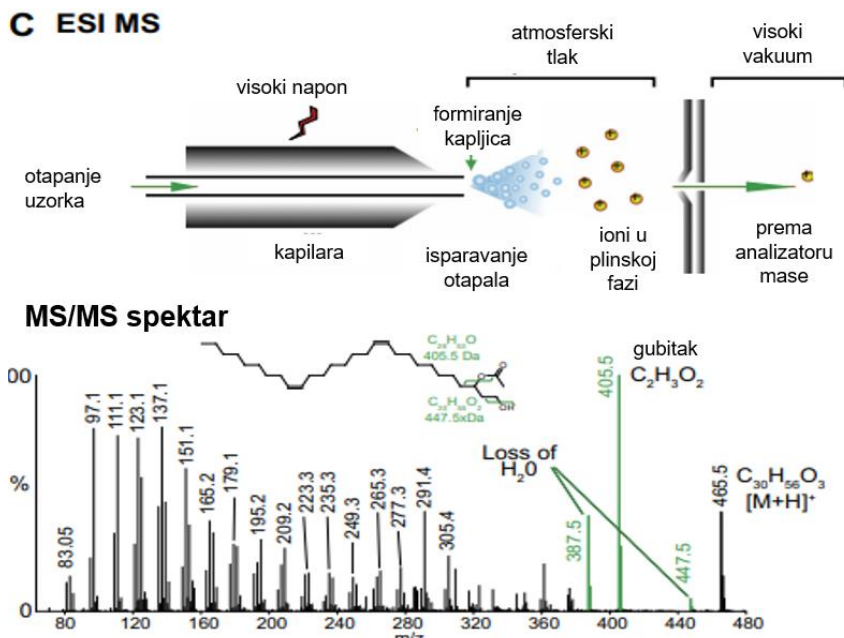
Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI, eng. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) koristi se za ionizaciju termolabilnih nehlapljivih molekula

velike molekulske mase. Stoga je pogodna za analizu lipida. Uzorak kokristalizira sa matriksom i nanese se na pločicu u analizatoru. Na njega se usmjeri laserska zraka (dušikov, UV i IR laser) pri čemu glavninu energije apsorbira matriks koji se zbog toga brzo zagrijava. Uzorak pri tome desorbira sa pločice i ionizira se. MALDI u kombinaciji s litijском matricom korišten je za analizu kutikularnih ekstrakata termita, mrava, žohara i mušica [25]. Otkriveni su neočekivano teški nepolarni ugljikovodici dugih lanaca. Također, postoji i varijacija metode, ionizacija laserskom desorpcijom (LDI) (slika 12) koja isključuje upotrebu matrice, a kukci ili dijelovi kukaca izravno stavljaju se u instrument i ozračuju laserskom zrakom u uvjetima srednjeg tlaka [1].



Slika 12. Prikaz LDI-MS metode (prema 1)

Ionizacija elektrosprejem (ESI, eng. *Electrospray ionization*) koristi se za velike biološke molekule koje teško prelaze u plinovito stanje i ioniziraju (slika 13). Omogućuje ionizaciju širokog spektra biomolekula uključujući polarne i nepolarne lipide, peptide, proteine i ugljikohidrate. Uzorak se otopi u polarnom hlapljivom otapalu i pod visokim tlakom prolazi kroz kapilaru na čiji je vrh priključeno jako električno polje (3-4 kV). Na izlazu iz kapilare uzorak se raspršuje u aerosol jako nabijenih kapi koje se zatim provode kroz struju vrućega plina pri čemu otapalo isparava pa se kapi raspršuju u još sitnije kapljice sve dok se ne dobiju pojedinačne ionizirane molekule. Ova metoda se u literaturi rijetko nalazi kao metoda za analizu feromona [1].



Slika 13. Prikaz ESI-MS metode (prema 1)

2.4.3. Online metode za detaljniju analizu strukture

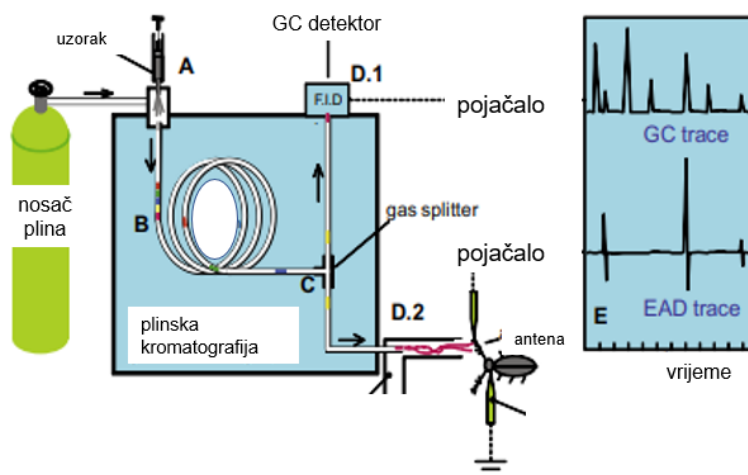
Navedene metode ionizacije (DART, LDI i ESI) mogu se sprežati s različitim *online* metodama u svrhu dobivanja detaljnije i preciznije strukture. Tandem masena spektroskopija (MS/MS) uobičajena je karakteristika većine komercijalnih MS uređaja. Ioni se iz smjese odvajaju u plinovitoj fazi na temelju omjera mase i naboja (m/z) pomoću uređaja za selekciju iona (npr. kvadrupolni analizator mase). Odabrani ioni podvrgavaju se fragmentaciji u sudaru s inernim plinom (npr. argonom). Ovaj postupak moguće je primijeniti na široki spektar neutralnih i polarnih lipida i dobiti informacije o identitetu molekula i položaju funkcijskih skupina [26].

Razvijena je *online* metoda nazvana ozonom inducirana disocijacija (OzID) koja olakšava određivanje položaja dvostruke veze. Ioni odabrani na temelju mase izlažu se ozonskim parama čime ozon brzo pretvara dvostruke veze između ugljika u ozonide [1]. Cijepanje na mjestu dvostruke veze daje fragmente iona točno određene mase prema kojoj je poznat položaj dvostruke veze [27, 28]. Primjerice, OzID je korišten za identifikaciju izobara i određivanje masnih acilnih komponenti koje su pronađene u trigliceridnim feromonima *Drosophila*e [29].

2.4.4. Plinska kromatografija povezana sa detekcijom elektroantennograma (GC-EAD)

GC-EAD omogućava istovremenu kemijsku identifikaciju i procjenu funkcionalne aktivnosti. Nakon provedene plinske kromatografije sa sirovim ekstraktom, eluat se dijeli na dva različita detektora: jedan dio eluata ide na detektor plamene ionizacije, a drugi dio se ispuhuje preko biološkog senzora u obliku kukca (slika 14). Elektrode umetnute u antene, mjere električnu aktivnost osjetljivih neurona. Ova je metoda iznimno korisna za identifikaciju feromona koje emitiraju različite vrste kukaca i člankonožaca i hlapljivih mirisa biljaka koji su privlačni kukcima [1]. Primjerice, alkil aldehid nonanal identificiran je kao atraktivan miris pomoću kojega komarci pronalaze ljude i ptice [30]. Prednost ove metode je osjetljivost na vrlo niske koncentracije liganda što pruža identifikaciju količinski vrlo malih feromonskih mješavina. Također, omogućava procjenu važnosti pojedinih komponenti unutar smjese [1].

D GC-EAD



Slika 14. Prikaz GC-EAD metode (prema 1)

2.4.5. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Nuklearna magnetska rezonancija spektroskopska je metoda koja zasada pruža najjasniju strukturnu analizu molekula. Njezin je nedostatak što količina uzorka za analizu mora biti u stotinama mikrograma do miligrama što može predstavljati problem kod bioloških molekula niske dostupnosti koje se izoliraju iz prirodnih materijala. Metoda se nastoji unaprijediti da i količinski manji uzorci budu pogodni za analizu [1]. Tako su Dossey i sur. korištenjem NMR sonde manjeg volumena, uspjeli analizirati obrambene izlučevine insekta [31]. Također, korištenjem 2D NMR spektra omogućena je usporedba dva uzorka dobivenih iz različitih uvjeta što je uspješno iskorišteno za identifikaciju aktivnih i neaktivnih frakcija spolnih feromona iz *Caenorhabditis elegans*. Međutim, NMR tek treba doživjeti svoj procvat u analizi složenih bioloških smjesa kao što su feromoni [1].

3. ZAKLJUČCI

1. Feromoni su složeni organski spojevi koji služe za komunikaciju između pripadnika iste vrste, a njihovo djelovanje vezano je uz upozoravanje na opasnost, obilježavanje puta do hrane, spolno privlačenje, agregaciju tj. združivanje (mravi, termiti), društvenu hijerarhiju i prepoznavanje srodnika, te kontroliranje ponašanja kukaca parazita.
2. Sisavci detektiraju feromone pomoću vomeronazalnog organa (VNO) koji je smješten u nosnoj šupljini i sadrži bipolarne receptorske stanice, dok je kod ljudi VNO zakržljao, iako je povremeno aktivan.
3. Feromone karakterizira velika strukturna raznolikost. Prisutni su u obliku jedne molekule i u obliku smjese molekula. Najčešće su to: male hlapljive molekule, ugljikohidrati (linearni ili razgranati), esteri masnih kiselina, alkoholi, kiseline, epoksidi, ketoni, izopreni, trigliceridi.
4. Omjer komponenata smjese feromona ima ključnu ulogu za feromonski učinak. Isti sastav molekula u pogrešnom omjeru može dati drugi učinak, nekad i neželjeni. Time se osigurava specifičnost feromona.
5. Podjela feromona vrši se prema njihovom djelovanju pa ih dijelimo na otpuštajuće, signalne, modulirajuće i primarne.
6. Ugljikovodici smješteni u kutikuli insekata imaju veliku ulogu u prijenosu signala u obliku feromona. Odgovorni su prepoznavanje srodnika i agresiju kod mrava, osa, pčela i termita.
7. Prirodni izvori feromona kod sisavaca kao što su mokraćna, znoj, slina i suze sadrže smjese prirodnih spojeva koje se razlikuju ovisno o vrsti, spolu, dobi, genotipu i endokrinom stajnu, a utječu na agresiju, prepoznavanje pojedinaca (srodnika i pripadnika drugih vrsta), seksualnu privlačnost, reproduktivnost, dojenje, ponašanje majke i novorođenčeta.
8. Feromoni kod ljudi prisutni su u tjelesnim izlučevinama kao što su mokraćna, sperma, vaginalni sekret, majčino mlijeko, potencijalno slina i znoj.
9. Najčešće metode izolacije feromona su homogenizacija, sušenje, uparavanje, otapanje u heksanu, ekstrakcija i kromatografija.
10. Metode koje omogućuju strukturno definiranje feromona su ultraljubičasta (UV) i infracrvena spektroskopija (IR), nuklearna magnetska rezonancija (NMR) i najčešće korištene spregnute tehnike plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

11. DART-MS metoda je stvaranja molekulskih iona koja je pogodna za analizu polarnih molekula i molekula veće molekulske mase kao što su vrlo često feromoni.
12. LDI varijacija je MALDI jer ne uključuje upotrebu matrice, ali je pogodna za izolaciju feromona iz kukaca.
13. GC-EAD metoda je koja pruža identifikaciju količinski vrlo malih feromonskih mješavina i omogućava procjenu važnosti pojedinih komponenti unutar smjese.

4. POPIS LITERATURE

1. Yew JY, Chung H (2015) Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. *Progress in lipid research*, **59**, 88-105. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.06.001>
2. Karlson P, Lüscher M (1959) 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, **183**, 55-56. <https://doi.org/10.1038/183055a0>
3. Liberles, Stephen D (2014) Mammalian pheromones. *Annual review of physiology*, **76.1**, 151-175. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170334>
4. Feromoni. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013-2024, <https://www.enciklopedija.hr/clanak/feromoni>. Pristupljeno 10.6.2024.
5. Gaskett AC (2011) Orchid pollination by sexual deception: pollinator perspectives. *Biological Reviews*, **86(1)**, 33-75. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00134.x>
6. Baker TC, Zhu JJ, Millar JG (2016) Delivering on the promise of pheromones. *Journal of chemical ecology*, **42**, 553-556. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0744-5>
7. Verhaeghe J, Gheysen R, Enzlin, P (2013) Pheromones and their effect on women's mood and sexuality. *Facts, views & vision in ObGyn*, **5(3)**, 189. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3987372/>
8. Wyatt TD (2017 Aug 7) Pheromones. *Curr Biol*. **27(15)**:R739-R743. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.039>
9. Mitaka Y, Matsuyama S, Mizumoto N, Matsuura K, Akino T (2020) Chemical identification of an aggregation pheromone in the termite *Reticulitermes speratus*. *Scientific Reports*, **10**, 7424. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64388-4>

10. Ferveur JF, Cobb M, Boukella H, Jallon JM (1996) World-wide variation in *Drosophila melanogaster* sex pheromone: behavioural effects, genetic bases and potential evolutionary consequences. *Genetica*, **97**, 73-80.
<https://doi.org/10.1007/bf00132583>
11. Mori K (2007) Significance of chirality in pheromone science. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15(24)**, 7505-7523. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.040>
12. Riley RG, Silverstein RM, Moser JC (1974) Biological responses of *Atta texana* to its alarm pheromone and the enantiomer of the pheromone. *Science*, **183(4126)**, 760-762. <https://doi.org/10.1126/science.183.4126.760>
13. Wood DL, Browne LE, Ewing B, Lindahl K, Bedard WD, Tilden, PE i sur. (1976) Western pine beetle: specificity among enantiomers of male and female components of an attractant pheromone. *Science*, **192(4242)**, 896-898.
<https://doi.org/10.1126/science.1273574>
14. Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y i sur. (2005) Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, **309(5732)**, 311-314. <https://doi.org/10.1126/science.1105244>
15. Ferveur JF (2005) Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behavior genetics*, **35**, 279-295.
<https://doi.org/10.1007/s10519-005-3220-5>
16. Wicker-Thomas C (2007) Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. *Journal of Insect Physiology*, **53(11)**, 1089-1100.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.07.003>
17. Carlson DA, Mayer MS, Silhacek DL, James JD, Beroza M, Bierl BA (1971) Sex attractant pheromone of the house fly: isolation, identification and synthesis. *Science*, **174(4004)**, 76-78. <http://dx.doi.org/10.1126/science.174.4004.76>
18. Raffa KF (2001) Mixed messages across multiple trophic levels: the ecology of bark beetle chemical communication systems. *Chemoecology*, **11**, 49-65.
<https://doi.org/10.1007/PL00001833>

19. Bowers WS, Nault LR, Webb RE, Dutky SR (1972) Aphid alarm pheromone: isolation, identification, synthesis. *Science*, **177(4054)**, 1121-1122. <https://doi.org/10.1126/science.177.4054.1121>
20. Vandermoten S, Mescher MC, Francis F, Haubruge E, Verheggen FJ (2012) Aphid alarm pheromone: an overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect biochemistry and molecular biology*, **42(3)**, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.11.008>
21. Vandenberg JG (1969) Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology*, **84(3)**, 658-660. <https://doi.org/10.1210/endo-84-3-658>
22. Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Ginies C, Sémon E, Perrier G (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, **424(6944)**, 68-72. <https://doi.org/10.1038/nature01739>
23. Mori K (2012) Pheromone synthesis. Part 253: Synthesis of the racemates and enantiomers of triglycerides of male *Drosophila* fruit flies with special emphasis on the preparation of enantiomerically pure 1-monoglycerides. *Tetrahedron*, **68(40)**, 8441-8449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2012.07.086>
24. Amirav A, Gordin A, Poliak M, Fialkov AB (2008) Gas chromatography-mass spectrometry with supersonic molecular beams. *Journal of mass spectrometry*, **43(2)**, 141-163. <https://doi.org/10.1002/jms.1380>
25. Cvačka J, Jiroš P, Šobotník J, Hanus R, Svatoš A (2006) Analysis of insect cuticular hydrocarbons using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of chemical ecology*, **32**, 409-434. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9008-5>
26. Brügger B (2014) Lipidomics: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, **83(1)**, 79-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035324>

27. Thomas MC, Mitchell TW, Blanksby SJ (2009) OnLine ozonolysis methods for the determination of double bond position in unsaturated lipids. *Lipidomics: Volume 1: Methods and Protocols*, 413-441. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-322-0_21
28. Thomas MC, Mitchell, TW, Harman DG, Deeley JM, Nealon JR, Blanksby SJ (2008) Ozone-induced dissociation: elucidation of double bond position within mass-selected lipid ions. *Analytical chemistry*, **80(1)**, 303-311. <https://doi.org/10.1021/ac0702185>
29. Chin JS, Ellis SR, Pham HT, Blanksby, SJ, Mori, K, Koh QL i sur. (2014) Sex-specific triacylglycerides are widely conserved in *Drosophila* and mediate mating behavior. *Elife*, **3**, e01751. <https://doi.org/10.7554/elife.01751>
30. Syed Z, Leal WS (2009) Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106(44)**, 18803-18808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906932106>
31. Dossey AT, Walse SS, Rocca JR, Edison AS (2006) Single-insect NMR: a new tool to probe chemical biodiversity. *ACS Chemical Biology*, **1(8)**, 511-514. <https://doi.org/10.1021/cb600318u>

Izjava o izvornosti

Ja Iva Marković izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis