

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**  
**SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA**



**DIPARTIMENTO DI FARMACIA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE**  
**IN**  
**CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

**TESI DI LAUREA IN CHIMICA DEGLI ALIMENTI**

**ALLESTIMENTO DI BIOFABBRICHE PER LA PRODUZIONE**  
**DI FITOCOMPLESSI AD INTERESSE NUTRACEUTICO**

**BIOFACTORIES SETTING UP FOR THE PRODUCTION OF**  
**PHYTOCOMPLEXES OF NUTRACEUTICAL INTEREST**

**RELATORE**  
**PROF.**  
**GIAN CARLO TENORE**

**CANDIDATO**  
**SIMONE D'ORSI**  
**MATR. M46001532**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

# INDICE

<b>CAPITOLO 1: Introduzione.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITOLO 2: Mela annurca Campana IGP.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1: Generalità.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2: Composizione quantitativa e qualitativa.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPITOLO 3: Polifenoli.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1: Proprietà antiossidanti.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2: Effetto ipoglicemizzante.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3: Effetto ipocolesterolemizzante.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4: Effetto antitumorale.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5: Effetto sulla rigenerazione del tessuto capelluto.....</b>	<b>13</b>
<b>3.6: Applicazioni nutraceutiche dei polifenoli di mela annurca.....</b>	<b>13</b>
<b>3.7: Triterpeni.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPITOLO 4: Acido Ursolico.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1: Proprietà e ruoli dell'acido ursolico.....</b>	<b>16</b>
<b>4.2: Aspetti biofarmaceutici e potenziali applicazioni.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPITOLO 5: Piante come biofabbriche di composti bioattivi.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1: Criteri per l'allestimento di una biofabbrica.....</b>	<b>22</b>

5.1.1: Selezione di un genotipo superiore.....	22
5.1.2: Selezione dell'espianto.....	23
5.1.3: Induzione del callo vegetale.....	24
5.1.4: Selezione delle linee cellulari.....	27
5.1.5: Allestimento di sospensioni cellulari in scala di laboratorio.....	28
5.1.6: Ottimizzazione delle condizioni colturali e ambientali.....	29
5.1.7: Ottimizzazione della produzione di metaboliti secondari.....	36
5.1.8: Scale-up in bioreattori.....	41
5.1.9: Downstream.....	46
<b>CAPITOLO 6: Materiali e metodi.....</b>	<b>48</b>
6.1: Preparazione calli e sospensioni cellulari.....	48
6.1.1: Reagenti.....	48
6.1.2: Materiali vegetali.....	48
6.1.3: Terreno di coltura.....	48
6.1.4: Elicitazione calli vegetali.....	49
6.1.5: Allestimento di sospensioni cellulari.....	49
6.1.6: Elicitazione sospensione cellulare.....	49
6.2: Analisi calli e sospensioni cellulari.....	50
6.2.1: Reagenti.....	50
6.2.2: Protocollo di estrazione dell'acido ursolico.....	50
6.2.3: Analisi dell'acido ursolico mediante HPLC-DAD.....	50
6.2.4: Linearità e sensibilità dell'analisi HPLC-DAD dell'acido ursolico.....	51

<b>6.2.5:</b> <i>Accuratezza e precisione dell'analisi HPLC-DAD dell'acido ursolico</i> .....	52
<b>6.2.6:</b> <i>Estrazione polifenolica</i> .....	52
<b>6.2.7:</b> <i>Determinazione quantitativa dei polifenoli mediante HPLC-DAD-FLD</i> .....	52
<b>6.2.8:</b> <i>Convalida del metodo HPLC-DAD-FLD</i> .....	53
<b>CAPITOLO 7:</b> <i>Risultati e discussione</i> .....	<b>55</b>
<b>CAPITOLO 8:</b> <i>Conclusioni</i> .....	<b>69</b>
<b>CAPITOLO 9:</b> <i>Bibliografia</i> .....	<b>70</b>

## CAPITOLO 1: Introduzione

Le piante sono da sempre una sorgente di molecole utili per l'uomo, prodotte semplicemente da acqua e nutrienti di base attraverso le complesse e numerose vie biosintetiche che la cellula vegetale possiede [1]. Nella storia della farmacologia, le piante cosiddette "medicinali" hanno messo in luce il loro fondamentale ruolo come fonte di molecole terapeutiche e oggi, rappresentano ancora una fonte importante e, in alcuni casi insostituibile, nella progettazione di farmaci, per l'identificazione di nuovi composti guida ('lead-compounds') farmaceutici, nutraceutici, ecc. [1]. Secondo l'organizzazione mondiale della sanità (OMS), circa l'80% della popolazione umana dipende dalle piante e dai loro composti bioattivi per scopi nutrizionali e medicinali [2] e si stima approssimativamente che circa un quarto dei farmaci moderni contengano principi attivi o composti bioattivi provenienti dalle piante, le quali offrono un vasto campo di applicazioni in virtù della diversità chimica in essi presente.

I prodotti ottenibili dalle cellule vegetali, si dividono generalmente in due classi: metaboliti primari e secondari. I metaboliti primari sono fondamentali per la sopravvivenza della cellula vegetale, mentre i secondari (SM) vengono prodotti in risposta a lesioni o per proteggersi da vari tipi di stress biotici ed abiotici [3]. Sono proprio questi che poi si sono rilevati essere di notevole interesse nella produzione di varie classi di prodotti, ed in particolar modo i nutraceutici [4][5][6].

Negli ultimi anni, diversi studi epidemiologici hanno dimostrato l'importante ruolo della dieta nell'organismo, nel mantenimento di uno stato sano del corpo e della mente [7]. Alimenti ricchi di vegetali tra cui frutta e verdura sono ben noti per i loro effetti benefici. Le evidenze sperimentali dimostrano che il loro elevato apporto riduce il rischio metabolico di malattie, problemi cardiovascolari e tumori e ciò ha contribuito al crescente interesse scientifico e pubblico per la dieta e il suo impatto sulla salute e sulle malattie [8]. È in questo contesto che i nutraceutici hanno ricevuto molta attenzione grazie al potenziale valore nutritivo, alla loro sicurezza e per la loro efficienza. Questi stanno diventando parte della dieta quotidiana anche a causa della crescente prevalenza di malattie croniche e della crescente consapevolezza dei consumatori verso misure sanitarie preventive. Secondo l'analisi di mercato rapporto (2020), la dimensione del mercato mondiale dei nutraceutici è stata stimata in 233,9 dollari USA miliardi al tempo della crisi COVID-19 e la loro richiesta è in continuo aumento [9].

I nutraceutici sono generalmente ottenuti da piante coltivate naturalmente, ma la loro produzione commerciale è limitata a causa di fattori ambientali, stagionali e vincoli regionali. Per una produzione omogenea di nutraceutici, i vecchi metodi convenzionali richiedono molto tempo perché la pianta impiega diversi anni per crescere e raggiungere l'età adatta per la produzione dei composti bioattivi desiderati. Inoltre, il problema principale con la fornitura commerciale di molecole di origine

vegetale è la limitata disponibilità dei composti bioattivi nelle piante. Il contenuto di SM nelle piante coltivate in campo è generalmente inferiore all'1% in peso secco. Oltretutto, a causa della complessità strutturale, la sintesi chimica di questi fattori risulta impossibile o lunga ed economicamente dispendiosa. [3] Per tal motivo, quasi il 72% delle specie chimiche richieste proviene da fonti agronomiche [2]. Tuttavia, l'agricoltura tradizionale è soggetta a variazione delle condizioni ambientali in funzione del tempo e della regione di coltivazione, portando a differenze imprevedibili nella qualità e nella quantità delle materie prime [6]. In aggiunta, i prodotti dell'agroindustria possono presentare contaminazioni chimiche e microbiologiche non compatibili con le formulazioni terapeutiche, così come lo sfruttamento intensivo e la bassa adattabilità alle coltivazioni tradizionali ha portato all'inclusione, nella lista delle specie minacciate, di circa un quinto delle 50.000 piante medicinali adoperate [1].

Per questa ragione è necessario un metodo alternativo per riuscire ad ottenere una maggiore produzione di biomassa vegetale. In questo contesto, subentra la coltura di cellule vegetali in vitro, una tecnica ben nota per produrre in modo efficiente la massima biomassa vegetale ad elevato contenuto di composti bioattivi in breve tempo e soprattutto in maniera economicamente vantaggiosa per applicazioni commerciali. La coltura di cellule e tessuti vegetali è una tecnica ecologica per la produzione di SM in un ambiente controllato. Inoltre, la coltura di tessuto vegetale aiuta nella propagazione di massa delle piante in un breve lasso di tempo indipendentemente dai vincoli stagionali e dal luogo di coltivazione. Aiuta a facilitare l'isolamento o estrazione di SM in breve tempo [10]. I calli indifferenziati, o strutture differenziate come germogli, radici o embrioni somatici, possono essere utilizzati come espianti per produrre SM attraverso la coltura in vitro. La parte della pianta scelta viene impiegata come espianto per la genesi del callo vegetale, una massa eterogenea e disorganizzata di cellule parenchimatiche con un basso grado di specializzazione o differenziazione. Nella coltura del callo per la produzione di composti terapeutici, generalmente sono necessari almeno due passaggi; il primo per la massima crescita del callo, e il secondo per la produzione di metaboliti secondari [11]. Per la formazione del callo in condizioni ottimali sono necessari luce, temperatura, umidità e sostanze nutritive e inoltre i calli si formano a seguito di diversi stimoli biotici e abiotici. Il principale fisiologo vegetale FW Skoog ha sperimentalmente dimostrato che rapporti intermedi di auxine e citochinine sono generalmente responsabili dell'induzione del callo in vitro [12]. La seconda fase prevede l'applicazione di quantità empiricamente determinate di elicitori o precursori per massimizzare la produzione di metaboliti secondari [13]. Ci sono due principali tipologie di elicitori; biotici (pectina, acido pectico, chitina, chitosano, glucani) e abiotici (temperature estreme, luce ultravioletta, pressione osmotica, antibiotici, fungicidi, sali), che agiscono inducendo la trascrizione delle parti rilevanti del genoma vegetale per produrre SM [14]. Le colture di calli sono un mezzo più rapido e affidabile per ottenere metaboliti terapeutici rispetto alla raccolta di materiali vegetali selvatici [15]. Utile anche per la conservazione delle specie a rischio,

poiché non sono richieste grandi quantità di materiale vegetale per la produzione su scala industriale [16].

Quando il callo acquisisce una biomassa considerevole viene impiegato come inoculo per l'allestimento della sospensione cellulare. Durante questa fase, la miscelazione agitante provoca la disgregazione del callo, facilitando la coltivazione di piccoli aggregati e singole cellule che successivamente contribuiscono alla crescita della biomassa e alla biosintesi di SM. Per garantire una corretta esecuzione della coltura di callo e della sospensione cellulare, è essenziale monitorare e ottimizzare le condizioni colturali, ambientali e meccaniche. Le condizioni colturali coinvolgono aspetti chimici, come la selezione e la composizione del terreno di coltura, la fonte di carbonio, azoto e fosfato, la tipologia, concentrazione e rapporto di fitormoni, oltre al pH. Le condizioni ambientali comprendono parametri fisici quali temperatura e irraggiamento luminoso, mentre quelle meccaniche riguardano l'agitazione. Tutti questi parametri contribuiscono a massimizzare lo sviluppo della biomassa, richiedendo l'implementazione di un sistema di coltivazione adatto alla specifica tipologia cellulare considerata. Come accennato precedentemente, le piante rispondono alla presenza di stress biotici e abiotici attraverso la produzione di metaboliti secondari (SM). Gli elicitori sono in grado di emulare tali stimoli e possono essere classificati come biotici, rappresentati da molecole di segnalazione e composti provenienti da patogeni vegetali, o abiotici, come luce, temperatura, concentrazione salina e metalli pesanti. Questo approccio consente di ottenere una produzione ottimale di SM a livello di laboratorio. Il passo successivo coinvolge lo scaling-up in bioreattori. La scelta del bioreattore più adatto dipende dalle proprietà reologiche e dai requisiti nutrizionali della sospensione cellulare specifica. Tipicamente, le colture composte da cellule resistenti allo stress di taglio vengono coltivate in Stirred Tank Bioreactor (STR), mentre le colture più sensibili trovano impiego negli Orbitally Shaken Bioreactor (OBS). I bioreattori consentono il monitoraggio continuo di parametri come ossigenazione, pH e temperatura, garantendo la sterilità del processo. Al termine del processo di produzione, il prodotto desiderato viene recuperato attraverso procedure di downstream, il cui approccio può variare in base agli obiettivi prefissati, permettendo così di ottenere un prodotto puro o una polvere della sospensione cellulare completa.

La matrice vegetale sulla quale si è basato il presente lavoro di tesi è la Mela Annurca, (*M. pumila* Miller cv Annurca), una cultivar originaria del Sud Italia che ha ricevuto la denominazione di Indicazione Geografica Protetta (IGP) [17]. L'estratto polifenolico di mela annurca (AAPE) ha riscontrato notevoli effetti antiossidanti, ipoglicemizzanti, ipocolesterolizzanti, antitumorali e rigenerativi nei confronti del tessuto capelluto. Questo ha permesso la formulazione di un nutraceutico denominato AppleMetS (AMS) impiegato efficacemente per il trattamento di condizioni iperlipidemizzanti e per stimolare la ricrescita del cuoio capelluto. Tuttavia, l'intero lavoro si è focalizzato su composto appartenente alla classe dei triterpeni, l'acido ursolico (Ursolic Acid, UA). Questo composto ha infatti dimostrato elevata attività, in

vitro ed in vivo, nel trattamento e nella profilassi di diverse patologie infiammatorie, epatiche, cardiovascolari, tumorali, infettive e cutanee in concomitanza con una scarsa tossicità. Per tal motivo, risulta essere un principio attivo promettente per applicazioni nutraceutiche e cosmetiche. L'UA è stato riscontrato in maniera predominante nelle foglie di mela annurca ( $7.81 \pm 0.34$ mg/g liofilizzato) rispetto a buccia ( $4.42 \pm 0.01$ mg/g) e polpa ( $4.42 \pm 0.01$  mg/g). Le foglie, costituendo uno scarto dell'industria agroalimentare, rappresentano una fonte economica ed ecosostenibile di composti bioattivi. Inoltre, l'espianto di foglia risulta essere maggiormente idoneo, rispetto alla buccia e alla polpa, alla coltivazione in vitro mediante biotecnologie vegetali. Tutte queste motivazioni hanno fondato la base per l'allestimento di un processo di produzione di calli e sospensioni cellulari di foglie di mela annurca.

## CAPITOLO 2: Mela Annurca Campana IGP

### 2.1: Generalità

La mela Annurca (*M. pumila* Miller cv Annurca) è una delle cultivar più importanti del Sud Italia. Rappresenta il 60% della produzione di mele della Regione Campania [17] e il 3-4% della produzione nazionale di mele [18]. L'Annurca è l'unica cultivar di mela originario del Sud Italia ed ha nel 2006 ricevuto la denominazione ufficiale di Indicazione Geografica Protetta (IGP) dal Consiglio Europeo (Regolamento (CE) n. 417/2006 della Commissione). [4][17] A differenza delle altre mele, l'Annurca viene raccolta ancora verde e subisce un trattamento di arrossamento in appositi impianti chiamati "Melai". Nei melai i frutti vengono posti su un letto di paglia sotto una rete ombreggiante e periodicamente girati a mano per un periodo di 20-30 giorni in condizioni di temperatura, irraggiamento solare e umidità controllate. Questo trattamento non solo migliora il colore rosso della buccia, ma conferisce anche un aumento della produzione di metaboliti secondari come polifenoli, flavonoidi e antociani in funzione del tempo di conservazione. [17] Seppure questo fenomeno sia stato riscontrato in altre varietà di mele, risulta essere più evidente nella cultivar di Annurca, probabilmente a causa del suo background genetico, del tempo di raccolta anticipato e delle sue peculiari condizioni di post-raccolta [17].

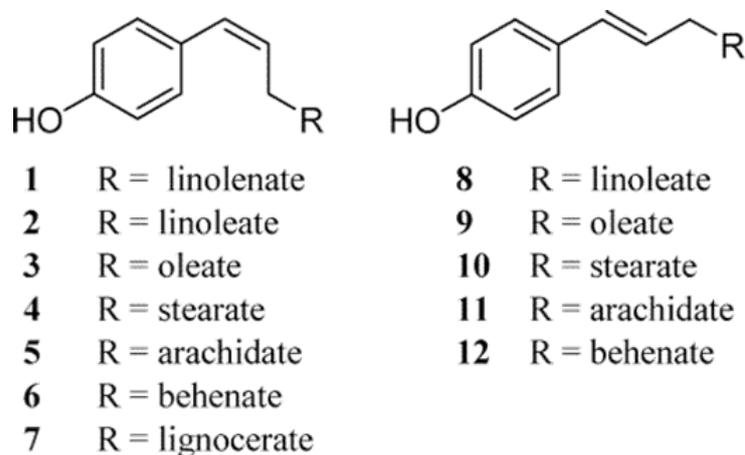


*Fig.1: Mela Annurca Campana IGP, foto effettuata in laboratorio.*

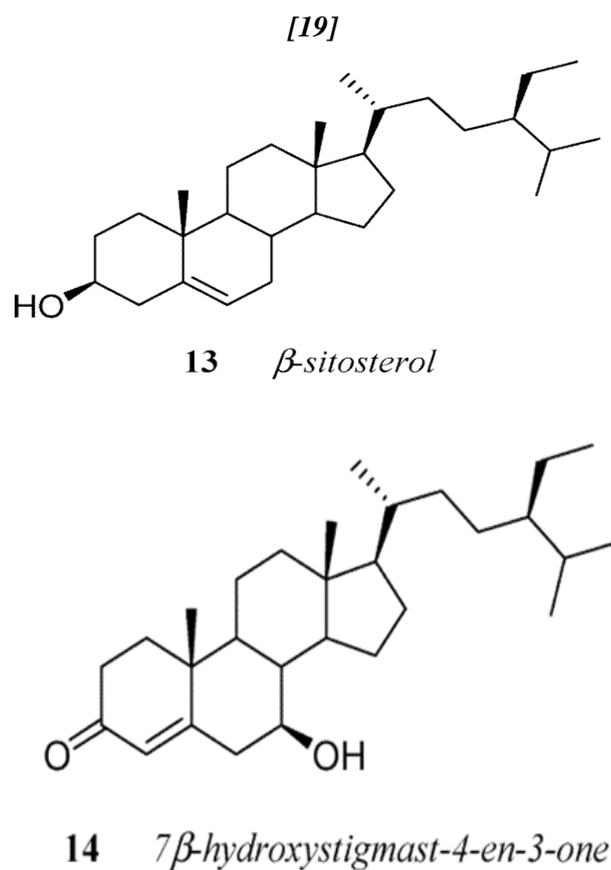
### 2.2: Composizione quantitativa e qualitativa

La mela Annurca risulta essere contraddistinta da notevoli capacità benefiche per la salute umana, applicabili sia in campo nutraceutico che cosmetico. Al fine di indagare i principi attivi correlati a tali attività, sono stati adempiti studi sulla composizione qualitativa e quantitativa. Nello specifico, gli estratti organici e alcolici, grezzi, sono stati purificati mediante tecniche cromatografiche (CC, TLC, HPLC) ed i composti puri ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi spettrometriche (EI-MS) e spettroscopiche (esperimenti NMR 1D e 2D).

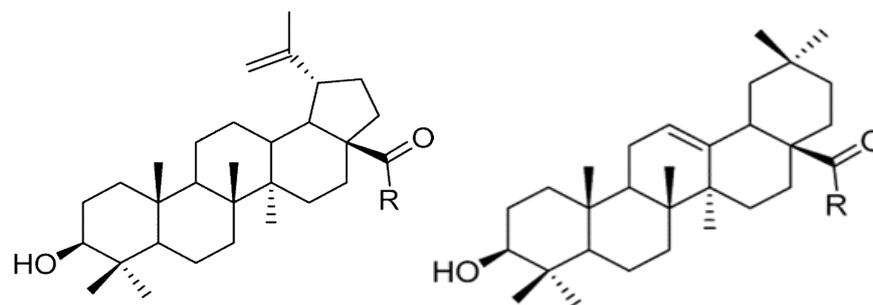
Dalle analisi condotte sull'estratto organico sono emersi: dodici esteri degli acidi grassi Z- ed E-p-cumarinici (Fig.2, 1-12); Due steroli (Fig. 3, 13-14), due triterpeni lupenici (Fig. 4, 15-16), due triterpeni oleanici (Fig. 4, 17 - 18); nove triterpeni ursanici (Fig. 5, 19-27) [19]



*Fig. 2 Strutture degli esteri di acidi grassi cumarinici 1-12 della mela Annurca arrossata.*

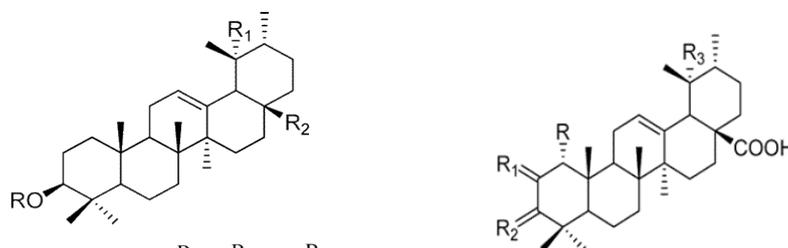


*Fig. 3 Strutture degli steroidi 13 e 14 dalla mela Annurca arrossata [19].*



**15** *betulinic aldehyde*    R = H    **17** *oleanic aldehyde*    R = H  
**16** *betulinic acid*        R = OH    **18** *oleanic acid*        R = OH

**Fig. 4** Strutture dei triterpeni lupenici (15-16) e oleanici (17-18) della mela Annurca arrossata. [19]



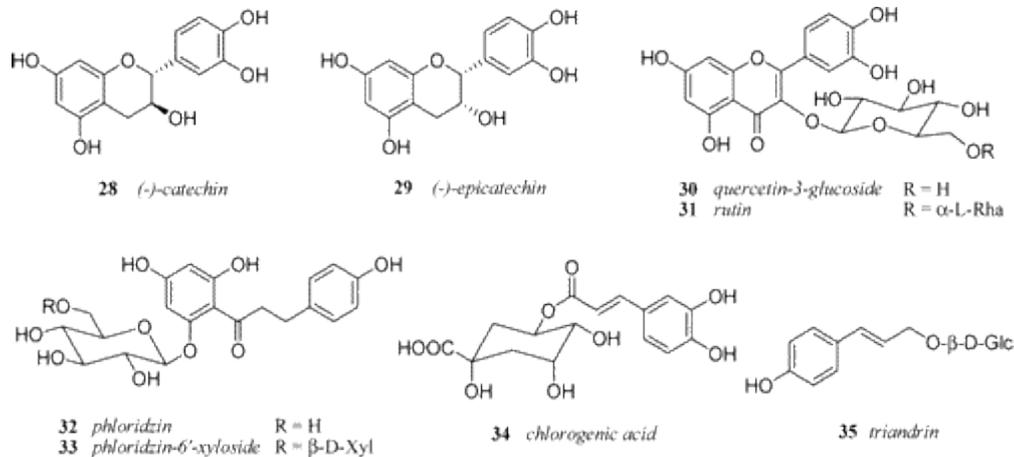
	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		
<b>19</b> <i>ursanaldehyde</i>	H	H	CHO		
<b>20</b> <i>ursolic acid</i>	H	H	COOH		
<b>21</b> <i>pomolic acid</i>	H	OH	COOH		
<b>22</b> <i>uvaol</i>	H	H	CH <sub>2</sub> OH		
<b>23</b> <i>uvaol acetate</i>	Ac	H	CH <sub>2</sub> OH		
	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
<b>24</b> <i>annurcoic acid</i>	OH	H,H	O	OH	
<b>25</b> <i>annurconic acid</i>	OH	H,H	O	H	
<b>26</b> <i>2-oxopomolic acid</i>	H	O	βOH,αH	OH	
<b>27</b> <i>3-epi-2-oxopomolic acid</i>	H	O	αOH,βH	OH	

**Fig.5** Strutture dei triterpeni ursanici 19-27 dalla mela Annurca arrossata.

Le strutture dei 12 esteri di acidi grassi dell'alcol *Z*- ed *E-p-cumarici* (**1-12**) sono state ottenute mediante GC-MS e Spettroscopia <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR dopo purificazione dei singoli composti mediante HPLC. Tra gli steroli, il β-sitosterolo **13** è risultato essere quello più rappresentativo, seguito da 7-β-hydroxystigmast-4-en-3-one **14**. Nessun altro sterolo è stato riscontrato. I triterpeni lupenici e oleanici hanno mostrato una struttura caratterizzata rispettivamente dalla presenza di aldeidi o acidi nella posizione C-28, mentre i triterpeni ursanici si contraddistinguevano da un'ossidazione sul medesimo carbonio. Tra questi: i composti **19** e **20** sono stati identificati come ursolaldeide e acido ursolico, rispettivamente; Il composto **21** è stato caratterizzato come acido pomolico mentre il composto **22** come uvaolo; Il composto **23** è stato identificato come il derivato acetilico del composto **22**; Il composto **26** è stato identificato come acido 2-osso-pomolico, mentre i composti **24**, **25** e **27** sono stati isolati e identificati per la prima volta dal cv. mela Annurca.

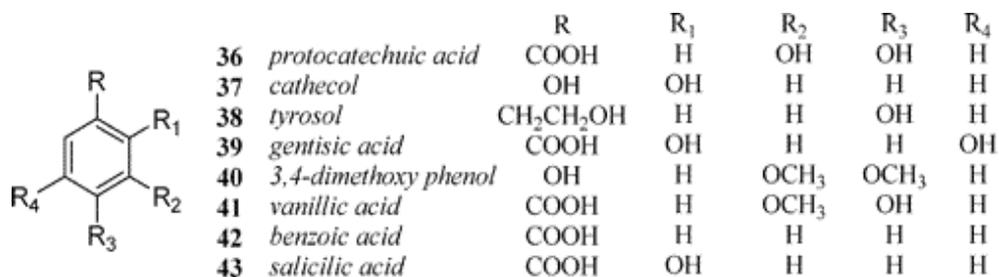
Diversamente, dall'estratto etanolico di cv. mela Annurca sono stati identificati, mediante NMR, i seguenti composti appartenenti alla classe dei polifenoli:

catechina **28**, epicatechina **29**, quercetina 3-O- $\beta$ -d-glucopiranoside **30**, rutina **31**, Florizina **32**, Florizina-6'-xiloside **33**, acido clorogenico, **34** e triandrina **35** (Fig.6)



**Fig 6** Strutture dei principali polifenoli isolati dalla mela Annurca arrossata [19]

Inoltre, dal medesimo estratto, mediante spettroscopia  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR, sono stati identificati alcuni fenoli a basso peso molecolare quali: acido protocatechuico **36**, catecolo **37**, tirosolo **38**, acido gentisico **39**, 3,4-dimetossifenolo **40**, acido vanillico **41**, acido benzoico **42** e acido salicilico **43**. (Fig. 7)



**Fig. 7** Strutture dei fenoli a basso peso molecolare della mela Annurca arrossata [19]

Attraverso l'utilizzo dell'HPLC, è stato possibile stimare la media dell'abbondanza di ciascun composto aromatico negli estratti di mela Annurca. Tra i derivati terpenici, l'acido ursolico è emerso come la specie più abbondante. Al contrario, l'analisi dei composti fenolici ha identificato, in ordine decrescente di presenza, catechina, epicatechina, rutina, quercetina, florizina e acido clorogenico come i componenti quantitativamente più rappresentativi [19]. Di seguito, sono delineate le principali classi di composti che caratterizzano gli estratti di mela Annurca.

## CAPITOLO 3: Polifenoli

I polifenoli rappresentano una famiglia composta da circa 5000 molecole, sono composti bioattivi ampiamente diffusi, caratterizzati chimicamente dalla presenza di molteplici gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse generalmente ad alto peso molecolare: si va da semplici molecole fenoliche a composti altamente polimerizzati con pesi molecolari superiori a 30.000 Da [20]. In base alla struttura, possono essere generalmente classificati in acidi fenolici, flavonoidi, tannini, cumarine, stilbeni, curcuminoidi, xantoni e lignani [21]. Tuttavia, i polifenoli maggiormente caratteristici della mela annurca risultano essere appartenenti alle prime due classi [19]. Gli acidi fenolici sono composti sintetizzati nelle piante durante i normali processi di crescita e sviluppo, nonché in risposta a condizioni di stress scaturite da fattori avversi come siccità, infezioni, danni fisici, radiazioni UV e ferite [21]. Strutturalmente, gli acidi fenolici si suddividono in due gruppi: i derivati dell'acido benzoico ed i derivati dell'acido idrossicinnamico [1]. Al primo gruppo appartengono i fenoli a basso peso molecolare (**Fig.7, 36-43**). Al gruppo degli acidi cinnamici appartiene invece l'acido clorogenico, o acido 3-caffeilchinico, (**Fig.6, 34**), ottenuto mediante esterificazione tra l'acido caffeico, un derivato idrossibenzoico, e l'acido chinico, e la Triandrina, un 1-O- $\beta$ -D-glucopiranoside dell'alcol p-cumarilico (**Fig.6, 35**). Gli acidi fenolici sono ampiamente studiati per le loro attività antiossidanti, antitumorali, antinfiammatorie e altre attività farmacologiche. [21]

I flavonoidi risultano essere la seconda classe di composti caratteristicamente presenti all'interno della cultivar di mela annurca. Questi composti risultano strutturalmente contraddistinti da due anelli aromatici collegati da un ponte a tre atomi di carbonio. I flavonoidi vengono ulteriormente suddivisi in diverse classi in base alla presenza di un'insaturazione tra i carboni 2 e 3, la presenza di gruppo ossidrilico in posizione 3 o di un chetone in posizione 4 [21]. Tra questi, quelli riscontrati in maniera predominante nelle analisi qualitative di mela annurca sono: flavanoli, flavonoli e diidrocalconi. [19] i flavan-3-oli, noti anche come catechine, comprendono catechina ed epicatechina (**Fig.6, 28-29**). Questi composti appartengono ad uno dei prodotti naturali vegetali più studiati per aspetti chimici e farmacologici quali attività antiossidante, antinfiammatoria, chemiopreventiva del cancro immunomodulatoria [21]

Flavonoli come quercetina e alcuni derivati come rutina (Fig.6, 30-31), presentano potenti attività antinfiammatorie, antiossidanti e chemiopreventive [21]

Infine, La florizina, un derivato glucosidico della floretina, un diidrocalcone, e la florizina 6-xiloside, il suo derivato xilosidico (Fig.6, 32-33) risultano essere composti presentanti attività anticancro, antiobesità, antidiabetica, antiossidante, anti-invecchiamento e antimicrobica. [23].

### 3.1: Proprietà antiossidanti

La principale attività dei polifenoli, dalla quale derivano la maggior parte degli effetti biologici, risulta essere quella antiossidante. Nello specifico, i polifenoli esplicano un'azione protettiva nei confronti di radicali liberi, composti presentanti una configurazione elettronica incompleta che li rende particolarmente reattivi nei confronti di molecole biologiche come lipidi, proteine e DNA, decretandone il danneggiamento. I composti radicalici vengono normalmente prodotti a livello fisiologico durante il metabolismo ossidativo e la loro azione ossidante è prevenuta da antiossidanti endogeni. Tuttavia, l'esposizione a vari fattori ambientali, tra cui biossido di azoto e ozono nell'aria inquinata, metalli pesanti, idrocarburi alogenati, radiazioni ionizzanti e fumo di sigaretta, può decretare un aumento della formazione di radicali liberi determinando una condizione di stress ossidativo. [19]

Lo stress ossidativo risulta essere correlato ad una serie di condizioni patologiche come aterosclerosi, complicazioni cardiovascolari, diabete e cancro. Dunque, l'utilizzo di sostanze antiossidanti esogene, come i polifenoli, può concorrere nella riduzione dell'incidenza di queste patologie. [19]

Al fine di valutare il contributo di ogni composto sull'attività antiossidante totale, è stata valutata l'attività inibitoria dei polifenoli purificati 28-43 nei confronti di radicali come il DPPH (radicale 2,2'-difetil-1-picrilidrazinile), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO.

Dalle analisi sul DPPH, l'attività maggiore è stata riscontrata per l'(*E*)-p-cumaril oleato (Fig.2, 9), che ha determinato una riduzione del radicale del 78% dopo 30 minuti. Tra i flavonoidi, la catechina (Fig.6, 29) ha decretato una riduzione del 60% dopo 5 minuti, mentre, i fenoli a basso peso molecolare (Fig.7 36-43) hanno evidenziato un'attività inibitoria media del 50%. [19]

Tutti i flavonoidi isolati hanno mostrato attività di scavenging del perossido di idrogeno superiore all'80% con la massima attività inibitoria raggiunta dall'acido clorogenico **34** (86%). **[19]** Analogamente, quanto all'eliminazione dei radicali NO, tutti i composti hanno mostrato un'attività superiore al 50%. **[19]**

A supporto di questi dati, studi condotti su linee cellulari HepG2 (carcinoma epatocellulare umani) hanno dimostrato un ad un aumento della proliferazione cellulare del 32.2% in seguito al trattamento con AAPE. Quest'effetto è stato ad una riduzione delle specie ROS del 33.3% principalmente associato alle procianidine, composti oligomerici costituiti da monomeri di catechina ed epicatechina **[23]**

### **3.2: Effetto ipoglicemizzante**

Quanto all'effetto ipoglicemizzante, l'AAPE ha dimostrato un'attività inibitoria sull'assorbimento del glucosio su linee cellulari HepG2, cellule sovraesprimenti l'isoforma del trasportatore del glucosio GLUT2, normalmente presente a livello epatico. Dall'analisi è stata evinta una correlazione statisticamente significativa tra i quantitativi di florizina (Fig.6, **32**) e l'inibizione dell'assorbimento del glucosio **[23]** Alla florizina, infatti, è stato attribuito un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi glicemica attraverso la riduzione dell'assorbimento intestinale e renale del glucosio mediante inibizione dei trasportatori del glucosio sodio dipendenti (SGLT). Inoltre, l'AAPE ha decretato un aumento del glicogeno sintasi, una riduzione della gluconeogenesi ed esercitato effetti ipoglicemici in topi presentanti diabete mellito di tipo 2**[24]**

### **3.3: Effetto ipocolesterolemizzante**

L'AAPE ha evidenziato importanti attività sul metabolismo lipidico. Più nello specifico, in studi condotti su linee cellulari HepG2 è stata riscontrata una riduzione dell'assorbimento del colesterolo **[23]** ed un aumento dell'attività del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL) del 40%. **[25]**

Inoltre, sulla medesima linea cellulare è stato constatato un aumento dell'espressione del 33,3% dell'apolipoproteina A1(ApoA1), la principale componente proteica delle lipoproteine ad alta densità (HDL). ApoA1, è inoltre responsabile dell'attivazione di

lecitina: colesterolo aciltransferasi (LCAT), un enzima fondamentale nel trasporto inverso di colesterolo. In tutti i casi gli effetti ipocolesterolemizzanti sono stati statisticamente correlati con un aumento del contenuto di procianidine. [25]

### **3.4: Effetto antitumorale**

L'effetto antitumorale dell'AAPE è stato valutato in molteplici linee cellulari tumorali. Nello specifico, l'AAPE ha determinato una riduzione della proliferazione del 48% nei confronti della linea cellulare HepG2. Questa attività è stata attribuita alla probabile capacità pro-ossidante da parte di composti ad elevato numero di residui ossidrilici come i derivati della quercetina (Fig.6,30-31) e della catechina (Fig6, 28-29) [23]

L'attività antiproliferativa degli estratti di mela annurca sulle cellule tumorali è stata confermata attraverso studi condotti su cellule leucemiche umane (HL-60). Queste cellule sono state analizzate attraverso saggi di vitalità cellulare in seguito al trattamento di due pool di estratti polifenolici qualitativamente distinti: il primo contenente acido clorogenico, flavanoli (Fig.6, 28,29,34) e procianidine; il secondo flavonoli e diidrocalconi (Fig.6, 30-33). I risultati hanno mostrato una citotossicità del 19% e del 46%, rispettivamente. Questa è stata, in seguito all'aumento di 4.6 volte dei livelli di caspasi-3, principalmente attribuita all'attivazione dei processi apoptotici. [27]

Ulteriori studi sono stati condotti su cellule di carcinoma mammario triplo negativo MDA-MB-231. Nello specifico, la proliferazione di questa linea cellulare è risultata selettivamente inibita da APE mediante generazione di ROS e l'attivazione sostenuta della via JNK. Diversamente, il trattamento con il medesimo estratto su una linea cellulare non tumorale, MCF10A, ha determinato attività antiossidanti. Inoltre, l'APE ha sottoregolato diverse proteine oncogene come NF- $\kappa$ B, c-myc e  $\beta$ -catenina [26]

Infine, l'effetto antiproliferativo dell'AAPE è stato valutato anche su linee cellulari di cancro della tiroide papillare (TPC-1) e anaplastica (CAL62) mostrando una riduzione, della fosforilazione della proteina Rb e la generazione di specie reattive. [27]

### **3.5: Effetto sulla rigenerazione del tessuto capelluto**

L'estratto polifenolico di mela annurca ha mostrato importanti attività sulla crescita dei capelli. Questa proprietà è stata principalmente correlata alle procianidine, in particolare alla Procianidina B2. Più nello specifico, studi condotti su popolazioni murine hanno riscontrato un effetto sul profilo metabolico e di espressione alla base della rigenerazione del tessuto capelluto. Dal punto di vista metabolico, l'AAPE ha determinato un'inibizione di diverse reazioni NADPH-dipendenti decretando una riduzione della glutammilisi, della via del pentoso fosfato, del glutatione, della citrullina e della sintesi nucleotidica. Diversamente, la respirazione mitocondriale, la  $\beta$ -ossidazione e la produzione di cheratina sono risultate stimolate. In generale, Lo spostamento metabolico indotto dall'AAPE riduce l'ossidazione degli amminoacidi rendendoli disponibili per la biosintesi della cheratina. [28] Per quanto riguarda il profilo di espressione, l'APE ha determinato un'upregolazione del fattore di crescita endoteliale vascolare A (*VEGFA*) e del fattore di crescita dei fibroblasti 7 (*FGF-7*), due geni correlati alla crescita dei capelli. Inoltre, l'espressione genica della 1 $\alpha$ -reduttasi di tipo 5 è risultata associata ad una riduzione dei follicoli piliferi [29]. Questi dati fondano le basi per una possibile applicazione di APE nel trattamento della perdita capelli.

### **3.6: Applicazioni nutraceutiche dei polifenoli di mela annurca**

In base alle evidenze riscontrate sugli effetti dell'AAPE sono state proposte diverse formulazioni nutraceutiche, cosmeceutiche e cosmetiche. Una di queste è AppleMetS (AMS), un prodotto caratterizzato da capsule gastroresistenti contenenti un estratto polifenolico di mela annurca microincapsulato in maltodestrine [4][5][6].

AMS ha dimostrato un elevato effetto ipocolesterolizzante e rigenerativo nei confronti del tessuto capelluto. Più nello specifico, l'attività ipocolesterolizzante è stata valutata in un primo studio clinico monocentrico, in doppio cieco, controllato con placebo della durata di 12 settimane su 250 soggetti sani lievemente ipercolesterolemici. Dopo un mese di trattamento con 2 cps/die di AMS i soggetti hanno riscontrato mediamente una riduzione del colesterolo LDL e del colesterolo totale (TC) del 37.6% e 24,9%, rispettivamente, correlabile all'assunzione di 40 mg di

simvastatina o 10 mg di atorvastatina. Inoltre, il nutraceutico ha decretato un aumento del colesterolo HDL del 49,3%. [5] Ulteriori studi in vitro e clinici hanno permesso di determinare il meccanismo d'azione e consolidare la funzione di AMS nel metabolismo lipidico. In primo luogo, l'influenza di AMS sull'assorbimento intestinale del colesterolo è stata valutata in vitro attraverso la misurazione della solubilità micellare del colesterolo in un modello che riproducesse le caratteristiche duodenali. I risultati hanno mostrato una riduzione della solubilità micellare del colesterolo di circa l'85,7%. Questa riduzione è stata indagata mediante NMR, rivelando un possibile effetto delle procianidine dimeriche sulla precipitazione del colesterolo. In seguito, è stato condotto uno studio crossover randomizzato, a singolo centro, in doppio cieco, controllato con placebo per valutare l'escrezione fecale di colesterolo in soggetti sani lievemente ipercolesterolemici. Da questo studio si è evinto un aumento del colesterolo fecale di circa 35% nei periodi di trattamento con AMS rispetto a periodi placebo [4]. Questi risultati attribuiscono alla formulazione di AMS un possibile ruolo nella correzione di stati fisiologici caratterizzati da un'alterazione del profilo lipidico.

Per quanto riguarda il contributo di AMS nella rigenerazione del tessuto capelluto evidenze sono suscitate da studi in vivo ed in vitro. In particolare, l'applicazione di AMS in linee cellulari di cheratinociti umani (HaCaT) ha determinato un aumento del contenuto di cheratina di circa 3 volte rispetto al controllo. [6] Questi dati sono stati successivamente confermati attraverso uno studio clinico monocentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo. In questo studio la somministrazione di capsule gastroresistenti di AMS per un intervallo di tempo di 16 settimane ha determinato dopo solo 2 mesi una crescita dei capelli, del peso e del contenuto di cheratina del 118,3%, 37,3% e 35,7%, rispettivamente. Quanto effetto è risultato essere mediato dalle procianidine, in particolare procianidina B2, riscontrata maggiormente presente nel frutto di mela annurca. Queste evidenze costituiscono un possibile impiego del nutraceutico AMS nel trattamento della calvizie ed alopecia, condizioni caratterizzate dalla perdita del tessuto capelluto. [6]

### 3.7: Triterpeni

La seconda classe risultata chimicamente rappresentativa del profilo qualitativo di mela annurca sono i triterpeni [19]. Questi composti compongono un sottogruppo della famiglia dei terpenoidi o isoprenoidi, contraddistinti dalla presenza di 6 unità isopreniche (C<sub>5</sub>).

Le unità di isoprene sono caratterizzate da un'estremità ramificata e una non ramificata, definite come testa e coda, rispettivamente. La disposizione testa-coda delle unità di isoprene ne determina il collegamento nelle conformazioni strutturali più comuni. [30] Lo scaffold dei triterpenoidi è risultato essere presente in più di 30 specie, tuttavia, I triterpeni tetraciclici e i triterpeni pentaciclici sono le due categorie maggiormente rappresentative. Questi ultimi hanno dimostrato importanti attività antiinfiammatorie, epatoprotettive, antitumorali e immunomodulanti [30]

Tra i vari triterpeni presenti in natura, i derivati lupenici, oleanici e ursanici sono risultati maggiormente compresenti nell'estratto organico di mela annurca [19]

I triterpeni lupenici sono derivati dal lupene, un composto strutturalmente costituito da anelli A, B, C e D a sei membri, disposti in configurazione trans, e l'anello E a cinque membri collegato ad un isopropile. [31] A questa classe risultano appartenenti l'acido betulunico e il corrispondente aldeide (Fig.3, 15-16), composti dotati di attività antiinfiammatorie, antibatteriche, antivirali, antidiabetiche, antimalariche, anti-HIV e antitumorali. [32]

I triterpeni oleanici sono strutturalmente simili ai lupenici ma differiscono per la presenza di un doppio legame tra le posizioni 12 e 13 e dall'assenza dell'isopropile. Tra questi l'acido oleanico ed il corrispondente aldeide sono stati riscontrati nella mela annurca [19]. A questi composti è associata un'attività antiossidante, antiinfiammatoria, ipocolesterolizzante, ipoglicemizzante, ipotensiva e antitumorale. [33]

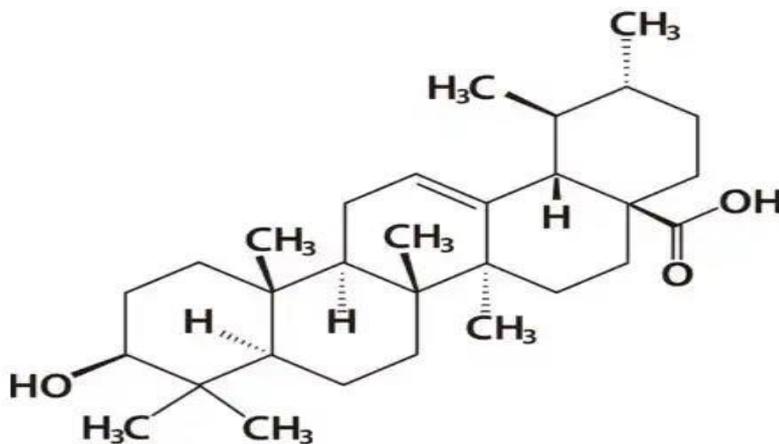
Infine, i triterpeni ursanici sono derivati dall'acido ursolico, un isostere dell'acido oleico presentanti importanti bioattività. La struttura e le proprietà dell'acido ursolico sono descritte di seguito.

## CAPITOLO 4: Acido Ursolico

### 4.1: Proprietà e ruoli dell'acido ursolico

Tra i vari componenti di derivazione triterpenica indentificati nella mela annurca (Fig4 e Fig5, 15-27), l'acido ursolico (acido 3 $\beta$ -idrossi-urs-12-en-28-oico, UA, 31) ha assunto sempre maggior rilevanza in ambito nutraceutico, cosmeceutico e cosmetico. Questo composto è riscontrabile in natura nella forma libera, nella forma complessata con saponina o sottoforma di acido oleanoico (acido 3 $\beta$ -idrossi-olea-12-en-28-olico; OA), un isotopo strutturale. [34][35] L'acido ursolico ed i suoi derivati hanno destato un notevole interesse in ambito terapeutico per gli effetti antinfiammatori, epatoprotettivi, cardioprotettivi, antitumorali, antimicrobici e cutanei, assumendo un possibile ruolo nelle patologie correlate. [35]

Di seguito è riportato il ruolo dell'UA nella modulazione di diverse condizioni patologiche.



*Struttura Acido Ursolico*

### UA: Ruolo nelle patologie infiammatorie

I farmaci convenzionali, efficaci nel trattamento delle patologie infiammatorie (FAS e FANS), presentano una notevole incidenza di effetti collaterali. In quest'ottica l'impiego di principi attività di derivazione vegetale con scarsa tossicità potrebbe profilare una possibile alternativa al trattamento delle patologie infiammatorie.

L'acido ursolico risulta essere un candidato efficiente, grazie alle dimostrate attività antinfiammatorie dovute all'inibizione dall'espressione della lipossigenasi (LOX), della ciclossigenasi (COX) dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) conseguenti alla downregolazione del fattore nucleare- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). [35] [36]

Nello specifico, attraverso studi condotti su estratti fenolici e triterpenici di 109 cultivar di mela si è evidenziata una attività inibitoria nei confronti dell'attivazione di NF- $\kappa$ B e del promotore del TNF- $\alpha$ , attribuita principalmente all'UA e all'OA. Essendo il TNF- $\alpha$  implicato nell'eziopatogenesi del processo aterosclerotico, gli effetti dell'UA potrebbero decretare una possibile applicazione nella prevenzione e trattamento di questa patologia. [36]

Inoltre, studi adempiti su estratti terpenici derivanti dalla buccia di mela hanno rivelato una possibile inibizione, UA mediata, di INF- $\gamma$ -inducibile protein-10 (IP-10), un importante mediatore coinvolto nel processo infiammatorio della malattia infiammatoria intestinale (IBD) profilandone una possibile applicazione nel trattamento [36]

L'UA ha rivelato un ruolo anche nel trattamento dell'artrite reumatoide (RA) e del morbo di Crohn, due patologie infiammatorie su base autoimmune. Entrando nel dettaglio, l'UA impiegato su topi con artrite indotta dal collagene (CIA) ha determinato un miglioramento della condizione patologica attraverso la soppressione e la differenziazione delle cellule Th17 e B [36]. Nel morbo di Crohn, l'UA attraverso l'inibizione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B e la down regolazione di  $I\kappa B\alpha$  sia nelle cellule epiteliali intestinali murini che nei macrofagi peritoneali ha conseguito un attenuazione del processo patologico. [36]

### **UA: Ruolo nelle patologie epatiche**

Alcune patologie epatiche, come l'epatite, la steatosi epatica, la cirrosi e il danno epatico indotto da farmaci presentano la possibilità di essere trattate con farmaci a base di estratti naturali. In particolare, l'acido ursolico è risultato essere un componente particolarmente influente in questo trattamento grazie ai suoi effetti epatoprotettivi. Nello specifico, l'UA attraverso proprietà antiepatite B e C, antiinfiammatorie e antiradicaliche apporta un contributo nella prevenzione e nell'attenuazione dell'epatite. [35][36][45] Infatti, in studi condotti su esemplari murini presentanti

steatosi epatica, indotta attraverso una dieta ad elevato contenuto di grassi, la somministrazione di UA ha decretato una riduzione dell'accumulo lipidico epatico mediante l'attivazione dei recettori PPAR- $\alpha$ , coinvolti nel catabolismo lipidico. [45] Inoltre, la somministrazione di acido ursolico (dose 20mg/kg) ha decretato una riduzione del danno epatico indotto chimicamente da etanolo (7,9 g/kg/die) in soggetti murini, in entità comparabile ad un farmaco epatoprotettivo (silimarina) [35]. L'UA ha anche determinato un aumento della rigenerazione epatica in seguito ad epatemia parziale in soggetti murini. Infine, questo composto ha anche decretato un miglioramento della vitalità degli epatociti in campioni trattati con paracetamolo e tetracloruro, due composti epatotossici. [45]

### **UA: Ruolo nelle patologie cardiovascolari**

Le patologie cardiovascolari risultano essere la principale causa di mortalità e morbilità nei paesi industrializzati. La maggior parte di queste (ictus, infarto miocardico acuto, ipertensione) possono presentare una patogenesi associata al processo aterosclerotico. Generalmente, l'incidenza e le conseguenze cardiovascolari di questo processo possono essere modulate attraverso l'impiego dell'acido ursolico. L'UA ha dimostrato infatti effetti antiiperlipidemici (riduzione trigliceridi, colesterolo totale e lipoproteine), antiossidanti (aumento del glutatione perossidasi e superossido dimutasi) rivelati efficaci nella prevenzione dell'aterosclerosi [35]. Diversi studi hanno, inoltre, dimostrato l'effetto antipertensivo dell'UA dovuto alla riduzione della frequenza cardiaca del 32% e all'inibizione dell'enzima convertitore dell'angiotensina I (ACE), sia in vivo che su soggetti murini, e dalla vasodilatazione conseguente al rilascio di ossido nitrico (NO), in vitro, su aorta toracica isolata [26]. Inoltre, Effetti cardiotonici e antiaritmici dall'UA e dell'OA sono stati valutati su aritmie indotte dalla somministrazione di adrenalina. I meccanismi alla base di questi effetti sono stati riscontrati nell'attività  $\beta$ -bloccante e antiossidante [35] Infine, l'UA ha dimostrato un potente effetto protettivo nei confronti dell'infarto miocardico indotto artificialmente in seguito alla somministrazione di isoproterenolo. [45]

## **UA: Ruolo nelle patologie tumorali**

L'inefficienza dei farmaci chemioterapici nonché l'elevata insorgenza di effetti collaterali ha scaturito una focalizzazione dell'attenzione su composti antitumorali a bassa tossicità come l'acido ursolico. L'UA, infatti, modula molteplici bersagli coinvolti nell'eziopatogenesi dei tumori della mammella, colon, pancreas, stomaco e pelle attraverso un ruolo diretto sulla proliferazione cellulare, sull'apoptosi e sulla regolazione del ciclo cellulare. [35][36]

Entrando nel dettaglio, l'UA ha determinato una riduzione della sopravvivenza cellulare e l'aumento dell'espressione dei geni p53 e p21WAF1 / Cip1, due oncosoppressori, in cellule di cancro al seno MCF-7 [35]

Quanto al cancro al colon, l'UA ha indotto l'apoptosi caspasi indipendente nella linea cellulare derivata dal carcinoma del colon umano (HCT15) e migliorato gli effetti del 5-fluorouracile (5-FU) attraverso l'attivazione della chinasi N-terminale c-jun (JNK). Inoltre, l'UA induce la morte della linea cellulare del carcinoma del colon-retto resistente (CRC) in modo più efficiente rispetto al 5-FU, mediante la probabile induzione dell'autofagia. [35]

In relazione al cancro gastrico, l'UA ha mostrato una diminuzione della proliferazione ed indotto l'apoptosi, in vitro, sulla linea cellulare di cancro gastrico (BGC-803), ed in vivo, su esemplari murini, in maniera dose e tempo dipendente [35]

L'UA ha inoltre inibito la crescita e indotto l'apoptosi in maniera dose-dipendente in tre linee cellulari di cancro del pancreas attraverso una potenziale inattivazione della via PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B e della via JNK [35]

Infine, L'acido ursolico ha indotto l'apoptosi caspasi-dipendente in cellule di melanoma umano isolate. Questo effetto è risultato potenziato dagli inibitori della glicoproteina P (P-gp), rivelandosi efficiente nella prevenzione o nell'inversione della formazione di tumori della pelle coinvolgenti tale glicoproteina. [35][36]

## **UA: Ruolo nelle patologie infettive**

L'aumento della resistenza batterica verso i farmaci antibiotici convenzionali ha conseguito un aumento dell'attenzione su composti che presentassero proprietà antibatterica. Tra questi, l'acido ursolico ha riscontrato capacità inibitorie sulla crescita di funghi, batteri gram-positivi e gram-negativi nonché sulla formazione di biofilm.

[35] Più nel dettaglio, l'influenza dell'UA è stata valutata su diversi ceppi batterici. Tra questi, i migliori valori di concentrazione minima inibitoria (MIC) sono stati riscontrati in batteri Gram+ come *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA), enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) e *Mycobacterium tuberculosis* [35]

Inoltre, evidenze di effetto inibitorio verso microrganismi e biofilm cariogeni come *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp. hanno determinato le basi per un possibile impiego dell'UA per la prevenzione della carie dentale [35]

Infine, l'effetto di UA sulla patogenicità, l'attività emolitica e la capacità di formazione di biofilm da parte di *Listeria monocytogenes* è stato valutato in vitro dimostrando un'attività inibitoria mediata dall'inattivazione della listeriolisina [36]

#### **4.2: Aspetti biofarmaceutici e potenziali applicazioni**

In base a quanto detto precedentemente, si può affermare che l'acido ursolico rappresenti un composto altamente promettente con molti benefici sulla salute umana. Sebbene esistano già diverse formulazioni di integratori con ruoli primariamente ipocolesterolemizzanti o per il trattamento di patologie epatiche, la sua insolubilità in acqua ne limita il trasporto e la diffusione nel corpo umano, con la risultante di un minor tasso di assorbimento a livello gastrointestinale nel caso di formulazioni di tipo orale. Sono svariati i motivi che portano ad una loro bassa biodisponibilità, in particolare le proprietà strutturali, i componenti presenti nella matrice strutturale e le interazioni tra questi [37], tramite degli studi di digestione simulata in vitro ed esperimenti di trasporto e uptake su un monostrato cellulare di Caco-2, si è dimostrato che in una formulazione con uso di oli a formare una emulsione "Pickering" si andava ad aumentare la bioaccessibilità e biodisponibilità dell'acido ursolico e ciò può rivelarsi di fondamentale importanza per applicazioni future sia in ambito nutraceutico che farmaceutico [38].

In ambito nutraceutico diverse formulazioni contenenti UA o alcuni dei suoi derivati sono state allestite allo scopo terapeutico di condizioni fisiologiche e patologiche:

- L'UA derivato dagli estratti di frutta si è dimostrato efficace nel trattamento dell'ipercolesterolemia.

- Formulazione nutraceutiche a base di estratti vegetali contenenti UA come composto predominante sono state impiegate per il trattamento e le comorbidità dell'ipertensione.
- I derivati dell'acido ursolico hanno mostrato proprietà antinfiammatorie (e sono utili nella preparazione di farmaci per il trattamento dell'artrite reumatoide).
- Altri prodotti formulati includono effetti benefici epatoprotettivi [36]

Inoltre sono anche di grande interesse da un punto di vista sperimentale degli ibridi basati su acido ursolico, questi possono essere legati tramite linker estereo ad una serie di molecole sintetizzate a monte che hanno rivelato attività biologica. Questi ibridi vengono sintetizzati e in seguito caratterizzati tramite studi di docking molecolare, dopodiché sono stati effettuati test in vitro nei confronti di una serie di ceppi batterici e cellule tumorali per saggiarne l'eventuale attività citotossica nei loro confronti. In particolare alcuni composti hanno mostrato un'interazione favorevole ed una maggiore energia di docking nei confronti dell'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) rispetto all'acido ursolico preso singolarmente e sebbene il meccanismo d'azione non sia ancora del tutto chiaro, si sono ottenuti dei potenziali scaffold precursori per lo sviluppo di potenziali agenti antibatterici ed antitumorali. [39]

## **CAPITOLO 5: Piante come biofabbriche di molecole bioattive**

Per soddisfare la crescente domanda di nuovi farmaci in quantità sempre maggiori, i ricercatori stanno imparando a utilizzare le piante come piccole "fabbriche" di farmaci, riducendo i costi di produzione e garantendo standard di sicurezza ancora più elevati. Come accennato in precedenza le piante sintetizzano una serie di metaboliti secondari specifici e molti di questi sono ampiamente utilizzati in formulazioni farmaceutiche, cosmeceutiche e nutraceutiche. A fronte di questi interessi industriali, i SM delle piante sono molto richiesti e molto apprezzati dal punto di vista economico. Tuttavia, tali metaboliti si trovano generalmente in scarsa abbondanza e sono presenti solo in specifici organi vegetali, inoltre, data l'intricata struttura e stereochimica dei metaboliti secondari, molti tentativi di produrli attraverso una sintesi chimica completa non hanno avuto molto successo. Si prenda a titolo esemplificativo il Paclitaxel (Nome commerciale Taxol), un chemioterapico utilizzato nel trattamento di vari tipi di tumore quali quello alla mammella, esofageo, ai polmoni, al pancreas etc. Sebbene la sua sintesi sia stata realizzata con un certo successo utilizzando approcci ibridi, la produzione di paclitaxel resta costosa e richiede grandi quantitativi di materia prima [40]. Pertanto sono state proposte delle metodologie alternative ed in particolare la sospensione colturale di cellule vegetali si è rivelata particolarmente efficiente [41]. Nel corso del tempo la tecnologia delle colture cellulari vegetali ha permesso la produzione su larga scala di prodotti naturali che generalmente presenti in quantità molto basse, forniscono un'alternativa economica ai metodi di coltivazione tradizionali [42][43] e sono risultati più affidabili della raccolta di piante selvatiche in natura [44]. Oltre a conservare le popolazioni selvatiche, le colture cellulari vegetali sono poco costose da coltivare e mantenere.

### **5.1: Criteri per l'allestimento di una biofabbrica**

#### **5.1.1: Selezione di un genotipo superiore**

La fase iniziale di un processo produttivo coinvolge la selezione di un genotipo superiore. Sebbene fattori ambientali e fisiologici influenzino l'espressione di diversi geni coinvolti nel metabolismo secondario [46], il patrimonio genetico della pianta madre rimane uno dei determinanti più significativi per ottenere una produzione

ottimale dei fitocomplessi di interesse. Il genotipo è responsabile della definizione del fenotipo della pianta e, di conseguenza, della produzione sia in termini quantitativi che qualitativi. In questo contesto, sono state notate differenze nei profili di espressione tra membri della stessa specie e anche tra specie e cultivar diverse [46][47]. Pertanto, la selezione della pianta con le migliori caratteristiche genetiche risulta cruciale.

Nel contesto specifico delle mele, è emerso che la concentrazione di metaboliti secondari, come i polifenoli, varia notevolmente tra le diverse cultivar. Questa diversità può essere attribuita in parte alle differenti condizioni di crescita e maturazione [48]. Tuttavia, il fattore predominante nel determinare il contenuto polifenolico è rappresentato dalla variabilità genetica. A sostegno di questa affermazione, uno studio di associazione genome-wide (GWAS) e di previsione genomica è stato condotto su 136 cultivar di mele, utilizzando dati ottenuti tramite HPLC. Tale studio ha evidenziato una variazione del contenuto polifenolico fino a due ordini di grandezza, con polifenoli come l'acido clorogenico che sono stati rilevati in un intervallo compreso tra 4,25 e 413,6 µg/g [49].

### **5.1.2: Selezione dell'espianto**

Dopo aver selezionato il genotipo, la specie e la cultivar della pianta madre, è essenziale procedere alla selezione dell'espianto, il tessuto vegetale utilizzato per avviare il processo di formazione del callo. In teoria, grazie all'alta capacità rigenerativa delle piante, è possibile indurre il processo callogenico da qualsiasi componente della pianta in condizioni adeguate [50][51]. In generale, possono essere utilizzati frutti [50], foglie [51][52], cotiledoni [53], steli [52], internodi [54], germogli [55], radici e semi. La scelta dipende dall'abbondanza della produzione dei metaboliti secondari di interesse nelle diverse parti della pianta. Inoltre, i parametri fisiologici degli espianti, come la vitalità, la fase di sviluppo e l'assenza di condizioni patologiche, sono cruciali insieme al processo di sterilizzazione per garantire un'ottimale capacità di rigenerazione. [56]

### **5.1.3: Induzione del callo vegetale**

Il callo vegetale, in ambito botanico, è comunemente descritto come una massa di cellule parenchimatiche eterogenee, caratterizzata da un basso grado di specializzazione o differenziazione. Le cellule che costituiscono il callo si distinguono per una maggiore potenza cellulare derivante dalla dedifferenziazione o riprogrammazione dell'espianto di partenza. Grazie all'alta plasticità delle cellule vegetali, è teoricamente possibile generare il callo a partire anche da una singola cellula differenziata. Al contrario, a partire dal callo è possibile promuovere la rigenerazione di componenti della pianta come radici e germogli, e, in condizioni appropriate e in cellule specifiche, persino dell'intera pianta. [36]

### **Callo vegetale: Classificazione**

Dal punto di vista morfologico, i calli vegetali, nonostante la loro elevata eterogeneità, possono essere suddivisi in sottogruppi in base alle caratteristiche macroscopiche. In particolare, i calli che mostrano una apparente mancanza di organi rigenerati possono essere distinti, in base alle caratteristiche tissutali, come friabili o compatti. Al contrario, i calli che presentano la rigenerazione di organi sono classificati come radicolari, germogliari o embrionali, a seconda dell'organo generato. [57]

### **Callogenesi**

Il processo che determina la formazione del callo viene generalmente indicato con il nome di callogenesi. Come precedentemente accennato, questo processo deriva dalla dedifferenziazione delle cellule presenti nell'espianto. Tuttavia, con dedifferenziazione si indica il processo che determina l'acquisizione di una maggiore potenza cellulare, componente fondamentale del callo, ma non è idoneo nell'indicare la genesi dello stesso. Questo perché la dedifferenziazione, in senso stretto, è definita come l'inverso della differenziazione, processo in cui modifiche di carattere epigenetico determinano la soppressione di geni correlati alla pluripotenza (o totipotenza) e l'espressione di geni del lignaggio specifico. Tutto ciò avviene però nell'ambito della medesima linea o destino cellulare. Nel caso specifico del callo

questo discorso non è applicabile, in quanto le cellule differenziate, presenti nell'espianto, non sono state originate dal callo stesso. Per tal motivo, la transdifferenziazione, con la quale si definisce ogni cambiamento del destino cellulare indipendentemente dalla potenza di sviluppo, può descriverne la genesi in maniera più idonea. Tuttavia, in biologia vegetale, una transdifferenziazione che comporta un maggiore potere di sviluppo è spesso indicata come dedifferenziazione, specialmente durante la formazione del callo. La formazione del callo, dunque non è un passo indietro nella linea evolutiva ma bensì il risultato di una transdifferenziazione ed una proliferazione eccessiva di cellule differenziate. [58]

Per comprendere i processi ed i meccanismi molecolari alla base della callogenesi sono stati condotti studi su *Arabidopsis Thaliana*, una pianta geneticamente semplice da trattare. Attraverso le analisi genetiche di specie mutanti è stato infatti possibile determinare gli stimoli alla base di questo processo. Tra questi, quelli predominanti all'induzione del callo sono risultati essere: l'utilizzo di fitormoni ectopici, come auxina, citochinina ed analoghi; La ferita o lesione causata alla pianta; L'acquisizione del destino embrionale o meristemato. Seppur differenti, tutti questi processi convergono nel determinare la riacquisizione della competenza proliferativa. Questa competenza viene indotta attraverso il ripristino del ciclo cellulare, processo governato da diversi regolatori come le CYCLIN (CYC) o le CYCLIN-DEPENDENT KINASES (CDK). [57]

Il processo maggiormente utilizzato per decretare l'induzione del callo in vitro vede coinvolto l'utilizzo di fitormoni esogeni. Tra questi, i principali sono Auxina e Citochinina ed i rispettivi analoghi. Terreni presentati questi fitormoni vengono definiti come terreni induttori di callo (Callus-inducing medium, CIM). L'equilibrio tra auxine e citochinine determina lo stato di differenziazione e dedifferenziazione o riprogrammazione. In generale, un rapporto intermedio di auxine e citochinine promuove il processo callogenico, mentre un alto rapporto auxine/citochinine o citochinine/auxine induce, rispettivamente, la rigenerazione della radice e del germoglio. Attraverso studi condotti sull'*Arabidopsis thaliana*, si è evinto che il CIM induce la formazione del callo attraverso la via genetica che media l'inizio della radice laterale [57]

I meccanismi molecolari alla base della callogenesi fitormonale vedono coinvolte le risposte nei confronti dell'auxina e della citochinina. Similmente a quanto accade nello sviluppo della radice laterale, l'auxina porta alla degradazione di IAA14, un repressore Aux/IAA della segnalazione dell'auxina, e alla successiva attivazione di *AUXIN RESPONSE FACTOR7* (ARF7) e ARF19, due attivatori trascrizionali che aumentano l'espressione dei geni appartenenti alla famiglia LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN(LBD): LBD16, LBD17, LBD18 e LBD29. Questi LBD regolano i processi cellulari associati all'iniziazione delle radici o alla formazione del callo. Nello specifico, LBD18 e LBD33 formando un complesso eterodimerico, attivano l'espressione del fattore di trascrizione E2 PROMOTER BINDING FACTOR A (E2Fa). E2Fa è uno dei sei fattori di trascrizione E2F che, in *Arabidopsis*, dimerizzando con proteine DIMERIZATION PARTNER (DP), promuove la trascrizione di geni necessari per la replicazione del DNA. LBD18, LBD16 e LBD29 determinano l'aumento dell'espressione di EXPANSIN 14 (EXP14), FAD-BD e PECTIN METHYLESTERASE 2 (PME2), rispettivamente, che inducono modifiche alla parete cellulare, necessaria per l'insorgenza del processo mitotico [59]. Inoltre, gli ARFs determinano l'attivazione di WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 11 (WOX11). Questo mediatore, insieme al suo stretto omologo WOX12, fisiologicamente promuove la conversione del destino cellulare durante il processo di rigenerazione delle radici. [59]

Particolarmente rilevante nella formazione del callo è il processo di riacquisizione della pluripotenza. La pluripotenza viene indotta dall'auxina attraverso l'aumento dell'espressione dei mediatori PLT3, PLT5 e PLT7. Questi mediatori inducono a loro volta i regolatori del meristema radicale PLT1 e PLT2 ed i fattori di trascrizione che promuovono i germogli CUP-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1) e CUC2 a trasmettere competenza. [59]

La citochinina è invece associata al processo callogenico mediante il coinvolgimento di fattori di trascrizione noti come ARABIDOPSIS REGULATORY RESPONSE (ARR) di tipo B. Infatti, la sovraespressione di ARR1 in terreni contenenti citochinina determina la formazione di callo in *Arabidopsis*. Nello specifico, gli ARRs promuovono il ripristino del ciclo cellulare attraverso l'attivazione di CYCD3, mediatore risultato sovraespresso in seguito al trattamento con citochinina esogena. Altri possibili mediatori, risultati sovraespressi dalla citochinina, coinvolti nel processo

callogenico sono i fattori di trascrizione AP2/ERF ENHANCED SHOOT REGENERATION (ESR), ESR1 ed ESR2. La sovraespressione di questi fattori, infatti ha determinato la formazione di callo anche in assenza di ormoni vegetali esogeni. Infatti, le proteine ESR sono correlate a cambiamenti del ciclo cellulare. Più nello specifico, ESR2 determina l'aumento dell'espressione di *CYCD1*;1 e del fattore di trascrizione DOF *OBF BINDING PROTEIN1 (OBP1)*. Il gene *OBP1* induce un ripristino del ciclo cellulare attraverso una riduzione della durata della fase G1. Inoltre, l'aumento dell'espressione di OBP1 determina un upregolazione di molti geni correlati al ciclo cellulare. Nello specifico, lega direttamente la sequenza promotore di *CYCD3*;3, promuovendone l'espressione ed induce il fattore di trascrizione *atDOF2*;3 specifico per la replicazione (Fase S). [60]

#### **5.1.4: Selezione delle linee cellulari**

Dopo la selezione del genotipo della pianta e l'induzione del processo callogenico da diversi espianti della madre, i calli presentanti linee cellulari a rapida crescita ed un'elevata produzione vengono sospesi in un mezzo liquido idoneo in condizione controllate. [61]

Tuttavia, l'espianto della pianta madre utilizzato nel processo potrebbe decretare una produttività metabolica eterogenea. Questa eterogeneità tenderebbe ad aumentare a causa delle variazioni geniche che possono manifestarsi durante la coltivazione della pianta in condizioni controllate. Ciò potrebbe comportare una possibile riduzione della produzione di SM. Le variazioni possono essere attenuate od eliminate attraverso la selezione ed il clonaggio di popolazioni cellulari ad alto rendimento da colture eterogenee.[3][61]

I metodi di screening delle linee cellulari ad alto rendimento sono diversi a seconda della specie di piante e del tipo di SM prodotto. Le linee cellulari che producono SM colorati come berberina, betanina e shikonin possono essere facilmente selezionate dalla massa cellulare separando le aree colorate dal resto della massa cellulare. Le linee cellulari che producono SM fluorescenti possono essere identificate mediante microscopio fluorescente o citometria a flusso, aiutando così nella sua rapida identificazione e separazione. In alcuni altri casi, le linee cellulari incolori ad alto rendimento possono essere sottoposte a screening con metodi immunologici.[3]

Tuttavia, la selezione effettuata mediante analisi della produzione di biomassa di linee cellulari, sia di calli che di sospensioni cellulari, seguita dalla quantificazione dei metaboliti mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC) è considerata la strategia di elezione [61]

Particolarmente rilevante risulta essere anche l'analisi della stabilità della linea cellulare. Infatti, alcune modifiche genetiche possono presentarsi spontaneamente nel corso delle generazioni. Queste potrebbero decretare la riduzione della produttività del processo in termini di biomassa o SM. Per tal motivo è necessaria la continua selezione e mantenimento delle linee cellulari presentanti maggiore stabilità.[3] Nonostante questi accorgimenti, l'efficienza produttiva risulterà comunque compromessa in seguito a periodi di cultura protratti. Per questo motivo, vengono impiegate strategie alternative per migliorare la produzione di SM, comprese le strategie di ingegneria trascrizionale e metabolica. In tal modo è possibile protrarre la coltivazione per intervalli di tempo maggiori decretando un rendimento più elevato.[3]

### **5.1.5: Allestimento di sospensioni cellulari in scala di laboratorio**

Le linee cellulari derivanti dai calli selezionati costituiscono l'inoculo utilizzato per avviare lo sviluppo delle colture cellulari. In dettaglio, gli aggregati cellulari presenti nei calli friabili vengono trasferiti in un terreno di coltura liquido, dove, attraverso l'agitazione, si disgregano formando agglomerati più piccoli o addirittura singole cellule. [62]

La densità dell'inoculo è un parametro cruciale che influenza le colture di cellule vegetali, con una densità minima di inoculazione al di sotto della quale si osserva un'inibizione o un ritardo nella crescita. La densità dell'inoculo può essere ridotta attraverso il condizionamento del terreno, anche se le basi chimiche di questo processo sono ancora in gran parte empiriche e non completamente definite. In generale, la densità dell'inoculo più adatta per stabilire sospensioni cellulari e promuovere la produzione di metaboliti secondari si attesta intorno a un valore di circa 10 g/L. [3]. Tuttavia, durante processi di scale-up in bioreattori l'inoculo deve essere costituito dal 10-15% del volume totale del bioreattore stesso. Per via di questa limitazione la sospensione cellulare deve essere in primo luogo allestita in scala da laboratorio, principalmente in beuta o altri contenitori idonei (1-2L). [63]

Questa fase ha l'ulteriore scopo di andare a valutare i parametri di coltura e le condizioni ambientali ottimali prima di un possibile scale-up in bioreattori. Tuttavia, l'allestimento della sospensione cellulare in scala da laboratorio permette il controllo di determinati parametri come il pH, la temperatura e la concentrazione di substrati solo all'inizio ed alla fine del processo.

### **5.1.6: Ottimizzazione delle condizioni colturali e ambientali**

L'ottimizzazione dei parametri di coltura rappresenta una pratica essenziale nelle applicazioni delle cellule vegetali in vitro. Definendo le condizioni più adatte, è possibile aumentare la produttività di una specifica specie vegetale per un dato processo di produzione. In particolare, sia il processo di genesi del callo che l'instaurazione di sospensioni cellulari richiedono un controllo accurato delle condizioni di coltura. Queste condizioni possono essere modulate variando la composizione chimica del terreno (parametri chimici), stabilendo un ambiente controllato (parametri fisici) e regolando l'agitazione (parametro meccanico). Al contrario, l'utilizzo di parametri non ottimali potrebbe comportare un deterioramento o, in alcuni casi, un fallimento del processo. [3][61]

#### **Parametri chimici**

I parametri chimici rappresentano un insieme di variabili regolabili all'interno del terreno di coltura, caratterizzate dalla composizione qualitativa e quantitativa dei nutrienti disciolti. La manipolazione di tali variabili consente di creare mezzi nutritivi molto eterogenei. Di conseguenza, la selezione del terreno di coltura, delle fonti di carbonio, azoto e fosfato, così come dei regolatori della crescita e del pH, permette di definire le condizioni colturali più adatte alle esigenze specifiche.

#### **Composizione del terreno di coltura**

La selezione del terreno di coltura rappresenta il fondamento della produzione di colture cellulari in vitro. Il terreno fornisce tutte le sostanze nutritive necessarie per la sopravvivenza, la crescita e, eventualmente, la produzione di metaboliti secondari

della pianta. Pertanto, la composizione del terreno viene attentamente valutata in base alle esigenze fisiologiche e metaboliche della varietà di pianta coltivata e al processo di produzione coinvolto. I terreni differiscono per la tipologia e la concentrazione di nutrienti, ma quelli più comunemente utilizzati includono Murashige e Skoog (MS), Gamborg (B5), Linsmaier e Skoog (LS), e Schenk Hildebrandt (SH). Una volta selezionato il tipo di terreno più adatto, è importante valutare la forza salina necessaria, ovvero la concentrazione di nutrienti rispetto ai valori standard del terreno. La corretta concentrazione di nutrienti è cruciale nei processi produttivi. Tuttavia, la composizione di base del terreno, indipendentemente dalla forza salina, potrebbe non contenere tutte le sostanze nutritive necessarie per la sopravvivenza, lo sviluppo e la produzione di metaboliti secondari, nonché per l'induzione del processo callogenico e la formazione di sospensioni cellulari. Per questo motivo, spesso è necessario apportare integrazioni aggiuntive. [3]

Calli e sospensioni di mela sono stati ottenuti efficacemente attraverso l'impiego di terreni MS [50][51][52][53][55] e B5 [54].

### **Fonte di carbonio**

Le colture in vitro di cellule, tessuti e organi vegetali non sono completamente autotrofiche, pertanto richiedono di essere coltivate eterotroficamente utilizzando fonti di carbonio per la produzione di energia, il mantenimento del potenziale osmotico e la crescita e lo sviluppo delle piante. Le fonti di carbonio sono indispensabili per la crescita cellulare, l'induzione di radici e germogli, l'embriogenesi e l'organogenesi. Un'ampia gamma di fonti di carbonio, tra cui zuccheri (riducenti e non riducenti) e alcoli di zuccheri, può essere impiegata a questo scopo. Tra queste fonti, il saccarosio, a una concentrazione del 2-5%, è quella più comunemente utilizzata. Altre fonti di carbonio spesso impiegate includono glucosio, lattosio, galattosio, maltosio e amido. Il glucosio ha effetti simili al saccarosio, mentre il fruttosio, pur essendo una buona fonte di carbonio, risulta essere meno efficace del glucosio. [3] Inoltre, in alcuni casi la pressione osmotica generata dagli zuccheri ha contribuito alla produzione di SMs [61]. Tuttavia, è opportuno specificare che l'efficacia della fonte di carbonio dipende prettamente dalla specie di pianta e dalla produttività di SM.

Le concentrazioni di 30g L<sup>-1</sup> (3%p/v) e 66,7mM di Saccarosio sono stati aggiunte a terreni per la l'induzione del callo e sospensioni cellulari di mela, rispettivamente, di Granny Smith-MM106 e di McIntosh-Liberty. [50][54][55]. 15g L<sup>-1</sup> (1.5% p/v) sono invece stati usati nel terreno per l'induzione di callo e rigenerazione di mela selvatica (*Malus sieversii*) [52].

### **Fonte di azoto**

L'azoto è un elemento essenziale per la sintesi di amminoacidi, basi azotate, lipidi e composti organici. Inoltre, svolge un ruolo cruciale nella crescita, nello sviluppo vegetativo, nella riproduzione e soprattutto nella produzione di metaboliti. Di conseguenza, la scelta di una fonte di azoto adeguata, a concentrazione appropriata, è un elemento chiave nei processi di produzione di metaboliti secondari. L'azoto può essere introdotto sotto forma di ioni ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) attraverso fonti organiche o inorganiche. In particolare, il rapporto NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, variabile in base alle esigenze specifiche, assume un'importanza significativa. Tuttavia, in alcuni casi, una maggiore produzione di metaboliti secondari è stata associata a una riduzione o eliminazione della fonte di azoto. [3][61]

### **Livelli di fosfato**

Il fosforo è uno dei componenti necessari in quantità considerevoli per il metabolismo delle piante, costituendo il principale componente degli acidi nucleici e dei fosfolipidi. Questi svolgono un ruolo fondamentale nella produzione sia dei metaboliti primari che secondari, oltre a partecipare al metabolismo energetico. La concentrazione di fosfato nel terreno ha determinato risposte differenziate a seconda del tipo di coltura. In alcune piante, l'aumento dei livelli di fosfato ha mostrato un incremento nella resa dei metaboliti secondari, mentre in altre è stata la riduzione a produrre tale effetto. [3] [61]

### **Regolatori della crescita delle piante**

La classe dei regolatori della crescita comprende i fitormoni vegetali che svolgono un ruolo nella crescita, nella proliferazione, nella formazione di biomassa e nell'accumulo

di metaboliti. Questi fitormoni sono essenziali per l'induzione del callo vegetale e la rigenerazione di radici, germogli ed embrioni da cellule differenziate. Tra i fitormoni più comunemente utilizzati nelle colture di cellule e tessuti vegetali si annoverano auxine, citochinine e gibberelline. La concentrazione, la combinazione e il rapporto di auxine e citochinine regolano l'induzione e l'efficienza di vari processi vegetali [3]. Le auxine, ad esempio, sono regolatori della crescita che inducono la formazione di callo a concentrazioni moderate. Concentrazioni elevate stimolano la rigenerazione dei germogli, mentre concentrazioni basse promuovono la rigenerazione delle radici, l'embriogenesi somatica e, in alcuni casi, migliorano la produzione di metaboliti secondari. Tra le auxine più comunemente utilizzate vi sono l'acido indolo-3-acetico (IAA), l'acido indolo-3-butirrico (IBA), l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e l'acido naftaleneacetico (NAA). [3][61]

Le citochinine, invece, sono fitormoni che stimolano la divisione cellulare e inducono la formazione e la proliferazione di germogli. Quelle comunemente più adoperate sono: 6-Benziladenosina (BA), 6-Benzilamminopurina(6-BAP), 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilallilammino) purina, 2-isopenteniladenina (2-iP), cinetina(Kin), zeatina e Thidiazurone (TDZ). Tuttavia, ogni citochinina può avere un effetto differente a seconda della varietà vegetale. [3][61] Infine, le gibberelline (GA), invece, migliorano la crescita del callo e prendono parte all'allungamento dei germogli. La gibberellina più comunemente usata è l'acido gibberelico. [3][61]

Diverse combinazioni di fitormoni sono state applicate al fine di ottenere calli e sospensioni cellulari da espianti di mela. In espianti di polpa di Granny Smith sono stati condotti due esperimenti con design randomizzato: Il primo con combinazione di 0, 1, 2, e 3 mg L<sup>-1</sup> di 2,4-D e 0, 0.5 e 2 mg L<sup>-1</sup> di 6-BA; il secondo con combinazioni di 1, 2 e 3 mg L<sup>-1</sup> di 2,4-D e 0, 0.5 e 1 mg L<sup>-1</sup> di Kin. I risultati hanno evidenziato che la combinazione 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D e 1 mg L<sup>-1</sup> 6-BA ha decretato una più rapida insorgenza del callo (6.6 giorni) ed un peso fresco e secco maggiore (rispettivamente 2.754 g e 0.37 g) nel primo esperimento, mentre la combinazione 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D e 1 mg L<sup>-1</sup> Kin del secondo esperimento è risultata la migliore nei medesimi parametri. I calli del primo esperimento sono poi stati utilizzati come inoculo per l'istaurazione di sospensioni cellulari in terreno integrato con 1 mg/L 2,4-D e 1 mg L<sup>-1</sup> 6-BA [50]. Gli espianti di foglie della varietà Golden Delicious sono stati con terreni integrati con combinazioni di BA (0,5-1,25 mg L<sup>-1</sup>), NAA (0,4-1,25 mg L<sup>-1</sup>), IBA (0,0-1,25 mg L<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>), e Kin (1,0-2,0 mg L<sup>-1</sup>) per l'induzione del callo e la rigenerazione dei germogli. il tasso più elevato di successo è stato associato al terreno contenente 1 mg L<sup>-1</sup> BA e 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA [51]. I calli e le sospensioni cellulari di pianta di melo McIntosh e Liberty sono invece stati ottenuti utilizzando terreno integrato con 9,0 µM di 2,4-D, 4,9 µM di IBA, 0,5 µM di Kin [55]. Espianti di stelo e foglie di mela selvatica (*Malus sieversii*) invece stati trattati con combinazione continenti varie concentrazioni di TDZ (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg L<sup>-1</sup>) o 6-BA (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg L<sup>-1</sup>) con NAA (0, 0.5, 1, 1.5, 2, mg L<sup>-1</sup>) per l'induzione del callo e la rigenerazione dei germogli. I risultati hanno mostrato che i terreni più efficienti nella rigenerazione dei germogli erano integrati con 4,0 mg di L<sup>-1</sup> TDZ e 1,0 mg L<sup>-1</sup> NAA per espanti fogliari e 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA senza NAA per espanto di stelo. [52]. Nella mela MM106 gli espanti di internodi in terreno 6,8 M 2,4-D, 0,9 M BA ha invece decretato l'induzione del callo [54]. Calli di cotiledoni di mela (*Pyrus malus*) sono invece stati ottenuti con diverse concentrazioni di BA (0, 1, 2, 3 mg L<sup>-1</sup>). Tra queste la più efficiente è risultata essere quella di 1mg L<sup>-1</sup> [53].

## pH

La concentrazione di ioni idrogeno nei mezzi influisce sulla crescita delle piante. In generale, l'intervallo di pH utilizzato varia da 5 a 6. L'impiego di valori estremamente acidi o basici non è compatibile con lo sviluppo delle cellule vegetali. Tuttavia, il valore di pH cambia costantemente durante le colture a causa dell'assorbimento dei nutrienti e della generazione di biomassa, rendendo difficile mantenere lo stesso valore iniziale in assenza di bioreattori [3][61]. Il pH può anche essere utilizzato come strategia per indurre il rilascio di prodotti secondari nel terreno di coltura. Infatti, a determinati valori, dipendenti dalla specie vegetale in questione, può causare l'alterazione della permeabilità della membrana cellulare. [61]. Nei processi di formazione del callo e sospensioni cellulari da mela, il pH utilizzato è stato incluso in un intervallo che va da 5.6 a 5.8 con una maggior incidenza di quest'ultimo valore. [50][51][52][53][54][55]

## **Parametri Fisici**

I parametri fisici generalmente si riferiscono all'insieme di variabili che contribuiscono a stabilire un ambiente controllato. Questo ambiente è finalizzato a migliorare e, per quanto possibile, standardizzare il processo di coltura. L'ottimizzazione di parametri come la temperatura e l'irraggiamento luminoso è fondamentale per influenzare l'induzione del callo, la produzione di biomassa e la biosintesi di metaboliti secondari.

### **Temperatura**

Generalmente una temperatura compresa tra 17 e 25 °C si è dimostrata ottimale per processi come colture di callo e sospensioni cellulari. Tuttavia, ogni specie di pianta presenta regimi di crescita e metabolismo ottimali a diversi intervalli di temperatura [3][61]. Nel caso specifico della formazione di calli e sospensioni cellulari di mela, la temperatura utilizzata è risultata in tutti i casi uguale a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . [50][51][52][53][54][55]

### **Irraggiamento luminoso**

La luce è un fattore significativo nei processi biotecnologici vegetali, agendo sia come fonte energetica che come elicitore sulla produzione di alcuni metaboliti secondari (SM). In particolare, è stato osservato un aumento dell'espressione di geni appartenenti alle vie biosintetiche di alcaloidi, flavonoidi, cardenolidi e betacianine in risposta all'irraggiamento luminoso. Al contrario, tale irraggiamento inibisce metaboliti secondari come nicotina, shikonina e monoterpeni. Va sottolineato che questi effetti dipendono e possono variare in base alla specifica coltura. Tuttavia, manipolando la qualità, l'intensità e il regime di esposizione alla luce, è possibile ottimizzare la produzione di metaboliti secondari. [3][61]

Attraverso tre esperimenti è stato studiato comparativamente l'effetto di sette qualità di luce sulla formazione, crescita e morfogenesi del callo di mela MM106 e sulle colture in sospensione cellulare. Nel primo esperimento sono state confrontate le qualità di luce blu (B), bianca (W), rossa (R) e oscurità (D), poste alla medesima intensità ( $20 \pm 2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). I risultati hanno mostrato che la luce rossa, seguita da

quella bianca, hanno decretato una maggior produzione ed incremento di peso fresco di callo. Diversamente, la luce blu e il buio sono state correlate ad una bassa produzione. La morfologia dei calli appariva in tutti i casi friabile, indipendentemente dalla luce. Tuttavia, quando la crescita del callo ha iniziato a diminuire è apparso un colore rosso, in particolare con luce W. Sotto il trattamento al buio il callo è rimasto bianco e morbido per tutto il periodo di coltura.

Nel secondo esperimento sono state valutate le medesime qualità di luce del primo esperimento con l'aggiunta del rosso lontano (Fr), del rosso lontano + blu (Fr + B) e del rosso + blu (R + B). Anche in questo caso sono stati confermati i risultati delle qualità di luce del primo esperimento (B, W, R, D) mentre Fr+B presentava una crescita superiore rispetto a B e R+B una inferiore rispetto a R. Da ciò è stato possibile dedurre un effetto inibitorio della luce B e stimolatorio della luce Fr. Infine, questi risultati sono stati confermati anche nell'ultimo esperimento valutando la produzione di biomassa in sospensioni cellulari. [54]

Quanto al fotoperiodo le varietà di mela Granny Smith, Golden Delicious, Malus sieversii, MM106 sono state coltivate in vitro con regime 16h luce e 8h buio [50][51][52][53][54]. Diversamente le varietà McIntosh e Liberty al buio [55].

### **Parametri Meccanici: Agitazione**

La miscelazione delle colture contribuisce alla formazione di dispersioni cellulari omogenee e ciò previene la competizione verso i nutrienti delle fasi liquide e gassose, contribuendo ad aumentarne l'assorbimento. Inoltre, permette di disperdere meglio le bolle d'aria aumentando l'efficacia dell'ossigenazione. Dal punto di vista reologico, sebbene le cellule vegetali posseggano una maggior resistenza alla trazione rispetto ad altre tipologie cellulari, la loro sensibilità allo sforzo di taglio verso le sollecitazioni idrodinamiche limita l'utilizzo di una elevata velocità di agitazione. L'applicazione di un elevato sforzo e tempo di taglio contribuiscono a ridurre le dimensioni dell'aggregazione cellulare e favoriscono una buona miscelazione ma, contemporaneamente, presentano un effetto negativo sulla vitalità cellulare. Per questo motivo le cellule vegetali sono spesso coltivate in agitatori radiali o in bioreattori a serbatoio agitato con velocità di agitazione basse. [61]

Le sospensioni cellulari di espianti di mela Granny Smith, Liberty, McIntosh sono state mantenute sotto agitazione a 120rpm [50][55]. Diversamente l'agitazione delle sospensioni di mela MM106 è avvenuta a 70 rpm [54].

### **5.1.7: Ottimizzazione della produzione di metaboliti secondari**

La biosintesi di metaboliti secondari (SM) è influenzata da fattori biotici e abiotici, e ottimizzare questi fattori può avvenire in due fasi distinte: l'accumulo di biomassa e la produzione di SM. Durante la fase di accumulo della biomassa (fase logaritmica), è possibile regolare parametri chimici, fisici e meccanici, come descritto in precedenza. Nella fase biosintetica di SM, possono essere adottate strategie come l'alimentazione dei precursori e l'elicitazione [3]. In particolare, la produzione di SM da parte delle cellule vegetali avviene nella fase stazionaria, al termine della fase logaritmica. Pertanto, il trattamento con precursori ed elicitori in questo momento determina l'inizio della produzione di SM. Al contrario, l'applicazione di questo trattamento durante l'inizio della fase logaritmica potrebbe aumentare la produzione di SM senza un aumento concomitante della biomassa, risultando in una bassa produttività complessiva. [3][61]

### **Alimentazione dei precursori**

La biosintesi di SM coinvolge diverse reazioni che convertono metaboliti delle vie primarie in SM. L'alimentazione dei precursori consiste nell'aggiunta esogena di metaboliti (precursori) utilizzati come substrato per la via biosintetica del SM di interesse. L'utilizzo dei precursori facilita l'induzione e l'aumento della sintesi dei SM. Tuttavia, il tipo, la concentrazione dei precursori e il momento della loro aggiunta sono parametri che devono essere attentamente considerati. I composti utilizzati dipendono dalla tipologia di coltura e, in particolare, dalla via biosintetica specifica del SM di interesse. Gli amminoacidi rappresentano un esempio economico di precursori potenzialmente impiegati. [3][61]

## **Elicitazione**

Con elicitazione si fa generalmente riferimento all'impiego di uno stimolo stressante per indurre un aumento della sintesi di SM. I metaboliti secondari, infatti, sono prodotti in risposta a variazioni fisiologiche o metaboliche innescate dalla pianta come meccanismo di risposta a stimoli stressanti di varia natura. Gli elicitori, emulando queste condizioni di stress, stimolano risposte ad esse associate. Questi stimoli possono essere classificati in biotici e abiotici in base alla loro natura. La scelta e la concentrazione dell'elicitore dipendono fondamentalmente dalla tipologia di specie e varietà vegetale, e soprattutto dal metabolita di cui si sta ottimizzando la produzione. Inoltre, il tempo e il momento di esposizione all'elicitore sono particolarmente rilevanti, poiché possono avere un effetto negativo sulla proliferazione cellulare con conseguente perdita di biomassa. Per questo motivo, simili ai precursori, gli elicitori vengono aggiunti successivamente alla produzione di biomassa massimale per non interferire sulla produttività stessa. [3]

## **Elicitori abiotici**

Le sostanze che non sono di origine biologica, come fattori fisici e chimici sono definite elicitori abiotici. Diversi stress ambientali come variazioni di temperatura, luce, salinità, composizione di metalli pesanti, hanno un impatto prominente sulla produzione di metaboliti bioattivi delle piante. Per tal motivo, questi stimoli possono essere impiegati per l'ottimizzazione della produzione di SM.[3]

## **La luce**

La luce rappresenta uno dei principali fattori che influenzano il metabolismo primario e secondario delle piante. Selezionando l'intensità luminosa ottimale e una lunghezza d'onda specifica adatta alla coltura vegetale in questione, è possibile ottenere un significativo aumento della produzione di SM. Di conseguenza, standardizzare la qualità e la quantità dell'esposizione luminosa si è dimostrato essere una strategia ottimale per incrementare la produttività. [3][61]

## **Lo stress salino**

È stato notato che l'impiego di improprie pratiche di irrigazione e l'abuso di pesticidi e fertilizzanti hanno comportato un aumento della salinità all'interno del suolo. Ciò ha spinto le piante a sviluppare modifiche metaboliche allo scopo di adattarsi e garantire la sopravvivenza. In risposta allo stress salino, le piante hanno manifestato un aumento del metabolismo secondario, con conseguente accumulo di metaboliti secondari (SM). Lo stress salino causa la perdita di stabilità della membrana, altera l'omeostasi e interrompe l'equilibrio nutrizionale, influenzando sia l'attività metabolica primaria che inducendo quella secondaria. [3]

Calli e sospensioni cellulari hanno prodotto una maggiore resa in contenuto di SM in seguito al trattamento di diverse concentrazioni saline, in particolare NaCl. [3]

Inoltre, alcuni sali come il cloruro di calcio e il cloruro di sodio sono stati indentificati come possibili induttori di segnale lo stimolo del metabolismo secondario. Gli effetti induttori dello ione calcio e dello ione sodio sulla via di segnalazione intracellulare del calcio sono stati ben dimostrati in colture cellulari di piante e funghi per la produzione di metaboliti secondari [61]

## **Metalli pesanti**

Le piante generalmente richiedono nutrienti essenziali in tracce, come  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , che agiscono come cofattori per l'attività enzimatica, sono coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici e partecipano ai processi di crescita e differenziazione delle cellule vegetali. Tuttavia, concentrazioni elevate di questi ioni metallici possono avere un effetto inibitorio sulla proliferazione vegetale, stimolando invece la produzione di metaboliti secondari (SM). Inoltre, l'aggiunta di ioni insoliti come cerio ( $\text{CeO}_2$ ), ittrio ( $\text{Y}_2\text{O}_3$ ), neodimio ( $\text{NdCl}_3$ ) e lantanio ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ) al mezzo di coltura è stata associata a un aumento della sintesi di SM. Infine, metalli pesanti come  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  agiscono anch'essi come potenti elicitatori per la produzione di SM. [3][61].

## **Lo stress termico**

La biosintesi di metaboliti secondari (SM) è soggetta a una regolazione e un'espressione specifiche del tessuto. L'espressione dei geni associati a vie biosintetiche specifiche, che convergono sulla sintesi di SM, è modulata da vari stimoli ambientali, come la temperatura. Le piante, quando coltivate a temperature estreme, manifestano effetti fisiologici e metabolici negativi. In risposta a queste variazioni termiche, le piante producono alcuni SM come parte di una risposta adattativa a queste condizioni. [3][61]

## **Elicitori biotici**

Gli elicitori biotici sono rappresentati da biomolecole come proteine, glicoproteine, oligosaccaridi e acidi grassi derivate da organismi vegetali o patogeni come funghi, lieviti, virus e batteri [3]

## **Molecole di segnalazione**

Gli ormoni vegetali fungono da molecole segnale che, in seguito al legame con specifici recettori presenti sulla superficie della cellula vegetale, inducono cascate di trasduzione del segnale convergenti nell'espressione di geni coinvolti nella biosintesi dei SM. [3]

Tra questi particolare rilevanza assume l'acido salicilico (SA), un fenolo vegetale fisiologicamente coinvolto nell'attività metabolica, nella crescita e nello sviluppo complessivo delle piante. Questo composto regola l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi di metaboliti secondari come gli enzimi fenilalanina ammoniaca liasi (PAL) e isocorismati sintasi. Inoltre, stimolando ulteriormente la biosintesi di metaboliti secondari interagendo con altre molecole di segnalazione come jasmonato e ossido nitrico e nel processo di tolleranza verso lo stress abiotico. Questo converge in un aumento della sintesi di composti come triterpenoidi, polifenoli e oli essenziali [64][65].

Un altro composto impiegato come elicitante è il metil-jasmonato (MeJA), un estere metilico volatile dell'acido jasmonico coinvolto in diverse funzioni morfologiche e molecolari delle piante. La sua natura volatile, unita alla capacità di permeare

attraverso le membrane biologiche, permette a questo composto di facilitare la comunicazione tra l'interno e l'esterno della pianta, determinando risposte difensive come l'aumento di antiossidanti. Per tal motivo, il MeJA viene impiegato come elicitore per l'aumento della biosintesi di composti antiossidanti. [65]

Anche l'utilizzo di acidi grassi polinsaturi (PUFA) ha determinato un aumento di metaboliti secondari in colture in sospensione. [61]

### **Estratto di lievito**

L'estratto di lievito (YE) esercita un potere elicitorio grazie alla presenza di composti come chitina, oligomeri di N-acetil-glucosamina,  $\beta$ -glucano, glicopeptidi ed ergosterolo che stimolano le risposte difensive della pianta convergenti nella biosintesi di metaboliti secondari. Questo determina un aumento della produzione di fitocomplessi come polifenoli [66][67] e triterpenoidi [68]. Per questo motivo e per la facile reperibilità ed il basso costo l'estratto di lievito, risulta essere uno degli elicitori maggiormente utilizzati.

Nello specifico, l'elicitazione avvenuta con 3 g/L di YE ad una settimana dalla crescita ha determinato un aumento di fenoli come acido clorogenico, acido 4-cumarico, acido ferulico, acido benzoico e rutina in colture di mela (*Malus domestica cv. Florina*) [66]. Analogamente, il trattamento con 0.1g/L di YE ha aumentato mediamente di due volte la produzione di acidi fenolici in colture di mela (*Malus domestica cv. Borkh*) [67].

### **Immobilizzazione**

L'immobilizzazione di cellule vegetali attraverso l'uso di una matrice adatta è una strategia impiegata per superare i problemi correlati alla bassa resistenza allo sforzo di taglio e la tendenza all'aggregazione cellulare.

I vantaggi dell'immobilizzazione includono:

1. un aumento della vitalità cellulare in fase stazionaria, consentendo il mantenimento della biomassa per un periodo di tempo prolungato;
2. un'elevata densità cellulare all'interno di bioreattori relativamente piccoli decretando costi e rischi di contaminazione ridotti
3. riduzione dello sforzo di taglio

4. aumento dell'accumulo di prodotto
5. minimizzazione della viscosità del fluido che nelle sospensioni cellulari causa problemi di miscelazione e aerazione.

Esistono due metodi principali per l'immobilizzazione cellulare: (a) intrappolamento del gel e (b) immobilizzazione superficiale. La tecnica ampiamente utilizzata per l'immobilizzazione comporta l'intrappolamento delle cellule in un gel specifico o in una combinazione di gel, che polimerizzano attorno alle cellule. L'alginato di calcio è la matrice più utilizzata, oltre a questo, sono stati utilizzati anche agar, agarosio, gelatina, carragenina e poliacrilamide. La matrice utilizzata per l'intrappolamento cellulare dovrebbe essere non tossica per le cellule, dovrebbe mostrare una buona attività di polimerizzazione e dovrebbe essere più economica. L'immobilizzazione superficiale è un altro metodo che sfrutta la propensione delle cellule vegetali in coltura ad aderire a superfici inerti immerse nel liquido. L'immobilizzazione ha scaturito aumenti di rese notevoli che vanno dalle 3 alle 100 volte di SM rispetto a cellule non immobilizzate [3][61].

#### **5.1.8: Scale-up in bioreattori**

Ottimizzati i parametri chimici, fisici e meccanici, la produttività di biomassa e di metaboliti secondari può essere incrementata attraverso lo scale-up in bioreattori. Un bioreattore viene generalmente definito come un'apparecchiatura capace di fornire un ambiente adeguato alla crescita di organismi biologici. Il bioreattore permette, infatti, il controllo costante di alcuni parametri come il pH, la temperatura e la concentrazione di substrati. Inoltre, i bioreattori si suddividono in base alla capacità di mantenere la sterilità: bioreattori asettici, impiegati nelle coltivazioni vegetali, e non asettici. Generalmente, un bioreattore permette di esercire importanti funzioni quali: escludere l'ingresso di organismi contaminanti; contenere gli organismi desiderati; mantenere il volume della coltura costante; mantenere il livello di ossigeno e anidride carbonica disciolti al di sopra dei valori critici di areazione; controllare costantemente parametri come temperatura e pH; consentire una buona miscelazione della coltura. In base al volume contenuto essi possono categorizzati in bioreattori in scala da laboratorio(1-10L), scala pilota (50-1000L) e scala industriale (100000-300000L). [63]

## Scelta del bioreattore

Esistono diverse tipologie di bioreattori e scelta di quello più idoneo viene ponderata in base alle proprietà reologiche e le necessità metaboliche delle cellule vegetali in coltura.

Le sospensioni cellulari assumono un comportamento reologico fluido (virtualmente newtoniano) durante la fase dell'inoculo e non newtoniano (pseudoplastico) col progredire della crescita cellulare. Dunque, la viscosità ( $\eta$ ) diminuirà al crescere della velocità di taglio ( $\tau$ ). Queste proprietà influenzano la miscelazione in quanto sarà necessaria l'applicazione di una maggiore velocità di taglio, sotto forma di energia meccanica, per:

- garantire una miscelazione sufficiente, al fine di prevenire limitazioni nutrizionali o l'accumulo di sottoprodotti pericolosi;
- Apportare un idoneo scambio di gas, per fornire abbastanza ossigeno o anidride carbonica per la respirazione;
- Fornire un'opportuna dispersione cellulare, onde prevenire la sedimentazione, specialmente nelle colture in sospensione

Tuttavia, un eccessivo apporto di energia (velocità di taglio) può decretare il danneggiamento delle cellule comportando una riduzione della biomassa e della titolazione dei prodotti. [1]

Garantire un'aerazione sufficiente è un altro fattore cruciale nella progettazione dei bioreattori. Nelle colture vegetali eterotrofiche, l'apporto di ossigeno può limitare la crescita. Generalmente, la necessità di ossigeno, indicata dal tasso di assorbimento di ossigeno (OUR), delle cellule vegetali in sospensione presenta valori relativamente bassi, compresi tra 5 e 10 mmol<sub>O<sub>2</sub></sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. [1]

Ciononostante, l'aumento dell'aerazione comporta un incremento dello stress da taglio e dell'evaporazione e della formazione di schiuma, condizioni associate ad una riduzione della produttività. [1]

Infine, le colture di sospensioni cellulari fotoautotrofe e fotomixotrofiche con cellule in sospensione richiedono la luce come fonte di energia per il loro metabolismo. Tuttavia, un'adeguata distribuzione dell'illuminazione è abbastanza difficile, poiché la luce non è miscelabile. Inoltre, concentrazioni di biomassa più elevate aumentano drasticamente le proprietà di assorbimento del brodo di coltura, portando a una

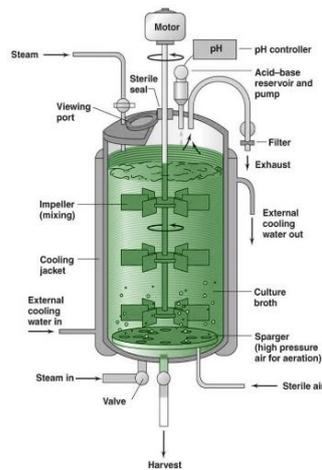
riduzione dell'illuminazione all'aumentare della profondità di penetrazione. Di conseguenza, diverse cellule sono esposte a diverse quantità di luce e il tasso di crescita specifico può variare nelle diverse regioni del bioreattore [1]

## **Tipologie di bioreattori**

Valutate le caratteristiche limitanti della coltura è necessario selezionare il bioreattore più idoneo. Generalmente, le cellule vegetali dotate di elevata rigidità possono essere coltivate in bioreattori Stirred Tank Reactor. Diversamente, cellule sensibili alle sollecitazioni meccaniche vengono coltivate con rese maggiori mediante l'impiego di Orbitally Shaken Bioreactors o Wave-Mixed Bag Bioreactor

### **Stirred Tank Reactor (STR)**

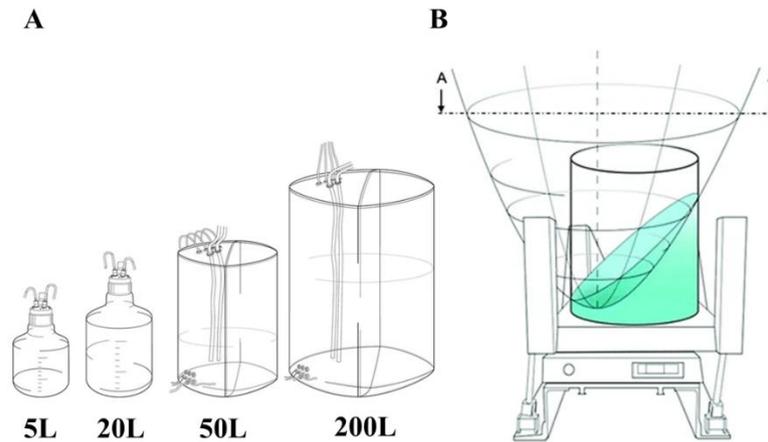
Lo STR o bioreattore a serbatoio agitato risulta essere il bioreattore maggiormente impiegato in ambito biotecnologico. Strutturalmente si compone da diversi agitatori (stirrer) e insufflatori(sparger). Gli stirrer maggiormente impiegati per le colture vegetali si caratterizzano da giranti marine (propeller) e turbine con pale pizzicate (impeller), generanti un flusso parallelo e perpendicolare all'asse di rotazione, rispettivamente. La velocità di rotazione viene mantenuta a valori relativamente bassi onde evitare l'aumento dello stress di taglio (fino a  $2,5 \text{ m s}^{-1}$ ) [1][63] Gli air spargers o insufflatori, invece, inseriscono l'aria all'interno del terreno di coltura attraverso bolle di piccole dimensioni. Questa tipologia di bioreattore permette di ottenere un'ottima omogeneità del mezzo di coltura, un'elevata dispersione di ossigeno ed anidride carbonica ed una elevata flessibilità a discapito nei costi di costruzione e di mantenimento del sistema di agitazione. [63] Inoltre, offre la maggior controllabilità di parametri come pH, temperatura e concentrazione di ossigeno rispetto a tutti gli altri bioreattori.



*Fig. 8: Stirred Tank Bioreactor*

### **Orbitally Shaken Bioreactors (OSB)**

Il gruppo di bioreattori orbitalmente scossi (OSB) sono costituiti da una componente meccanica, lo shaker o miscelatore, che permette l'agitazione dei contenitori, presentanti le sospensioni cellulari, mediante movimento orbitale [69]. L'OSB strutturalmente meno complesso risulta essere caratterizzato da uno shaker presentanti alloggi di dimensioni variabili, geometricamente differenti, in grado di contenere provette da centrifuga, palloni Erlenmeyer, Fernbach e Thomson Optimum Growth. Questi recipienti vengono principalmente impiegati per screening o per la composizione di un inoculo per bioreattori su scala da laboratorio di dimensioni maggiori [1]. Lo scale-up consiste nell'impiego del Orbitally Shaken Bag Bioreactor (OSBB) (Fig.9, B). Gli OSBB risultano essere agitatori orbitali di dimensione maggiore presentanti contenitori monouso o di materiale inerte a volume variabile con sistemi di regolazione annessi (Fig. 9, A). La presenza esterna delle componenti meccaniche permette una riduzione dello stress di taglio. Inoltre, seppur inferiore a quella degli STR, questi bioreattori presentano una buona aerazione e miscelazione rendendoli idonei per le culture di cellule vegetali. Infine, diversamente dagli STR, non necessitano di essere adattati alla coltura. [1]



**Fig. 9:** contenitori impiegati (A) e Orbitaly Shaken Bag Bioreactor(B)[69]

### **Sistema di controllo dell'areazione**

Oltre agli insufflatori, il sistema di conduzione dell'aria si compone di un compressore e sistemi di ingresso e uscita dei gas. A causa della presenza microbiologica (10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> microrganismi/m<sup>3</sup>), l'aria in ingresso viene sterilizzata per filtrazione (inlet air filter); il filtro è sterilizzato a vapore. Pertanto, l'aria aspirata dall'esterno verrà sterilizzata mediante filtro e convogliata all'insufflatore per essere immessa nel bioreattore. In seguito all'ingresso, l'aria risale mediante bolle raggiungendo l'apice del bioreattore, ove è presente un tubo raffreddato chiamato condensatore. Qui l'aria viene depauperata dell'acqua ed esce in forma disidratata passando attraverso un filtro di uscita (exit air filter) volto a mantenere l'asetticità del sistema e prevenire la fuoriuscita di microrganismi potenzialmente tossici. Ciononostante, la continua immissione di aria può decretare la formazione di schiuma. La schiuma esercita un effetto negativo sul sistema, andando ad ostruire i filtri e impoverendo gli scambi gassosi. Per tale motivo, interviene un sistema di controllo della schiuma. [63]

### **Sistema di controllo della schiuma**

Onde prevenirne la comparsa di schiuma vengono impiegati agenti antischiuma (es. glicole polimerico, olio, antischiuma a base siliconica). Questi agenti sono erogati attraverso un sistema di controllo che permette di discriminare la presenza della schiuma. Questo sistema è composto da due elettrodi, uno immerso nel terreno di coltura, l'altro esterno ad esso, in contatto con l'aria. Questi due elettrodi controllano

una pompa peristaltica che permette l'erogazione e l'immissione degli antischiuma. Quando il secondo elettrodo è in contatto con l'aria si forma un sistema elettrico aperto e la pompa peristaltica risulta chiusa. Diversamente, quando la schiuma raggiunge l'elettrodo si istaura un sistema chiuso che attiva la pompa peristaltica. Gli antischiumogeni vengono erogati nel reattore abbassando i livelli di schiuma e ripristinando il sistema aperto. [63]

### **Sistemi di regolazione termica**

L'attrito generato dall'asse rotante e le cellule presenti nel bioreattore rilasciano calore. Pertanto, è necessario un sistema di raffreddamento. Molti reattori sono dotati di un'intercapedine esterna chiamata camicia, che avvolge il recipiente contenente il terreno di coltura. Nella camicia fluisce un liquido con temperatura minore rispetto al mezzo di coltura permettendo la dissipazione del calore per conduzione. Altri sistemi di raffreddamento possono essere generalmente caratterizzati da baffles cavi, semitegoli esterni, serpentine interne e scambiatori esterni. [63]

### **Sistemi di controllo del pH**

I valori di pH del mezzo di coltura sono registrati costantemente da un pH-metro collegato ad un dispositivo computerizzato. Questo dispositivo controlla il mantenimento del pH entro un intervallo prefissato. Qualora il pH aumenti oltre l'intervallo, il dispositivo determina l'azionamento di una pompa peristaltica collegata ad un recipiente contenente una soluzione acida. Viceversa, una diminuzione del pH è collegata all'attivazione di una pompa collegata ad una soluzione alcalina. In entrambi i casi il pH viene riportato all'intervallo determinando la chiusura delle pompe peristaltiche. [63]

### **5.1.9: Downstream**

Con downstream si intende l'insieme di tecniche che, partendo dalla sospensione cellulare, permettono l'ottenimento di un prodotto. Generalmente, la procedura dipende dal prodotto stesso. Nello specifico, prodotti puri possono essere ottenuti mediante procedure di concentrazione, estrazione e purificazione. Le procedure di

concentrazione, come filtrazione e centrifugazione, permettono di separare il terreno di coltura dalle cellule in sospensione. Successivamente, se il composto di interesse risulta essere presente nel terreno di coltura, si adempie un'estrazione liquido-liquido, diversamente, se rimane confinato all'interno dell'ambiente cellulare, si applica un'estrazione solido-liquido. In entrambi i casi, è possibile adempire un'estrazione con fluidi supercritici. Le procedure di purificazione sono caratterizzate da tecniche cromatografiche, adsorbimento superficiale con polimeri, essiccazione sottovuoto e spray-drying. [70]. Tuttavia, è anche possibile ottenere una polvere applicando direttamente una procedura di essiccazione alla sospensione cellulare.

Si otterrà come prodotto finale una polvere titolata in maniera virtualmente standardizzata da composti bioattivi, come polifenoli e acido ursolico, impiegabile come materiale per varie tipologie di formulazioni, tra le quali quelle in ambito nutraceutico.

## **CAPITOLO 6: Materiali e metodi**

### **6.1: Preparazione calli e sospensioni cellulari**

#### **6.1.1: Reagenti**

Tutti i prodotti chimici, i reagenti e gli standard utilizzati sono reagenti analitici o di grado LC-MS. L'acqua è stata purificata attraverso un sistema di purificazione Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) prima dell'utilizzo. Terreno Murashige-Skoog (MS, Duchefa Biochemie); Acido 2,4-Diclorofenossiacetico (2,4D, Purezza  $\geq$  99% Sigma Aldrich, Milano, Italia); 6-Benzilamminopurina (6-BAP, Purezza  $\geq$  99%, Sigma Aldrich, Milano, Italia); Acido salicilico (SA, Purezza 99% Duchefa Biochemie); Saccarosio (Purezza 99%, MP); Agar (Duchefa Biochemie); Lievito (Duchefa Biochemie).

#### **6.1.2: Materiali vegetali**

Le foglie di mela *Malus pumila* Miller cv Annurca sono state fornite dal Dipartimento di Agraria, Portici (NA) e sterilizzate chimicamente. In primo luogo, le foglie sono state lavate con acqua corrente e Tween-20 per 10 minuti. In seguito, sono state immerse in etanolo 70% per 60 secondi e successivamente in una soluzione con ipoclorito di sodio 1.5% (NaOCl) per 10 minuti. Infine, sono state lavate tre volte con acqua Milli-Q sterile sotto cappa a flusso laminare.

Le foglie sterilizzate sono state tagliate con una lama sterile e l'espianto è stato posto in piastre Petri contenenti il terreno di coltura.

#### **6.1.3: Terreno di coltura**

Per la coltura è stato utilizzato un terreno contenente: Murashige-Skoog (MS), integrato con 30 g/L di Saccarosio e fitormoni della crescita quali: Acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e 6-benzilamminopurina (6-BAP) in rapporto 2:1, per indurre la callogenese.

Quindi il pH è stato regolato a  $5.8 \pm 0.1$ . Come ultima fase, il terreno è stato solidificato con agar 0.8% e sterilizzato in autoclave (Biosigma) a  $121^\circ\text{C}$  per 20 minuti.

I calli vegetali sono stati cresciuti al buio in camera di crescita ad una temperatura di 25° e umidità relativa 80%.

#### **6.1.4: Elicitazione calli vegetali**

Dopo 28 giorni, in fase di crescita esponenziale, una parte di calli formati sono stati sub-coltivati in un nuovo terreno in assenza o in presenza di 50 e 100 mg/L di acido salicilico (SA), mentre gli altri sono stati sub-coltivati in un terreno in assenza o in presenza di 100, 300 e 500 mg/L di estratto di lievito.

Le piastre di Petri contenenti i calli sono state fatte crescere al buio in camera di crescita ad una temperatura di 25° e umidità relativa 80%. Dopo 15 giorni, i calli sono stati prelevati ed analizzati.

#### **6.1.5: Allestimento di sospensioni cellulari**

I calli ottenuti dagli espianti di foglie, gialli e friabili, sono stati usati per l'allestimento delle sospensioni cellulari. Nello specifico, 3g di calli, sono stati trasferiti, sotto cappa a flusso laminare, ed usati come inoculo in beute da 250 mL contenenti 30mL di terreno di coltura di composizione analoga senza agar.

Le beute sono state poste su un agitatore orbitale (Biosigma) ad una velocità di 85 rpm al buio, alla temperatura  $25 \pm 1$  °C e UR: 80%. Le colture sono state successivamente sub-coltivate per indurre un aumento della biomassa.

Per valutare la curva di crescita cellulare, sono stati prelevati 30 mL di sospensione cellulare ogni 3 giorni, in triplicato, per 15 giorni ed il peso fresco è stato analizzato.

#### **6.1.6: Elicitazione sospensione cellulare**

La sospensione cellulare in fase esponenziale è stata sub-coltivata in beute da 250mL contenenti terreno analogo senza agar in assenza e in presenza di 50 mg/L di SA. Le sospensioni cellulari sono state cresciute come descritto precedentemente. Per analizzare le variazioni di Acido ursolico, 30 mL di sospensione cellulare sono stati prelevati ogni 3 giorni, in triplicato, per una durata di 15 giorni. Il corrispettivo peso fresco e secco, dopo liofilizzazione, sono stati valutati ed i campioni usati per le analisi quantitative.

## **6.2: Analisi calli e sospensioni cellulari**

### **6.2.1: Reagenti**

Tutti i prodotti chimici, i reagenti e gli standard utilizzati erano reagenti analitici o di grado LC-MS. L'acqua è stata purificata attraverso un sistema di purificazione Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) prima dell'utilizzo. Acido gallico (purezza  $\geq 98\%$  HPLC), procianidina B1 (purezza  $\geq 90\%$  HPLC), procianidina B2 (purezza  $\geq 90\%$  HPLC), catechina (purezza  $\geq 98\%$  HPLC), epicatechina (purezza  $\geq 98\%$  HPLC), acido clorogenico (purezza  $\geq 95\%$  HPLC), rutina (purezza  $\geq 94\%$  HPLC), acido ursolico (purezza  $\geq 98,5\%$  HPLC) quercetina 3-O-glucoside (purezza  $\geq 98\%$  HPLC), florizina (purezza  $\geq 99\%$  HPLC) e i reagenti per gli studi in vitro sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

### **6.2.2: Protocollo di estrazione dell'acido ursolico**

Un volume di 5 mL di acetato di etile è stato aggiunto a 100 mg (rapporto 50:1) di campione liofilizzata. La miscela è stata posta in un bagno ad ultrasuoni (Branson Fisher Scientific 150 E Sonic Dismembrator) per 15 minuti e agitata su un agitatore orbitale (Sko -DXL, Argolab, Carpi, Italia) a 600 rpm per 10 minuti. Quindi, i campioni sono stati centrifugati a 9000 rpm per 10 minuti e i surnatanti sono stati raccolti e conservati a 4°C al riparo dalla luce. I pellet ottenuti sono stati riestratti con 5 mL di acetato di etile utilizzando la stessa procedura ed il surnatante è stato aggiunto ai precedenti. Infine, gli estratti ottenuti separati dal solvente mediante evaporazione a leggero flusso di azoto, ricostituiti in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione di 30 mg/mL, diluiti con acetonitrile alla concentrazione di 5 mg/mL e conservati a -20 °C fino all'analisi.

### **6.2.3: Analisi dell'acido ursolico mediante HPLC-DAD**

Le analisi sono state condotte mediante un sistema HPLC Jasco Extrema LC-4000 (Jasco Inc., Easton, MD, USA), dotato di un campionatore automatico, una pompa solvente binaria ed un rivelatore a serie di diodi (DAD). La separazione è stata eseguita secondo il metodo precedentemente descritto con lievi modifiche [71]. La

colonna impiegata è una Kinetex® C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Le fasi mobili dell'analisi erano acqua distillata con acido formico allo 0,1% (A) e acetonitrile (B). Il gradiente di eluizione è stato eseguito nelle seguenti condizioni:

Intervallo di tempo	Fase A (H <sub>2</sub> O, 0,1% HCOOH)	Fase B (ACN)
0-3 min	40%	60%
3-20 min	60%	90%
20-24 min	10%	90%
24-29 min	40%	60%

0-3 min, isocratico su fase B al 60%; 3–20 min, gradiente lineare dal 60 al 90% B; 20–24 min, isocratico con 90% B; 24–29 min, isocratico al 60% B per il ricondizionamento della colonna. Il volume di iniezione era di 20 µL, la temperatura della colonna è stata fissata a 30 °C e la portata era fissata a 1 mL/min. La quantificazione dell'acido ursolico è stata eseguita a 205 nm [71].

#### **6.2.4: Linearità e sensibilità dell'analisi HPLC-DAD dell'acido ursolico**

Uno standard analitico di acido ursolico è stato utilizzato per sviluppare e convalidare il metodo HPLC-DAD utilizzato per valutare il titolo UA in ciascuna estrazione eseguita. Una soluzione madre dello standard UA è stata preparata ad una concentrazione di 1000 ppm utilizzando acetonitrile di grado HPLC come solvente. Sei diverse concentrazioni (0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 e 0,5 mg/mL) sono state preparate dalle soluzioni madre standard e analizzate mediante HPLC in triplice copia. È stata costruita una curva di calibrazione a 6 punti tracciando l'area del picco rispetto alla concentrazione standard per valutare la linearità del metodo. I limiti di rilevazione (LOD) e i limiti di quantificazione (LOQ) sono stati determinati mediante le seguenti equazioni:  $LOD = 3,3 S_a/b$  e  $LOQ = 10 S_a/b$ , dove  $S_a$  è la deviazione standard dell'intercetta della retta di regressione e  $b$  è la pendenza della curva di calibrazione.

### **6.2.5: Accuratezza e precisione dell'analisi HPLC-DAD dell'acido ursolico**

Come raccomandato dalle linee guida ICH, per validare un metodo analitico, è essenziale determinare l'accuratezza (stimata calcolando il % bias) e la precisione (stimata calcolando il % CV, coefficiente di variazione %) del metodo sviluppato. L'accuratezza (% bias) è stata calcolata mediante analisi intragiornaliere e intergiornaliere degli standard di calibrazione. Tre diverse concentrazioni di UA sono state iniettate 3 volte al giorno (intraday) e una volta per 3 giorni consecutivi (inter-day). La precisione (%CV, coefficiente di variazione%) è stata determinata da un'analisi intragiornaliera e intragiornaliera degli standard di calibrazione UA a 3 diverse concentrazioni. Ogni analita è stato iniettato 3 volte al giorno (intra-day) e una volta per 3 giorni consecutivi (inter-day).

### **6.2.6: Estrazione polifenolica**

Un volume di 1 mL di 80:20 MeOH: H<sub>2</sub>O contenente una soluzione di acido formico all'1% è stato aggiunto a 40 mg di campioni liofilizzati; la miscela è stata miscelata su un agitatore vortex per 1 min. Quindi, i campioni sono stati posti in un bagno ad ultrasuoni (Branson Fisher Scientific 150 E Sonic Dismembrator) per 10 minuti, agitati su un agitatore orbitale (Sko -DXL, Argolab, Carpi, Italia) a 600 rpm per 10 minuti e centrifugati a 9000 giri/min per 10 min. I supernatanti sono stati raccolti e conservati al riparo dalla luce a 4°C. I pellet ottenuti sono stati riestratti con la stessa procedura utilizzando 0,5 mL degli stessi solventi di estrazione. Infine, gli estratti ottenuti sono stati conservati a -20 °C fino all'analisi.

### **6.2.7: Determinazione quantitativa dei polifenoli mediante HPLC-DAD-FLD**

Le analisi sono state eseguite su un sistema Jasco Extrema LC-4000 (Jasco Inc., Easton, MD, USA) dotato di rivelatore a serie di diodi foto (DAD) e rivelatore di fluorescenza (FLD), accoppiato con un campionatore automatico e una pompa solvente binaria. La colonna selezionata era una colonna Kinetex®C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Le analisi sono state eseguite ad una portata di 1 mL/min, con solvente A (acido formico al 2%) e solvente B (acido formico allo 0,5% in acetonitrile e acqua 50:50, v/v).

Dopo una permanenza di 5 minuti al 10% di solvente B, l'eluizione è stata eseguita secondo le seguenti condizioni: dal 10% (B) al 55% (B) in 50 minuti e al 95% (B) in 10 minuti, seguiti da 5 minuti di manutenzione come riportato in tabella.

Intervallo di tempo (min)	Fase A (H <sub>2</sub> O, 2%HCOOH)	Fase B (50:50 ACN:H <sub>2</sub> O, 0,5% HCOOH)
0-5 min	90%	10%
5-55 min	45%	55%
55-65 min	5%	95%
65-70min	90%	10%

I flavonoli, i diidrocalconi e gli acidi idrossicinnamici sono stati monitorati a 280 nm, mentre i flavan-3-oli a 360 nm. Procianidine e flavanoli sono stati monitorati da un rivelatore fluorimetrico eseguito con una lunghezza d'onda di eccitazione di 272 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 312 nm. Per l'analisi quantitativa, sono state preparate curve standard per ogni standard di polifenoli su un intervallo di concentrazione di 0,1-1,0 µg / µL con sei diversi livelli di concentrazione e iniezioni duplicate a ciascun livello. L'identità dei polifenoli è stata confermata dal confronto del tempo di ritenzione dello standard analitico e dall'analisi dello standard interno.

### 6.2.8: Convalida del metodo HPLC-DAD-FLD

La validazione del metodo è stata eseguita secondo le linee guida di validazione ICH (ICH. Q2[R1], 1995), che includevano la valutazione di una serie di parametri, come l'intervallo di linearità, il limite di rilevabilità (LOD), il limite di quantificazione (LOQ), precisione e accuratezza [72]. Per quanto riguarda la quantificazione dei polifenolici, è stata eseguita la costruzione di una curva di calibrazione a sei punti utilizzando soluzione standard diluite. Otto polifenoli (acido gallico, catechina, epicatechina, acido clorogenico, procianidine B1 e B2, quercetina e rutina) sono stati selezionati per lo sviluppo e la convalida del metodo. Per valutare questi parametri, le curve di calibrazione sono state preparate in triplice copia. Il LOD e il LOQ sono stati calcolati utilizzando le seguenti equazioni:  $LOD = 3,3 Sa/b$  e  $LOQ = 10 Sa/b$ , dove Sa

è la deviazione standard dell'intercetta della retta di regressione e  $b$  è la pendenza della curva di calibrazione. La precisione del metodo è stata valutata attraverso il coefficiente percentuale di variazione (CV%), mentre l'accuratezza del metodo è stata valutata attraverso il bias. La precisione e l'accuratezza intragiornaliere sono state valutate con tre livelli di concentrazione in un giorno. La precisione e l'accuratezza intergiornaliere sono state valutate con tre livelli di concentrazione per tre giorni consecutivi.

## CAPITOLO 7: Risultati e discussione

La procedura precedentemente descritta ha permesso l'ottenimento di calli vegetali, gialli e friabili, contraddistinti dall'assenza dall'organo di partenza. (Fig.10)



**Fig.10:** Calli vegetali di foglia di mela annurca

La colorazione gialla è una conseguenza del fenomeno di eziolamento. Nello specifico, con eziolamento si fa generalmente riferimento ad un processo di crescita delle cellule vegetali in assenza di luce. Le condizioni di oscurità, usata per la genesi del callo vegetale, non permettono lo svolgimento del normale processo di fotosintesi determinato una riduzione della clorofilla e, conseguentemente del pigmento verde caratteristico delle foglie [73].

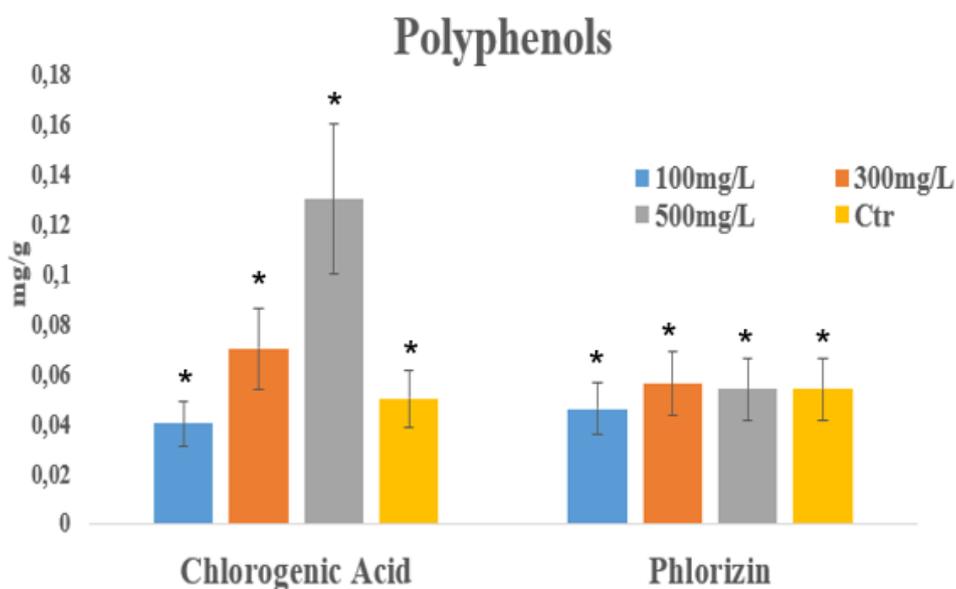
L'assenza di organi generati deriva invece dal rapporto tra 2,4-D e 6-BAP. Nello specifico, un rapporto pressoché intermedio di auxine e citochinine promuove il processo callogenico, mentre un alto rapporto auxine/citochinine o citochinine/auxine induce, rispettivamente, la rigenerazione della radice e del germoglio. [57]

Per quanto riguarda i calli trattati con estratto di lievito, i risultati sono riportati nella seguente **Tabella:**

Leaves					
Phenolic compound	Phenolic compound (mg/callus (g))				
	100 mg yeast	300 mg yeast	500 mg yeast	Ctrl	LAAL
Chlorogenic acid	0,04±0,02 <sup>a</sup>	0,07±0,02 <sup>a</sup>	0,13±0,10 <sup>a</sup>	0,05±0,03 <sup>a</sup>	0.209±0.004
Phloridzin	0,046±0,005 <sup>a</sup>	0,056±0,005 <sup>a</sup>	0,054±0,002 <sup>a</sup>	0,054±0,01 <sup>a</sup>	126.89±7.579
ProcyanidinB1	ND	ND	ND	ND	0.163±0.001
ProcyanidinB2	ND	ND	ND	ND	0.454±0.008
Catechin	ND	ND	ND	ND	
Epicatechin	0,004±0,0007 <sup>a</sup>	0,07±0,007 <sup>a</sup>	0,01±0,006 <sup>a</sup>	0,006±0,009 <sup>a</sup>	0.200±0.004
Rutin	ND	ND	ND	ND	0.351±0.001
Quercetin-3-O-glucoside	ND	ND	ND	ND	3.274±0.001
Gallic acid	0,10±0,06 <sup>a</sup>	0,16±0,02 <sup>a</sup>	0,20±0,07 <sup>a</sup>	0,14±0,02 <sup>a</sup>	
Ursolic acid	7,14±3,54 <sup>a</sup>	5,16±0,83 <sup>a</sup>	5,39±2,51 <sup>a</sup>	5,19±1,74 <sup>a</sup>	7.81±0.34
Total polyphenols content (TPC)	2,21±0,37 <sup>a</sup>	2,30±0,11 <sup>a</sup>	2,51±0,14 <sup>a</sup>	2,13±0,13 <sup>a</sup>	

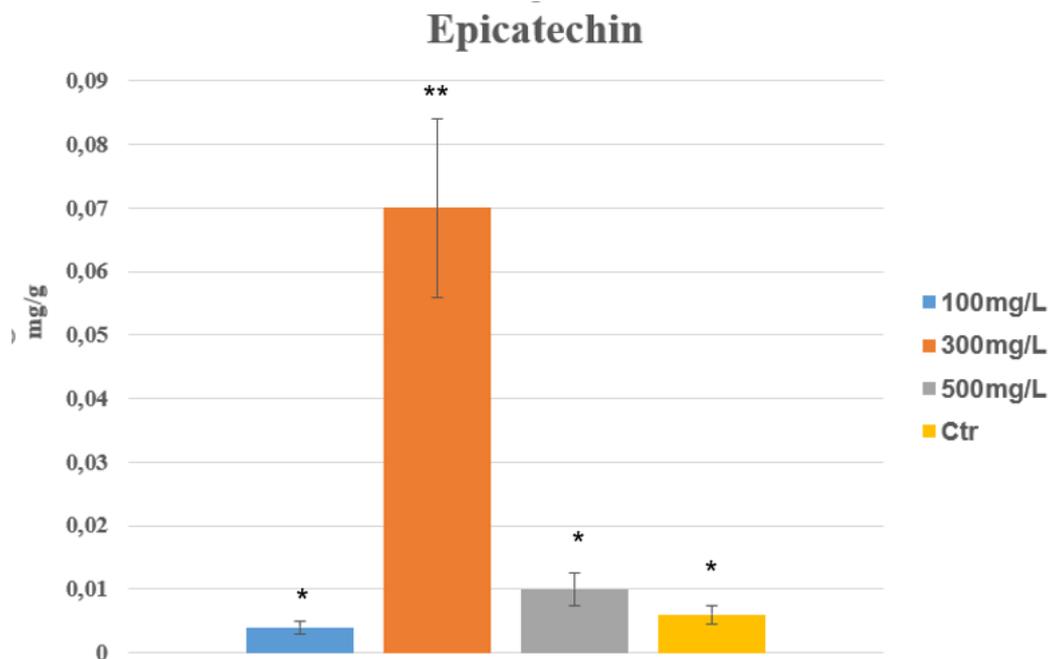
**Tabella:** caratterizzazione dei componenti del callo di foglia di mela cv. Annurca in assenza ed in presenza di lievito (100, 300 e 500 mg L<sup>-1</sup>) e la comparazione con mg/g presenti nel liofilizzato di foglia di mela annurca (LAAF)

In questo caso, notiamo come sia emersa la presenza di acido clorogenico e florizina, sebbene in maniera quantitativamente inferiore rispetto al liofilizzato di foglie di mela annurca.



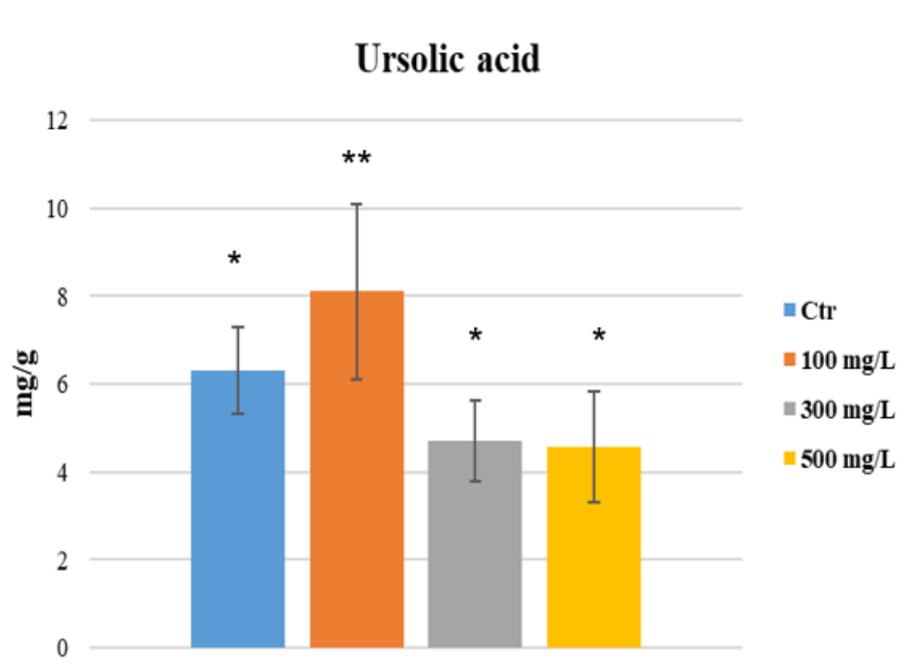
**Fig.11:** Contenuto polifenolico in calli di foglie di mela annurca in assenza ed in presenza di estratto di lievito.

Nel caso dell'acido clorogenico abbiamo una riduzione da parte del trattato con 100mg/L del 20% rispetto al controllo, mentre si registra un aumento del 40% e addirittura del 160% da parte del 300 e 500 mg/L. Mentre per quanto riguarda la florizina il contenuto si attesta sempre intorno al valore del controllo. Il lievito di fatto, non coinvolge le stesse vie di biosintesi dell'acido salicilico, ad eccezione del PAL che subisce un rapido aumento grazie al lievito con conseguente aumento dei metaboliti secondari. [66][67]



**Fig.12:** *Contenuto di epicatechina in calli di foglie di mela annurca in assenza ed in presenza di estratto di lievito.*

Riusciamo inoltre ad apprezzare anche la presenza di epicatechina, il quantitativo resta comunque molto inferiore rispetto a quello riscontrato nel liofilizzato sebbene mostri però un incremento enorme rispetto al controllo del 1066% nel caso del terreno con 300mg/L e del 66,7% da parte del 500mg/L. Ciò può sempre essere attribuibile ad un aumento della biosintesi degli enzimi PAL e TAL (Tirosin ammino liasi). [84]



**Fig.13:** *Contenuto di acido ursolico in calli di foglie di mela annurca in assenza ed in presenza di estratto di lievito.*

Focalizzandoci infine sull'acido ursolico, si può affermare che questo sia il composto bioattivo che più si è avvicinato quantitativamente al contenuto presente nel liofilizzato. Abbiamo un aumento del 37,6% nel caso del 100mg/L, una lieve diminuzione del 4,3% per il 300 mg/L e infine un leggero aumento del 3,8% nel 500mg/L. Come accennato in precedenza è già noto da molto tempo l'effetto del lievito sulla biosintesi di terpenoidi [68], alcuni studi hanno dimostrato che la produzione di metaboliti secondari indotta da elicitori quali lievito e pectina è mediata da secondi messaggeri, tra cui l'acido jasmonico. Di fatto, la produzione di triterpeni in presenza di pectina o di estratto di estratto di lievito potrebbe essere generata come risposta a danni alla parete cellulare, coinvolgendo meccanismi di difesa della pianta mediati dall'induzione di jasmonato endogeno. Allo stesso modo, l'acido ursolico inibisce la sintesi di proteine indotte dal jasmonato [68], pertanto la regolazione della risposta endogena all'acido jasmonico da parte dell'acido ursolico non va esclusa.

Al contempo, il contenuto polifenolico ed ursolico dei calli derivati dalle foglie di mela Annurca in assenza ed in presenza di 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> di SA è stato valutato mediante

i protocolli di estrazione e quantizzazione precedentemente descritti. I risultati sono mostrati in **Tabella:**

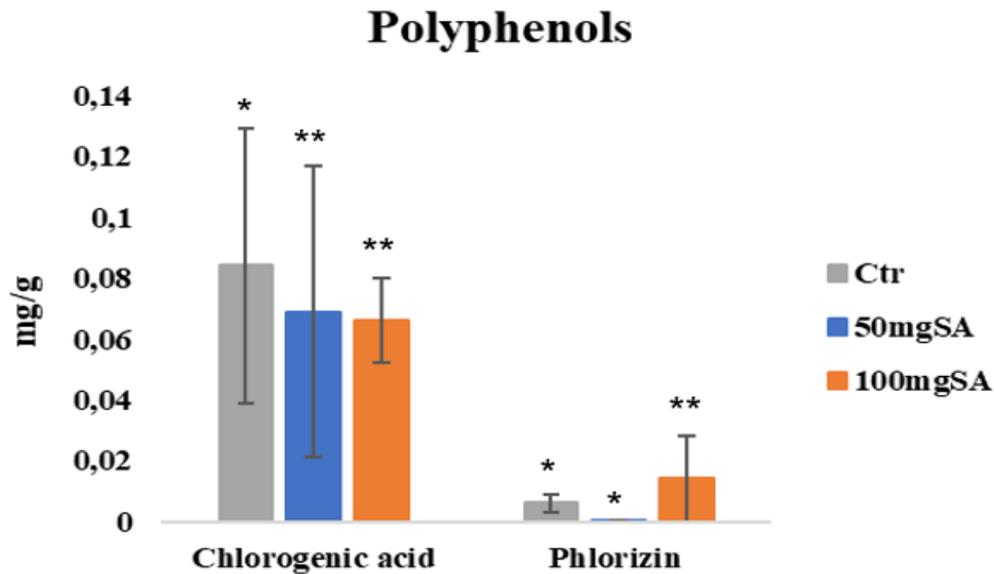
Leaves				
Phenolic compound(mg)/callus(g)				
Phenolic compound	50mg L <sup>-1</sup> SA	100mg L <sup>-1</sup> SA	Ctrl	LAAL
Clorogenic acid	0,069±0,048	0,066±0,033	0,084±0,045	0,209±0,004
Phloridzin	0,0001±0,0001	0,014±0,014	0,006±0,003	126,89±7,579
Procyanidin B1	ND	ND	ND	0,163±0,001
Procyanidin B2	ND	ND	ND	0,454±0,008
Epicatechin	ND	ND	ND	0,200±0,004
Rutin	ND	ND	ND	0,351±0,001
Quercitin-3-O-glucoside	ND	ND	ND	3,274±0,001
Ursolic acid	6,90±2,53	5,11±2,77	3,91±1,37	7,81±0,34

**Tabella :** caratterizzazione dei componenti del callo di foglia di mela cv. Annurca in assenza ed in presenza di acido salicilico(50 e 100 mg L<sup>-1</sup>) e la comparazione con mg/g presenti nel liofilizzato di foglia di mela annurca (LAAF)

Dalle analisi polifenoliche, è emersa la presenza di diidrocalconi come florizina e acido clorogenico, risultati essere compresenti in diverse cultivar di mela, inclusa l'annurca [74][75]. Diversamente, altre tipologie di polifenoli come procianidina B1 e B2, epicatechina, rutina e quercitina-3-O-glicoside non sono stati riscontrati in quantità rilevabili.

In tutti i casi, esclusa qualche eccezione, la composizione polifenolica si è dimostrata quantitativamente inferiore rispetto al liofilizzato di mela annurca, come mostrato in Tabella 1. Questo può essere spiegato considerando che l'acido salicilico, in quanto elicitore, stimola l'attivazione della via metabolica che porta alla produzione di terpeni, come dimostrato anche da studi precedenti su altri tipi di colture cellulari [64]. Alla luce di ciò, si può ipotizzare che ci sia una riduzione della produzione di polifenoli legato all'aumento dell'attivazione di altre vie metaboliche.

L'influenza dell'elicitazione è stata valutata sulla variazione del contenuto polifenolico (Fig.14)



*Fig.14: Contenuto polifenolico in calli di foglie di mela annurca in assenza ed in presenza di acido salicilico*

Le analisi hanno mostrato un decremento del contenuto di acido clorogenico del 21.7% e del 27.2%, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con 50 e 100mg di acido salicilico, rispettivamente.

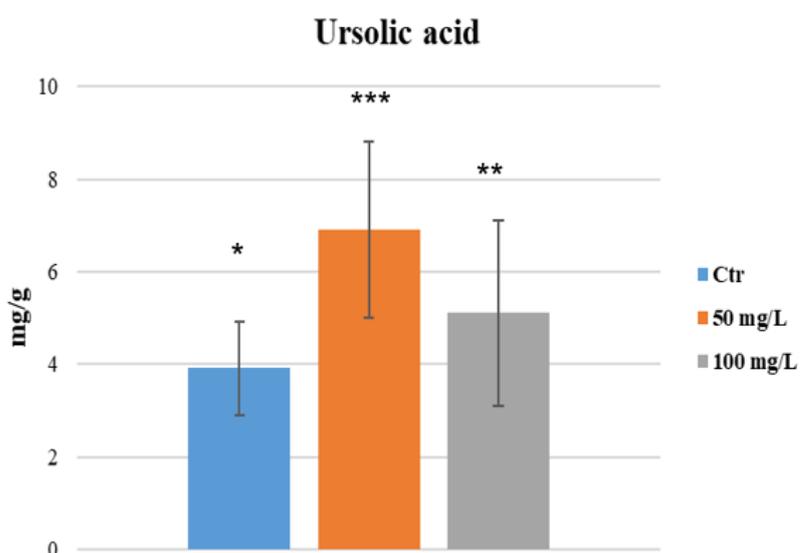
Le analisi hanno mostrato un decremento del contenuto di acido clorogenico del 21.7% e del 27.2%, rispetto al controllo, in seguito al trattamento con 50 e 100 mg  $L^{-1}$  di acido salicilico, rispettivamente.

Questo fenomeno può essere probabilmente attribuito ad una riduzione dell'espressione dei geni legati alla via biosintetica dell'acido clorogenico conseguente all'elevato stimolo di stress indotto dall'elicitazione.

Un' ulteriore ipotesi risulta da un possibile impiego preferenziale di metaboliti appartenenti alla via biosintetica dell'acido clorogenico in vie biosintetiche alternative. Ad esempio, l'Acetil CoA risulta essere un composto di partenza fondamentale nella biosintesi del mevalonato, un precursore dell'acido ursolico [76]. L' Acetil CoA viene anche impiegato da enzimi come la 4-cumaril CoA ligasi e Idrossicinnamoiltransferasi (HCT), coinvolti nella biosintesi dell'acido clorogenico [77]. Per tal motivo è possibile ipotizzare che questo decremento sia correlato all'aumento dell'acido ursolico.

Diversamente, il contenuto di florizina è risultato diminuire di poco con l'aggiunta di 50 mg L<sup>-1</sup> di SA al terreno, rispetto al controllo. Nel caso, invece, del trattamento delle colture cellulari con 100 mg L<sup>-1</sup> di SA il contenuto di florizina è aumentato del 133%. Questo risultato presenta conformità con il già descritto effetto del SA sulla composizione polifenolica. [64][65] Questo effetto può essere descritto da un aumento dell'espressione di enzimi coinvolti nella biosintesi della florizina come fenilalanina ammoniaca liasi (PAL) calcione isomerasi [*CHI*] e calcione sintasi [*CHS*] [78]

Quanto al contenuto di acido ursolico, è stato riscontrato un aumento del 76.5% e del 30,7%, rispetto al controllo, in seguito all'elicitazione con 50 e 100mg L<sup>-1</sup> di SA, rispettivamente. (Fig.15)



**Fig.15:** contenuto di acido ursolico in calli di foglia di mela annurca in assenza ed in presenza di acido salicilico

Questi risultati supportano il già citato effetto elicitante dell'acido salicilico nei confronti di metaboliti secondari come i triterpenoidi [64]. Al fine di comprendere il meccanismo d'azione alla base di questo effetto, sono stati condotti diversi studi volti a valutare l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi di triterpenoidi in seguito all'elicitazione con SA. Nello specifico, in piante di *Tanacetum parthenium*, i livelli trascrizionali di geni coinvolti nella via a monte della biosintesi dei terpeni (MVA e MEP) come 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A reduttasi (*HMGR*), 1-deossixilulosio-5-fosfato ridottoisomerasi (*DXR*) e idrossi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato reduttasi (*HDR*) sono risultati aumentati in seguito al trattamento con SA [79]. In

aggiunta, in piante di cumino nero (*Nigella sativa*) sono risultati sovraregolati geni appartenenti alla via biosintetica a valle come monoterpene sintasi (*MTS*),  $\beta$ -amirina sintasi ( *$\beta$ AS*) e squalene epossidasi (*SQE*) [80]. In maniera simile, i geni *SQE* e ossido squalene ciclastasi (*OSC*) sono risultati sovraespressi in colture di *Salvia miltiorrhiza* [76].

L'impiego di SA per migliorare la produzione di UA ha riscontrato successo in colture vegetali di su calli di *Lepechinia caulescens* [81] e *Fagonia indica* [82] e in sospensioni cellulari di *Leucas aspera* Spreng [83].

Delle due concentrazioni di SA testate, quella di 50mg L<sup>-1</sup> è risultata la più idonea nella stimolazione dell'acido ursolico. Questa stimolazione ha permesso l'ottenimento di un quantitativo di UA comparabile a quello presente nel liofilizzato di foglie di mela annurca.

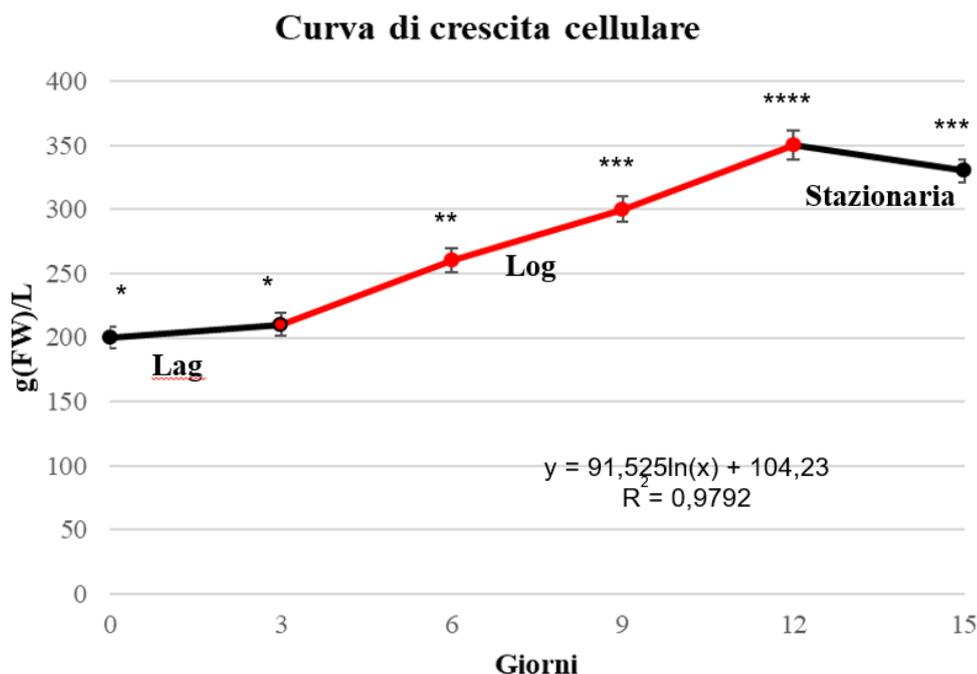
### Sospensioni cellulari di foglie di mela annurca

I calli ricavati dal terreno con 50mg/L di acido salicilico, considerato che sono stati quelli con una resa migliore di UA, sono stati usati come inoculo per lo sviluppo delle sospensioni cellulari come precedentemente descritto. Le sospensioni ottenute sono mostrate in (Fig.16)



*Fig.16: Sospensioni cellulari di foglie di mela annurca*

Le analisi condotte sulla variazione della biomassa, espressa in peso fresco (FW), in funzione del tempo hanno permesso l'ottenimento della curva di crescita cellulare (Fig.17)



*Fig.17 Curva di crescita cellulare: 0-3 giorni, fase lag; 3-12 giorni fase log; 12-15 giorni inizio della fase stazionaria*

Dai risultati è possibile riconoscere tre fasi distinte: una prima fase con andamento basale (0-3 giorni); una seconda fase caratterizzata da un andamento ascendente (3-12 giorni) ed una terza fase con andamento discendente (12-15 giorni).

Nella prima fase l'inoculo iniziale (200 g L<sup>-1</sup>) ha mostrato solo un lieve incremento della biomassa (5%). Questo andamento ha permesso di identificare la fase lag o di latenza, caratterizzata dall'adattamento delle cellule vegetali alle condizioni colturali ed ambientali [63].

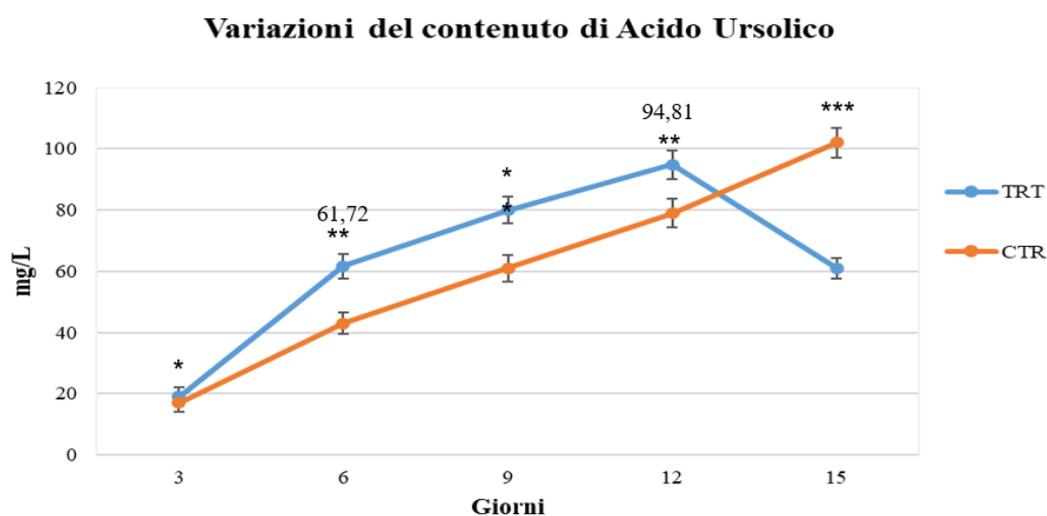
Incrementi sostanziali della biomassa sono stati verificati nella seconda fase. Nello specifico, le analisi condotte nei giorni 6, 9, 12 hanno mostrato un aumento rispettivamente del 30%, 50% e 75% rispetto all'inoculo iniziale. Questa permette l'identificazione della fase log o esponenziale. In questa fase le cellule si replicano con la medesima velocità decretando una crescita della biomassa in maniera esponenziale. [63]

Diversamente, nella terza fase è emerso un decremento della biomassa correlabile all'inizio della fase stazionaria. In questa fase, la concentrazione di nutrienti diviene limitante per la crescita conseguendo un aumento della morte delle cellule vegetali in coltura. Si origina dunque uno stadio in cui lo sviluppo di biomassa, ottenuta dalla

duplicazione, eguaglia il decremento della stessa, dovuto alla morte cellulare. Questo perdura finché il numero di cellule che incombono nella morte non diventa superiore. Quando ciò accade inizia la fase di declino o morte (non mostrata). [63]

Il tempo di 12 giorni, correlato al maggior incremento della biomassa, è stato scelto come momento di subcoltivazione. In questo modo, l'apporto di nuovi nutrienti, presenti nel terreno, permette di sviluppare la biomassa senza incombere nella fase stazionaria o di declino. In tal modo si permette, dopo una prima fase di lag, l'istaurarsi di una successiva fase esponenziale.

Le sospensioni cellulari sono state subcoltivate per valutare l'influenza dell'elicitazione sulla produzione di acido ursolico. La concentrazione di 50mg L<sup>-1</sup> di acido salicilico, risultata essere quella correlata ad una maggior produzione di acido ursolico, è stata impiegata come trattamento, mentre il terreno privo di SA è stato impiegato come controllo. I risultati delle analisi sono mostrati in (Fig.18)



*Fig.18: Variazioni del contenuto di acido ursolico(mg/L) in assenza (CTR) ed in presenza del trattamento con 50mg di SA (TRT)*

Dal grafico ottenuto si evince un andamento crescente nell'intervallo dei primi 12 giorni. Tuttavia, la concentrazione di UA della sospensione trattata è risultata superiore in ogni punto dell'intervallo. Nello specifico, le analisi condotte durante i giorni 3, 6, 9, 12 hanno riscontrato rispettivamente un aumento della concentrazione di UA del 33.1%, 41,4%, 30,1% e 17.7% nel terreno trattato con SA rispetto al controllo. Il valore massimo di concentrazione, nell'intervallo citato, è stato riscontrato a 12 giorni (422,87 mg L<sup>-1</sup>).

Nell'intervallo di tempo compreso tra 12 e 15 giorni le sospensioni hanno mostrato un andamento differente: discendente nella sospensione trattata con SA ed ascendente nel controllo. Questa discrepanza può essere spiegata tenendo in considerazione lo stress generato dall'elicitore. Questo stress, seppur determini un aumento dell'acido ursolico prodotto, è correlato ad una compromissione della vitalità cellulare. Per tal motivo, dopo il raggiungimento del picco a 12 giorni, nella sospensione cellulare trattata si assiste ad una diminuzione dell'acido ursolico dovuto alla morte delle cellule in coltura e, conseguentemente, alla riduzione della biomassa.

Contrariamente, la concentrazione di acido ursolico nel controllo è incrementata ulteriormente dopo i 12 giorni. In questo caso, seppur la concentrazione dei metaboliti secondari non sia correlabile in maniera proporzionale con l'aumento della biomassa, dai valori riscontrati è possibile dedurre che la crescita cellulare sia stata protratta fino ai 15 giorni. Questo fenomeno può essere spiegato dal perfezionamento delle linee cellulari in seguito alla subcoltivazione. Nello specifico, le cellule presenti in sospensioni incombono, nel corso del tempo, a variazioni di carattere genico. Queste variazioni possono determinare un aumento dell'adattabilità alle condizioni culturali e ambientali generando maggior resilienza e sopravvivenza [3]. Le variazioni geniche possono anche inficiare sulla vitalità cellulare. In questo caso, la continua proliferazione, garantita dai processi di subcoltivazione, permette l'eliminazione delle linee meno stabili. Per tal motivo le sospensioni cellulari, in determinate situazioni, possono mostrare andamenti differenti sulla curva di crescita cellulare in funzione del tempo di coltura e del numero di processi di subcoltivazioni [3]

### **Modello cinetico Batch**

Il processo di produzione allestito per l'ottenimento di fitocomplessi è assimilabile ad un processo batch o discontinuo. Questo processo presenta una durata temporale definita in quanto costituito da un sistema chiuso, presentante un numero limitato di nutrienti. Diversamente, modelli in continuo o Fed-Batch, permettono rispettivamente di esercire il processo di produzione in continuo o di alimentare lo stesso in maniera ripetuta.

All'interno del processo batch, in fase log, la concentrazione aumenta in maniera esponenziale. In questa fase avviene un processo auto-catalitico dove, se gli altri

parametri restano costanti, la velocità di aumento della biomassa dipende dalla concentrazione di cellule presenti nel bioreattore

Descrivendo in termini matematici:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

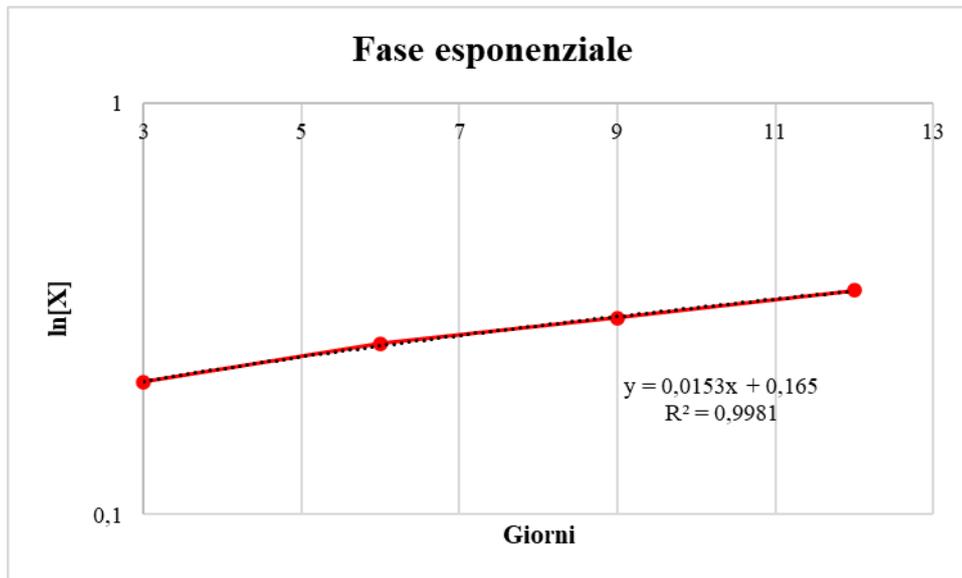
Ossia, la variazione della biomassa ( $dX$ ) nel corso del tempo ( $dt$ ) è direttamente proporzionale alla biomassa stessa ( $X$ ) secondo un fattore di proporzionalità che è la velocità specifica di crescita  $\mu$  ( $\text{kg kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) Quindi ricavando  $\mu$  da (1):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

La variabile  $\mu$  descrive cioè l'evoluzione della coltura nel tempo. Se  $\mu$  è costante, come accade in fase esponenziale, integrando ed applicando il logaritmo naturale a (2) avremo:

$$\ln X_1 = X_0 + \mu(t_1 - t_0) \quad (3); \ln \frac{X_1}{X_0} = \mu(t_1 - t_0) \quad (4)$$

Dunque, riportando il logaritmo naturale della concentrazione di biomassa in funzione del tempo su un grafico avremo un andamento lineare dove la pendenza ( $m$ ) sarà equivalente a  $\mu$  e l'intercetta a  $X_0$  (Fig.19)



*Figura 19: Grafico del logaritmo naturale della concentrazione della biomassa in fase esponenziale, espressa in g (FW) L<sup>-1</sup>, in funzione del tempo*

Ottenuta la variabile  $\mu$ , è possibile predire la produzione di biomassa in qualsiasi momento della fase esponenziale. Diversamente, in fase stazionaria ed in fase lag  $\mu = 0$ . [63]

### Produzione del processo batch

Con produzione si fa generalmente riferimento alla quantità di biomassa o di prodotti ottenuti alla fine del processo. Questa può essere espressa come produzione totale, produttività specifica e produttività volumetrica. Tra queste, quella più idonea nel descrivere il processo è la produttività volumetrica (Q), ossia la concentrazione di biomassa (X) o di un determinato prodotto (P) per volume unitario e per unità di tempo ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Questa è espressa dalla formula:

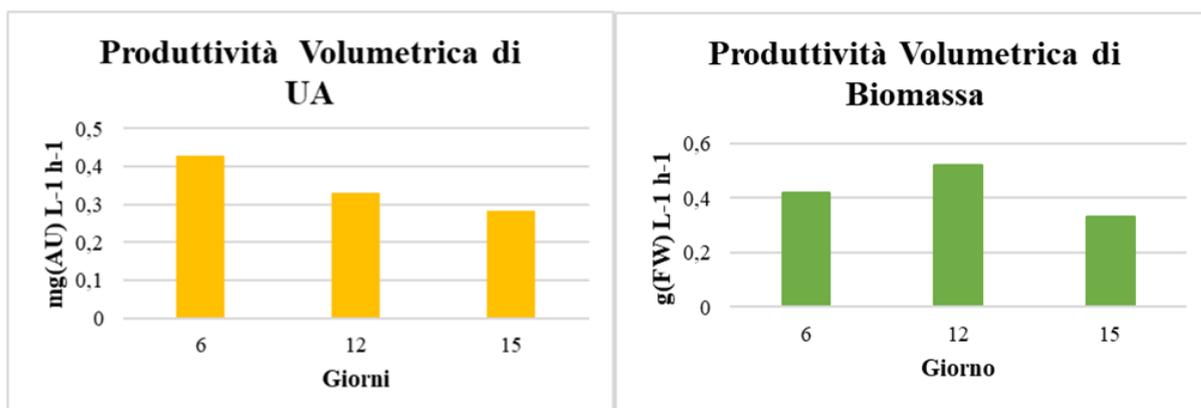
$$Q = \frac{X_{max} - X_0}{t_1 + t_2} \quad (5)$$

Dove:

- $X_{max}$  è la concentrazione massima di biomassa
- $X_0$ , rappresenta l'inoculo
- $t_1$  è il tempo in cui le cellule crescono alla velocità massima (fase esponenziale)
- $t_2$  è il tempo in cui le cellule non crescono (tempi morti, fase lag, fase stazionaria...)

La formula (5) è applicabile anche alla produttività di un prodotto sostituendo X con P [63]

La produttività della biomassa e dell'acido ursolico è stata valutata attraverso l'espressione (5) prendendo in considerazione i tempi di massima produzione. Nello specifico sono stati indagati: il tempo 12 correlato al picco di biomassa (350g), e della concentrazione di UA ( $422,87 \text{ mg L}^{-1}$ ) nella sospensione trattata con acido salicilico; il tempo 15, correlato al picco della concentrazione di UA ( $485,79 \text{ mg L}^{-1}$ ) del controllo; il tempo 6 della sospensione trattata, correlato al maggior aumento di UA rispetto al controllo. i valori di produttività sono riportati in **Fig. 20**



*Figura 20: produttività volumetrica di acido ursolico (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e biomassa (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) al tempo di 6 e 12 giorni della sospensione trattata e di 15 giorni del controllo.*

Il valore massimale di produttività di biomassa è stato riscontrato a 12 giorni (0,52 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) della sospensione trattata. Diversamente, la produttività di acido ursolico è risultata ottimale a 6 giorni (0,43 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), seguita da quella a 12 giorni (0,33 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Dunque, seppure la concentrazione di acido ursolico nel controllo a 15 giorni sembri maggiore rispetto ai valori ottenuti della sospensione elicitata, quest'ultima presenta una produttività migliore.

Conseguentemente è possibile terminare il processo in momenti distinte in base alla tipologia di prodotto che si vuole ottenere. Se si vuole ottenere, come materia prima, una polvere dell'intera sospensione, l'intervallo di tempo più consono per il prelievo è quello di 12 giorni. In questo modo si massimizza la produzione di biomassa. Diversamente, qualora si optasse per una purificazione dell'acido ursolico per ottenere un composto puro il tempo migliore risulterebbe essere quello di 6 giorni.

## **CAPITOLO 8: Conclusioni**

In base a quanto detto, si può affermare che la tecnica di coltura dei tessuti vegetali è uno strumento potente e promettente per la produzione di SM importanti dal punto di vista industriale, medico e commerciale. Nel nostro caso specifico, i calli di foglie di mela annurca si sono rivelati un interessante punto di partenza per l'ottenimento di acido ursolico. Affinando tutta una serie di caratteristiche e decidendo a monte i momenti di prelievo, si possono potenzialmente ottenere una serie di diversi prodotti, a seconda di quella che è l'esigenza. Un vantaggio non di poco conto è sicuramente la richiesta di un quantitativo minore di materia prima e dell'ottenimento di una considerevole quantità di biomassa e metaboliti attivi, in tempi decisamente ristretti comparati a quelli dell'agricoltura tradizionale [1]. Un ulteriore punto a favore è dato dall'ambiente controllato e dalla sterilità che permettono la prevenzione di contaminanti chimici o microbiologici nonché l'influenza di stress di carattere biotico o abiotico che potrebbe compromettere la produzione di SM, così come il non essere vincolati da quella che è la stagionalità della matrice vegetale di partenza, ottenendo di fatto un prodotto standardizzato.

Indubbiamente un eventuale perfezionamento futuro può essere dato da uno scale-up in bioreattore, così da poter anche incrementare l'efficienza del processo e la quota di prodotto, così come rappresenta un'ulteriore finestra possibile l'impiego dell'ingegneria genetica, tramite tecniche quali ad esempio CRISPR-Cas9, allo scopo di stimolare maggiormente la via biosintetica per la produzione di UA, inibendo al contempo l'espressione di geni coinvolti in vie biosintetiche alternative.

## CAPITOLO 9: Bibliografia

1. Werner, S., Maschke, R.W., Eibl, D., Eibl, R. (2018). Bioreactor Technology for Sustainable Production of Plant Cell-Derived Products. In: Pavlov, A., Bley, T. (eds) Bioprocessing of Plant In Vitro Systems. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54600-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54600-1_6)
2. Rohini, M.R., Rajasekharan, P.E. (2022). Scale-Up Production of Bioactive Compounds Using Bioreactors. In: Belwal, T., Georgiev, M.I., Al-Khayri, J.M. (eds) Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4_3)
3. Lakshmaiah, V.V., Banadka, A., Thirumoorthy, G., Naik, P.M., Al-Khayri, J.M., Nagella, P. (2022). In Vitro Production of Bioactive Compounds from Plant Cell Culture. In: Belwal, T., Georgiev, M.I., Al-Khayri, J.M. (eds) Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory. Springer, Singapore
4. G.C. Tenore, A. Carotenuto, D. Caruso, G. Buonomo, M. D'Avino, D. Brancaccio, E. Novellino A nutraceutical formulation based on annurca apple polyphenolic extract is effective on intestinal cholesterol absorption: A randomised, placebo-controlled, crossover study *PharmaNutrition*, 6 (3) (2018), pp. 85-94
5. G.C. Tenore, D. Caruso, G. Buonomo, M. D'Avino, P. Campiglia, L. Marinelli, E. Novellino A healthy balance of plasma cholesterol by a novel Annurca apple-based nutraceutical formulation: results of a randomized trial *J. Med. Food.*, 20 (2017)
6. Tenore GC, Caruso D, Buonomo G, D'Avino M, Santamaria R, Irace C, Piccolo M, Maisto M, Novellino E. Annurca Apple Nutraceutical Formulation Enhances Keratin Expression in a Human Model of Skin and Promotes Hair Growth and Tropism in a Randomized Clinical Trial. *J Med Food*. 2018 Jan;21(1):90-103. doi: 10.1089/jmf.2017.0016. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28956697; PMCID: PMC5775114.
7. Shahidi F (2004) Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. *J Food Sci* 69:R146–R149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10727.x>
8. Day L, Seymour RB, Pitts KF et al (2009) Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends Food Sci Technol* 20:388–395. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.05.002>
9. Market Research (2020) Dried fruit market size, share & trends analysis report by product (apricots, dates, raisins, figs, berries), by distribution channel (supermarkets & hypermarkets, online), by region, and segment forecasts, 2020–2027
10. Gonçalves S, Romano A (2018) Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. In: Vijayakumar R, Raja S (eds) Secondary metabolites. IntechOpen
11. T. Efferth, “Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures,” *Engineering*, vol. 5, no. 1, pp. 50–59, 2019.
12. F. SKOOG and C. O. MILLER, “Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro,” *Symp. Soc. Exp. Biol.*, vol. 11, pp. 118–30, 1957.
13. A. Sharma, A. K. Mathur, J. Ganpathy, B. Joshi, and P. Patel, “Effect of abiotic elicitation and pathway precursors feeding over terpenoid indole alkaloids production in multiple shoot and callus cultures of *Catharanthus roseus*,” *Biologia (Bratisl.)*, vol. 74, no. 5, pp. 543–553, May 2019.

14. K. Kaur and P. K. Pati, "Stress-Induced Metabolite Production Utilizing Plant Hairy Roots," in *Hairy Roots*, Singapore: Springer Singapore, 2018, pp. 123–145.
15. T. Efferth, "Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures," *Engineering*, vol. 5, no. 1, pp. 50–59, 2019.
16. C. R. Singh, "Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture," *Asian J. Biol. Sci.*, vol. 11, no. 4, pp. 165–72, 2018.
17. Angela Mari, Idolo Tedesco, Annunziata Nappo, Gian Luigi Russo, Antonio Malorni, Virginia Carbone, Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of "Annurca" apple, a southern Italian cultivar, *Food Chemistry*, Volume 123, Issue 1, 2010, Pages 157-164, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.023>.
18. Floris, M. (1997) *Melo e Pero nella Frutticoltura Italiana ed Europea*, ed Federchimica Agrofarma, Milano, Italy, p 17.
19. Cefarelli, Giuseppe and D'Abrosca, Brigida and Fiorentino, Antonio and Izzo, Angelina and Mastellone, Claudio and Pacifico, Severina and Piscopo, Vincenzo Free-Radical-Scavenging and Antioxidant Activities of Secondary Metabolites from Reddened Cv. Annurca Apple Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 54, number 3
20. Ni L., Meng CQ, Sikorski JA. Recent advances in therapeutic chalcones (2004). *Expert Opin Ther Patents* 14:1669–1691.
21. Devkota, H.P. (2022). Nutraceutical Compounds, Classification, Biosynthesis, and Function. In: Belwal, T., Georgiev, M.I., Al-Khayri, J.M. (eds) *Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4_1)
22. Sheema Khanam, Dr. Anuradha Mishra, Arshiya Shahid, Neelkanth Mani Pujari, Therapeutic indication of Phloridzin: A new Gleam for metabolic disorders, *Phytomedicine Plus*, Volume 2, Issue 1, 2022, 100200, ISSN 2667-0313, <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100200>.
23. G.C. Tenore, P. Campiglia, P. Stiuso, A. Ritieni, E. Novellino Nutraceutical potential of polyphenolic fractions from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv. Annurca) *Food Chem.*, 140 (4) (2013), pp. 614-622, [10.1016/j.foodchem.2012.10.112](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.112)
24. Maisto M, Piccolo V, Novellino E, Schiano E, Iannuzzo F, Ciampaglia R, Summa V, Tenore GC. Optimization of Phlorizin Extraction from Annurca Apple Tree Leaves Using Response Surface Methodology. *Antioxidants* (Basel). 2022 Sep 28;11(10):1933. doi: [10.3390/antiox11101933](https://doi.org/10.3390/antiox11101933). PMID: 36290654; PMCID: PMC9598179.
25. G.C. Tenore, G. Calabrese, P. Stiuso, A. Ritieni, D. Giannetti, E. Novellino Effects of Annurca apple polyphenols on lipid metabolism in HepG2 cell lines: a source of nutraceuticals potentially indicated for the metabolic syndrome *Food Res. Int.*, 63 (2014), pp. 252-257
26. Martino, E., Vuoso, D.C., D'Angelo, S. *et al.* Annurca apple polyphenol extract selectively kills MDA-MB-231 cells through ROS generation, sustained JNK activation and cell growth and survival inhibition. *Sci Rep* 9, 13045 (2019).

- 27.** Orlandella FM, Mirabelli P, De Stefano AE, Iervolino PLC, Luciano N, D'Angelo S, Salvatore G. Effects of *Annurca* Flesh Apple Polyphenols in Human Thyroid Cancer Cell Lines. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Feb 17; 2022:6268755. doi: 10.1155/2022/6268755. PMID: 35222800; PMCID: PMC8872649.
- 28.** Badolati, N.; Sommella, E.; Riccio, G.; Salviati, E.; Heintz, D.; Bottone, S.; Di Cicco, E.; Dentice, M.; Tenore, G.; Campiglia, P.; Stornaiuolo, M.; Novellino, E. *Annurca* Apple Polyphenols Ignite Keratin Production in Hair Follicles by Inhibiting the Pentose Phosphate Pathway and Amino Acid Oxidation. *Nutrients* **2018**, *10*, 1406. <https://doi.org/10.3390/nu10101406>
- 29.** Lee YI, Ham S, Lee SG, Jung I, Suk J, Yoo J, Choi SY, Lee JH. An Exploratory In Vivo Study on the Effect of *Annurca* Apple Extract on Hair Growth in Mice. *Curr Issues Mol Biol.* 2022 Dec 9;44(12):6280-6289. doi: 10.3390/cimb44120428.
- 30.** Pai, S.R. (2022). In Vitro Production of Terpenoids. In: Belwal, T., Georgiev, M.I., Al-Khayri, J.M. (eds) *Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4_8)
- 31.** Feng Xu, Xulong Huang, Hongmei Wu, Xiangpei Wang, Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 103, 2018, Pages 198-203, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.019>.
- 32.** Lou H, Li H, Zhang S, Lu H, Chen Q. A Review on Preparation of Betulinic Acid and Its Biological Activities. *Molecules.* 2021 Sep 14;26(18):5583. doi: 10.3390/molecules26185583. PMID: 34577056; PMCID: PMC8468263.
- 33.** Castellano, J.M.; Ramos-Romero, S.; Perona, J.S. Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity. *Nutrients* **2022**, *14*, 623. <https://doi.org/10.3390/nu14030623>
- 34.** Maisto, M.; Piccolo, V.; Novellino, E.; Schiano, E.; Iannuzzo, F.; Ciampaglia, R. Summa, V.; Tenore, G.C. Optimization of Ursolic Acid Extraction in Oil from *Annurca* Apple to Obtain Oleolytes with Potential Cosmeceutical Application. *Antioxidants* **2023**, *12*, 224.
- 35.** Cargnin, S.T.; Gnoatto, S.B. Ursolic Acid from Apple Pomace and Traditional Plants: A Valuable Triterpenoid with Functional Properties. *Food Chem* **2017**, *220*, 477–489.
- 36.** López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Recent Developments on the Extraction and Application of Ursolic Acid. A Review. **2018**

37. Yao, Mingfei, Hang Xiao, and David Julian McClements. "Delivery of lipophilic bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles." *Annual review of food science and technology* 5 (2014): 53-81.
38. Yugang Liu, Huiping Xia, Shiyin Guo, Peiwang Li, Si Qin, Meng Shi, Chaoxi Zeng, Effect and mechanism of edible oil co-digestion on the bioaccessibility and bioavailability of ursolic acid, *Food Chemistry*, Volume 423, 2023, 136220, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136220>.
39. Khwaza V, Oyedeki OO, Oselusi SO, Morifi E, Nwamadi M, Tantoh Ndinteh D, Ramushu P, Matsebale T, Aderibigbe BA. Synthesis of Ester-Linked Ursolic Acid-Based Hybrid Compounds: Potential Antibacterial and Anticancer Agents. *Chem Biodivers*. 2023 Apr;20(4):e202300034. doi: 10.1002/cbdv.202300034. Epub 2023 Mar 28. PMID: 36920086.
40. Lange, B.M. (2018). Commercial-Scale Tissue Culture for the Production of Plant Natural Products: Successes, Failures and Outlook. In: Schwab, W., Lange, B., Wüst, M.(eds) *Biotechnology of Natural Products*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_8)
41. Tabata, H. (2004). Paclitaxel Production by Plant-Cell-Culture Technology. In: Zhong, JJ. (eds) *Biomanufacturing. Advances in Biochemical Engineering*, vol 87. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b13538>
42. Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A. & García-Lara, S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* **248**, 1–18 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
43. Roberts, S. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol* 3, 387–395 (2007). <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.8>
44. Thomas Efferth, *Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures, Engineering*, Volume 5, Issue 1, 2019, Pages 50-59, ISSN 2095-8099.
45. L. Woźniak, S. Skapska, K. Marszałek Ursolic acid - A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities *Molecules*, 20 (11) (2015), pp. 20,614-20,641
46. Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111:187–228
47. Murthy, H.N., Lee, EJ. & Paek, KY. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite

accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **118**, 1–16 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>

**48.** Brigida D'Abrosca, Monica Scognamiglio, Luisa Corrado, Ilaria Chiocchio, Luigi Zampella, Francesco Mastrobuoni, Pietro Rega, Marco Scortichini, Antonio Fiorentino, Milena Petriccione, Evaluation of different training systems on Annurca apple fruits revealed by agronomical, qualitative and NMR-based metabolomic approaches, *Food Chemistry*, Volume 222, 2017, Pages 18-27, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.144>.

**49.** McClure KA, Gong Y, Song J, Vinqvist-Tymchuk M, Campbell Palmer L, Fan L, Burgher-MacLellan K, Zhang Z, Celton JM, Forney CF, Migicovsky Z, Myles S. Genome-wide association studies in apple reveal loci of large effect controlling apple polyphenols. *Hortic Res.* 2019 Sep 7;6:107. doi: 10.1038/s41438-019-0190-y**50.** Menbari, A.; Bahramnejad, B.; Abuzaripoor, M.; Shahmansouri, E.; Zarei, M.A. Establishment of Callus and Cell Suspension Cultures of Granny Smith Apple Fruit and Antityrosinase Activity of Their Extracts. *Sci. Hortic.* 2021, *286*, 110222.

**51.** R.S. Kumar, C. Joshi, T.K. Nailwal Callus induction and plant regeneration from leaf explants of Apple (*Pyrus malus* L.) cv. Golden Delicious *Int J Curr Microbiol Appl Sci.*, 5 (2016), pp. 502-510

**52.** Zhang, Y., Bozorov, T.A., Li, D.X. *et al.* An efficient in vitro regeneration system from different wild apple (*Malus sieversii*) explants. *Plant Methods* **16**, 56 (2020).

**53.** T. Saeed, M.M. Khan, M. Aslam, M. Usman, K. Zia Effect of benzyl adenine on callus formation in apple Institute of Horticultural Sciences, University of Agriculture, Faisalabad (2007)

**54.** C. D'Onofrio, S. Morini Effects of light quality on induction and growth of MM106 apple callus cultures *Adv Hortic Sci*, 16 (2002), pp. 47-52

**55.** Hrazdina, G., Borejsza-Wysocki, W., Lester, C. Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *Venturia inaequalis* (1997) *Phytopathology*, 87 (8), pp. 868-876.

**56.** Tripathi, D., Bisht, A., Singh, M., Bhatt, I.D. (2022). Optimization of In Vitro Cell Culture Conditions for Increasing Biomass and Nutraceutical Production. In: Belwal, T., Georgiev, M.I., Al-Khayri, J.M. (eds) *Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-16-8858-4_15)

**57.** Momoko Ikeuchi, Keiko Sugimoto, Akira Iwase, Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression, *The Plant Cell*, Volume 25, Issue 9, September 2013, Pages 3159–3173

- 58.** Fehér Attila: Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology. *Frontiers in Plant Science*, Volume 10, 2019
- 59.** Momoko Ikeuchi, David S. Favero, Yuki Sakamoto, Akira Iwase, Duncan Coleman, Bart Rymen, Keiko Sugimoto Molecular Mechanisms of Plant Regeneration Annual Review of Plant Biology 2019 70:1, 377-406
- 60.** Momoko Ikeuchi, Akira Iwase, Bart Rymen, Alice Lambolez, Mikiko Kojima, Yumiko Takebayashi, Jefri Heyman, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Lieven De Veylder, Hitoshi Sakakibara, Keiko Sugimoto, Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes, *Plant Physiology*, Volume 175, Issue 3, November 2017, Pages 1158–1174
- 61.** Murthy, H.N., Dandin, V.S., Zhong, JJ., Paek, KY. (2014). Strategies for Enhanced Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures. In: Paek, KY., Murthy, H., Zhong, JJ. (eds) *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_20)
- 62.** Bouzroud, S.; El Maaiden, E.; Sobeh, M.; Merghoub, N.; Boukcim, H.; Kouisni, L.; El Kharrassi, Y. Biotechnological Approaches to Producing Natural Antioxidants: Anti-Ageing and Skin Longevity Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 1397. <https://doi.org/10.3390/ijms24021397>
- 63.** Donadio S. e Marino G: *Biotechnologie Microbiche* Casa Editrice Ambrosiana 2008
- 64.** Barket Ali, Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 31, 2021, 101884, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101884>.
- 65.** Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K. *et al.* Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **153**, 447–458 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8>
- 66.** Sarkate, A., Banerjee, S., Mir, J.I. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **130**, 641–649 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1253-0>
- 67.** Z. Cai, A. Kastell & I. Smetanska (2014) Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures

of *Malus × domestica* Borkh., The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 89:1, 93-99, DOI: 10.1080/14620316.2014.11513054

**68.** Feria-Romero, I., Lazo, E., Ponce-Noyola, T. *et al.* Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Biotechnol Lett* **27**, 839–843 (2005). <https://doi.org/10.1007/s10529-005-6215-7>

**69.** Klöckner, W., Diederichs, S., Büchs, J. (2013). Orbitally Shaken Single-Use Bioreactors. In: Eibl, D., Eibl, R. (eds) Disposable Bioreactors II. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 138. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_188](https://doi.org/10.1007/10_2013_188)

**70.** Yesil-Celiktas, O., Vardar-Sukan, F. (2013). Downstream Processes for Plant Cell and Tissue Culture. In: Chandra, S., LATA, H., Varma, A. (eds) Biotechnology for Medicinal Plants. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2_1)

**71.** Kontogianni, V.G.; Tomic, G.; Nikolic, I.; Nerantzaki, A.A.; Sayyad, N.; Stosic-Grujicic, S.; Stojanovic, I.; Gerathanassis, I.P.; Tzakos, A.G. Phytochemical Profile of Rosmarinus Officinalis and Salvia Officinalis Extracts and Correlation to Their Antioxidant and Anti-Proliferative Activity. *Food Chem.* 2013, 136, 120–129.

**72.** ICH Official. Available online: <https://www.ich.org/> (accessed on 17 February 2022)

**73.** Tegan Armarego-Marriott and others, Beyond the darkness: recent lessons from etiolation and de-etiolation studies, *Journal of Experimental Botany*, Volume 71, Issue 4, 7 February 2020, Pages 1215–1225, <https://doi.org/10.1093/jxb/erz496>

**74.** Rana S, Bhushan S. Apple phenolics as nutraceuticals: assessment, analysis and application. *J Food Sci Technol.* 2016 Apr;53(4):1727-38. doi: 10.1007/s13197-015-2093-8. Epub 2015 Nov 23. PMID: 27413201; PMCID: PMC4926896.

**75.** Hrelia S, Angeloni C, Barbalace MC. Agri-Food Wastes as Natural Source of Bioactive Antioxidants. *Antioxidants (Basel).* 2023 Feb 2;12(2):351. doi: 10.3390/antiox12020351. PMID: 36829910; PMCID: PMC9951869.

**76.** Aminfar, Z., Rabiei, B., Tohidfar, M. *et al.* Identification of key genes involved in the biosynthesis of triterpenic acids in the mint family. *Sci Rep* **9**, 15826 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52090-z>

**77.** Wang L, Pan X, Jiang L, Chu Y, Gao S, Jiang X, Zhang Y, Chen Y, Luo S, Peng C. The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A

Review. *Front Nutr.* 2022 Jun 29; 9:943911. doi: 10.3389/fnut.2022.943911. PMID: 35845802; PMCID: PMC9278960.

**78.** Gondor, O. K., Janda, T., Soós, V., Pál, M., Majláth, I., Adak, M. K., Balázs, E., & Szalai, G. (2016). Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1447.

**79.** Majdi, M., Abdollahi, M. R., & Maroufi, A. (2015). Parthenolide accumulation and expression of genes related to parthenolide biosynthesis affected by exogenous application of methyl jasmonate and salicylic acid in *Tanacetum parthenium*. *Plant Cell Reports*, 34, 1909–1918.

**80.** Rizan Elyasi, Mohammad Majdi, Bahman Bahramnejad, Ghader Mirzaghaderi, Spatial modulation and abiotic elicitors responses of the biosynthesis related genes of mono/triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*), *Industrial Crops and Products*, Volume 79, 2016, Pages 240-247, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.005>

**81.** Vergara Martínez VM, Estrada-Soto SE, Arellano-García JJ, Rivera-Leyva JC, Castillo-España P, Flores AF, Cardoso-Taketa AT, Perea-Arango I. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Enhanced the Production of Ursolic and Oleanolic Acid in Callus Cultures of *Lepetchinia Caulescens*. *Pharmacogn Mag.* 2018 Jan;13(Suppl 4):S886-S889. doi: 10.4103/pm.pm\_77\_17. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29491649; PMCID: PMC5822516.

**82.** T. Khan, T. Khan, C. Hano, B.H. Abbasi, Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica* *Ind. Crops Prod.*, 129 (2019), pp. 525-535, 10.1016/j.indcrop.2018.12.048

**83.** Poornima D Vijendra, Sathisha G Jayanna, Vadlapudi Kumar, Torankumar Sannabommaji, Rajashekar J, Hari Gajula, Product enhancement of triterpenoid saponins in cell suspension cultures of *Leucas aspera* Spreng, *Industrial Crops and Products*, Volume 156, 2020, 112857, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112857>.

**84.** Bavi, K., Khavari-Nejad, R.A., Najafi, F. *et al.* Phenolics and terpenoids change in response to yeast extract and chitosan elicitation in *Zataria multiflora* cell suspension culture. *3 Biotech* 12, 163 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03235-x>