

Dall'estrazione del fitocomplesso al test in vitro: un innovativo approccio ecosostenibile per l'ottenimento di principi attivi

Rivolta d'Adda, 22 giugno 2017

Alex Severgnini e Roberto Puglisi, Istituto Spallanzani

Progetto finanziato da:



fondazione
cariplo

Sponsor dell'evento:



LUMSON
Cosmetic Packaging Industries

GRAFICHE CAM

Pandino (CR)

Valorizzazione delle biomasse vegetali tramite l'uso di metodologie fisiche e a basso impatto ambientale

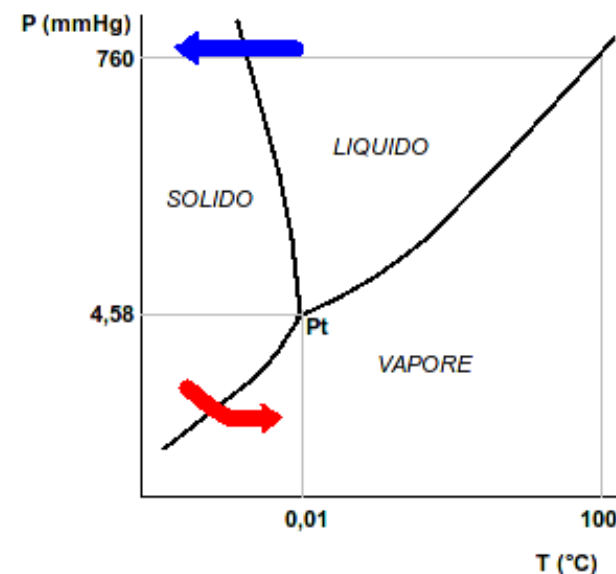
- ✓ Valorizzazione delle masse algali attraverso il loro trattamento con metodi basati su principi fisici atti a preservarne l'attività biologica dei fitocomplessi ottenuti;
- ✓ Utilizzo di un sistema di estrazione dei principi attivi altamente efficace e sostenibile dal punto di vista ambientale ed economico



Processo di liofilizzazione

Al fine di non compromettere le proprietà prestazionali delle microalghe, è preferibile fin da subito congelare il prodotto e sottoporlo successivamente lo stesso ad un processo di liofilizzazione.

La liofilizzazione è un procedimento di essiccazione complesso che permette di sottrarre acqua al prodotto da trattare attraverso il passaggio diretto da solido a vapore (sublimazione dell'acqua dal materiale preventivamente congelato



Vantaggi della liofilizzazione

✓ Conservazione della distribuzione originaria dei vari componenti.



L'elevata porosità del liofilizzato consente un'ottima re-idratabilità e quindi un successivo aumento della resa estrattiva.



Nel corso del processo la temperatura del prodotto può essere mantenuta al di sotto dei livelli considerati pericolosi (composti termolabili come le ficocianine contenute nella spirulina).

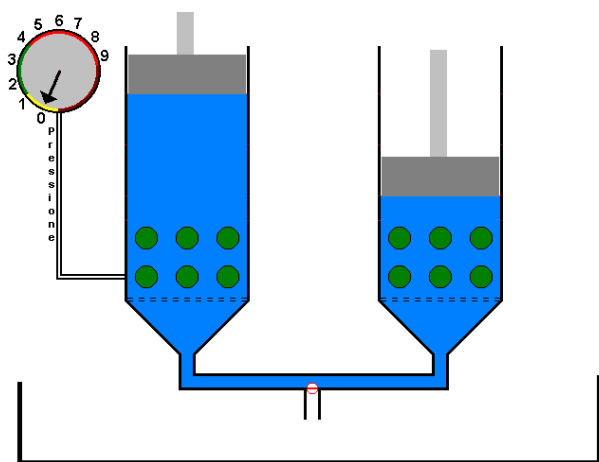


Riduzione dei fenomeni di alterazione (denaturazione proteica, imbrunimento non enzimatico, reazioni enzimatiche, perdita di sostanze volatili)

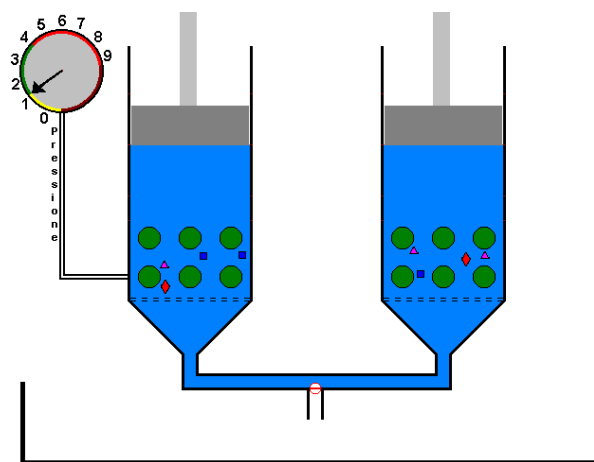
PRINCIPIO DI NAVIGLIO (Estrazione solido - liquido)

La generazione, con un opportuno solvente, di un gradiente di pressione negativo tra l'esterno e l'interno di una matrice solida contenente del materiale estraibile, seguita da un repentino ripristino delle condizioni di equilibrio iniziali, induce l'estrazione forzata dei composti non chimicamente legati alla struttura principale di cui è costituito il solido.

Fasi dell'estrazione rapida solido-liquido dinamica (funzionamento)

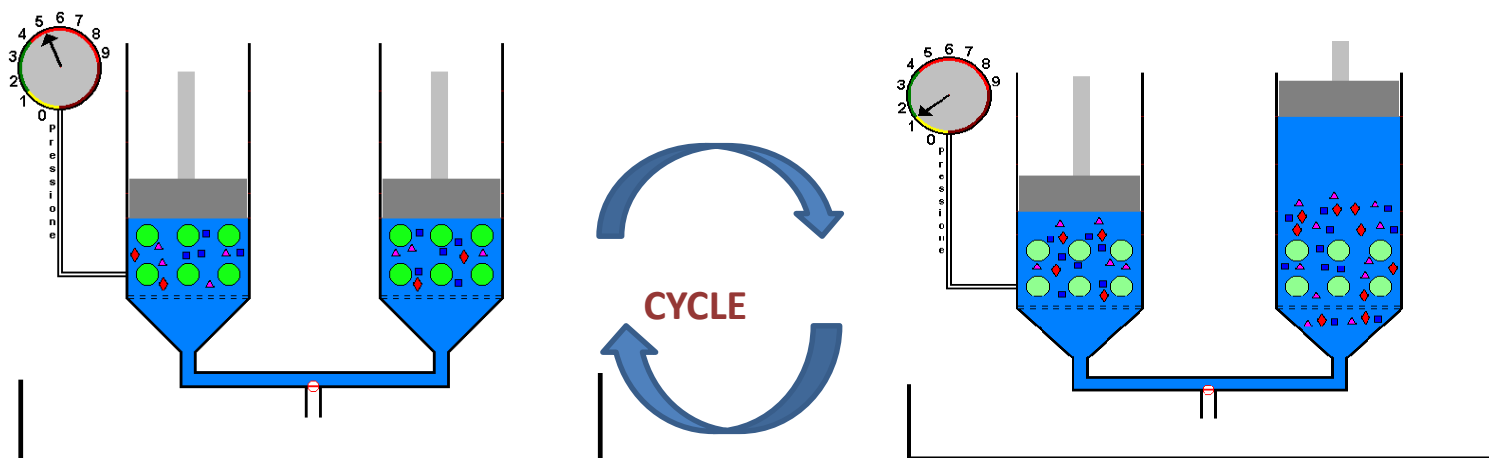


Caricamento delle camere di estrazione con la matrice solida (cerchi verdi) e il solvente estraente (colore blu)



Chiusura del sistema e avvio della compressione del solvente (le figure geometriche variamente colorate rappresentano i principi attivi)

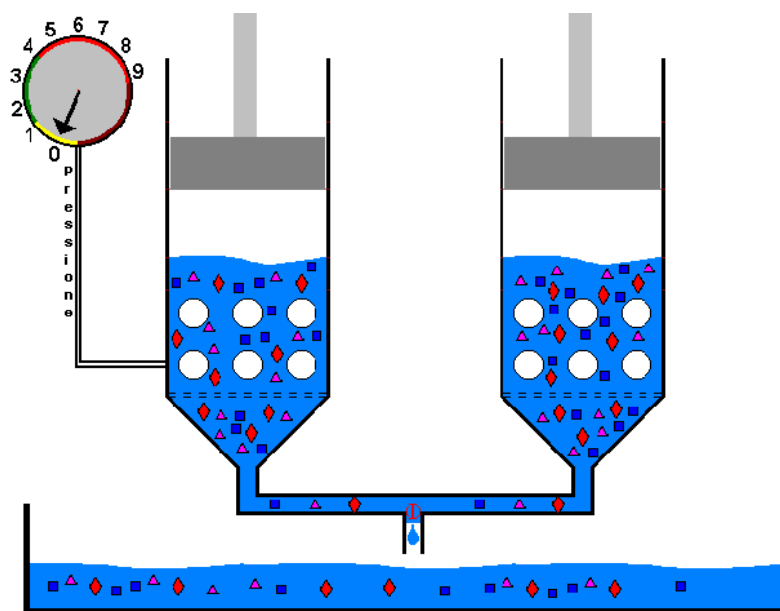
Fasi dell'estrazione rapida solido-liquido dinamica (funzionamento)



Massima compressione del sistema e inizio della fase di STATICA

Decompressione rapida del sistema e avvio della fase di DINAMICA

Fasi dell'estrazione rapida solido-liquido dinamica (funzionamento)



**Fine del processo estrattivo e avvio della
fase di scarico**

Vantaggi della tecnica estrattiva

- ✓ Estrazione esaustiva della matrice solida
- ✓ Processo estrattivo a temperatura ambiente o sub-ambiente
 - ✓ I composti termolabili non sono degradati
- ✓ Tempi di estrazione ridotti (50-100 volte più veloce della macerazione tradizionale)
- ✓ Riproducibilità della composizione dell'estratto

Applicazioni dell'estrattore Naviglio

- ✓ Produzione del limoncello, amari e altre bevande alcoliche
 - ✓ Produzione di soft drinks (Fresh App)
- ✓ Estrazione dei principi attivi dalle piante officinali e da sottoprodotti e/o biomasse vegetali
 - ✓ Estrazione dei dolcificanti della stevia

Trattamento e valutazione dell'estratto

Ai fini di una corretta conservazione dell'estratto e di una sua attenta valutazione su modelli cellulari in vitro, il fitocomplesso ottenuto in forma liquida va liofilizzato e l'estratto solido ottenuto impiegato in una serie di esperimenti al fini di determinarne la tossicità e le attività biologiche delle dosi non risultate tossiche.


I test in vitro sui fitocomplessi estratti

I RADICALI LIBERI


Sono specie chimiche molto reattive con uno o più elettroni spaiati.

Le specie reattive dell'ossigeno sono indicate come ROS (Reacting Oxygen Species)

esempio i radicali:



perossido ($\text{ROO}\bullet$)



superossido ($\text{O}_2\text{-}\bullet$)



ossidrilico ($\text{OH}\bullet$)



I RADICALI LIBERI

Si formano naturalmente durante le reazioni enzimatiche

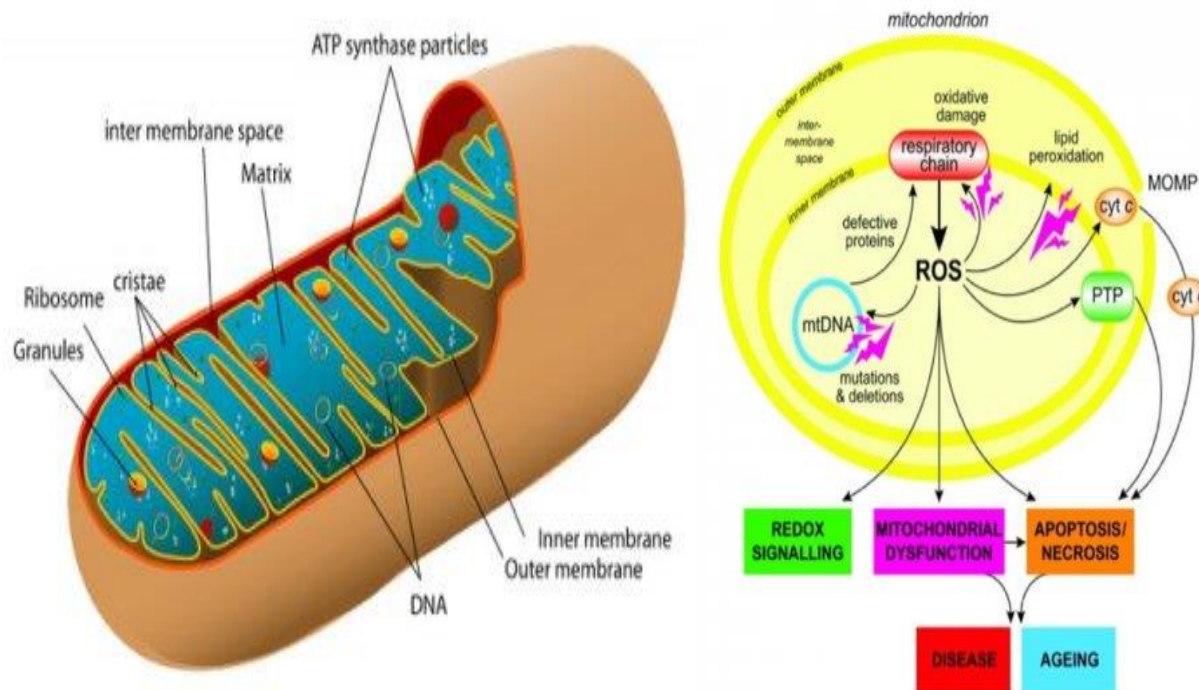


Ma possono anche avere origine esogena: sostanze chimiche, farmaci, U.V., smog

Sono potenzialmente pericolosi per l'integrità cellulare. Bersagli tipici sono i lipidi di membrana, proteine ed enzimi contenenti gruppi SH, carboidrati e acidi nucleici (DNA)

Il Mitocondrio

Produzione di ATP (potere riducente)



I processi biochimici interni al mitocondrio portano alla produzione di **ROS**

E' spesso considerato un target per i prodotti cosmetici e principi attivi volti al mantenimento della sua struttura, alla sua stimolazione per la produzione di ATP e contro la produzione di ROS

I fibroblasti

Cellule più comuni del derma, producono collagene ed elastina e sono responsabili dell'elasticità e tonicità della pelle

I ROS agiscono sui fibroblasti riducendone il numero e, di conseguenza, causano la diminuzione della produzione di elastina e collagene nella pelle

La valutazione della citotossicità cellulare è un passaggio obbligato prima di qualsiasi altro test

Infatti, prima di stabilire l'efficacia o la funzionalità di un principio attivo bisogna stabilire la percentuale alla quale la sostanza inizia a provocare la mortalità cellulare

I test di citotossicità e di valutazione di eventuali effetti protettivi in risposta a stress ossidativo indotto da perossido di idrogeno sono stati condotti in cieco su 4 estratti di spirulina:



Idrosolubile
liofilizzato



SP (K1)



Idrosolubile
liofilizzato



SP2 (ZA)



Etanolic in k1
liofilizzato



K1



Etanolic in
Zarruk
liofilizzato



ZA

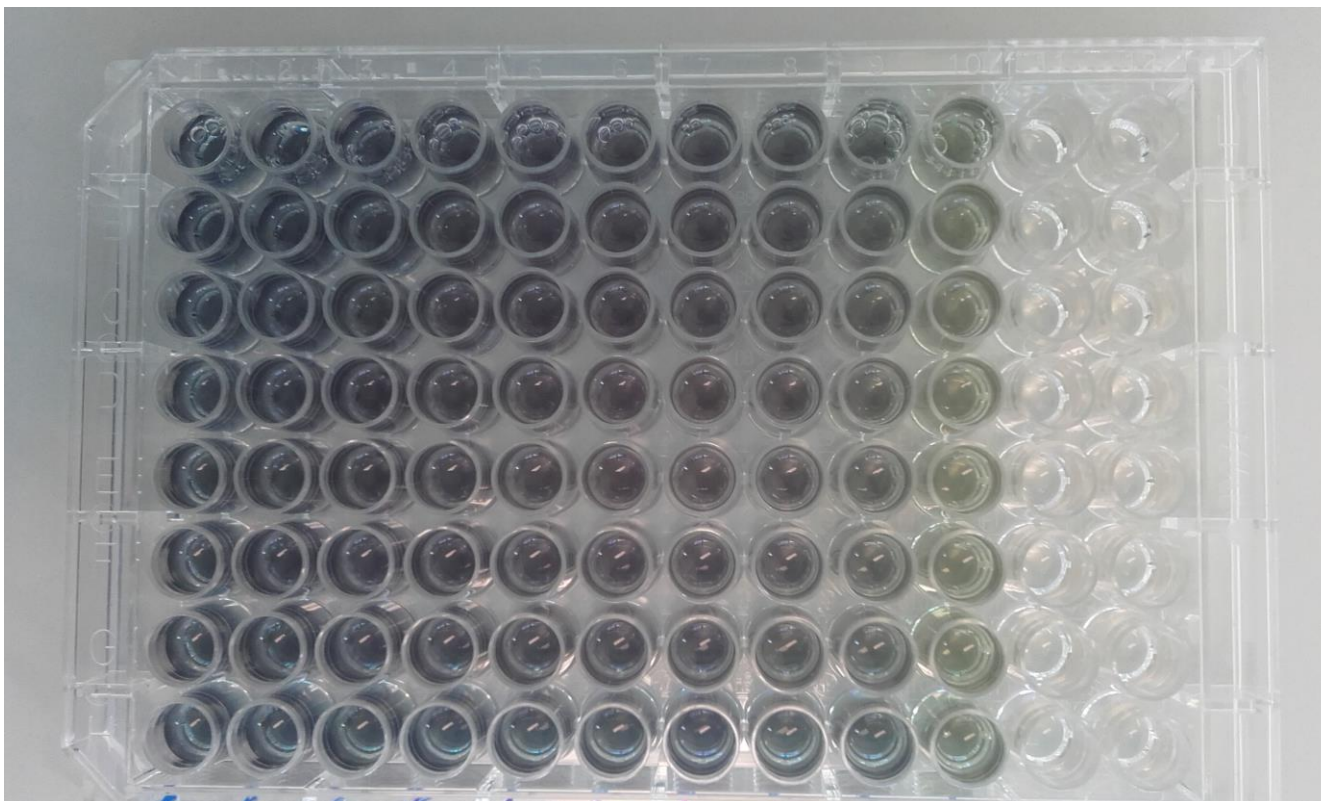


Il test colorimetrico MTT

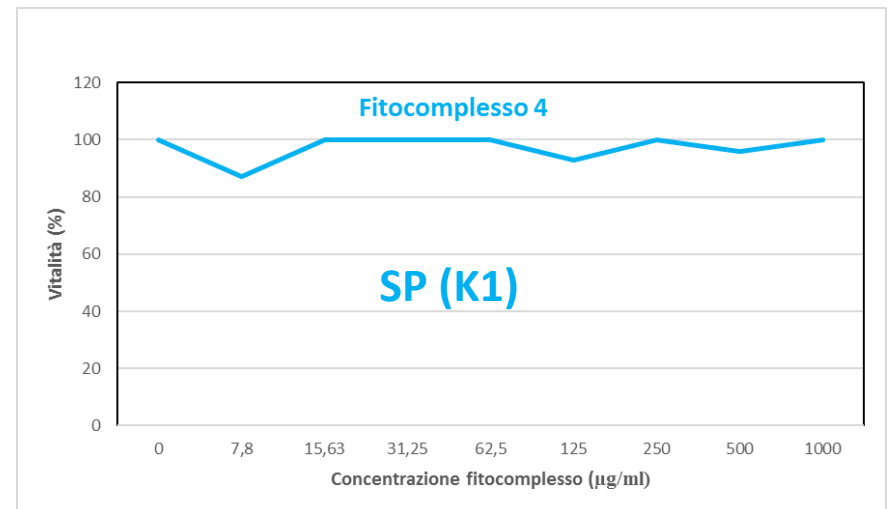
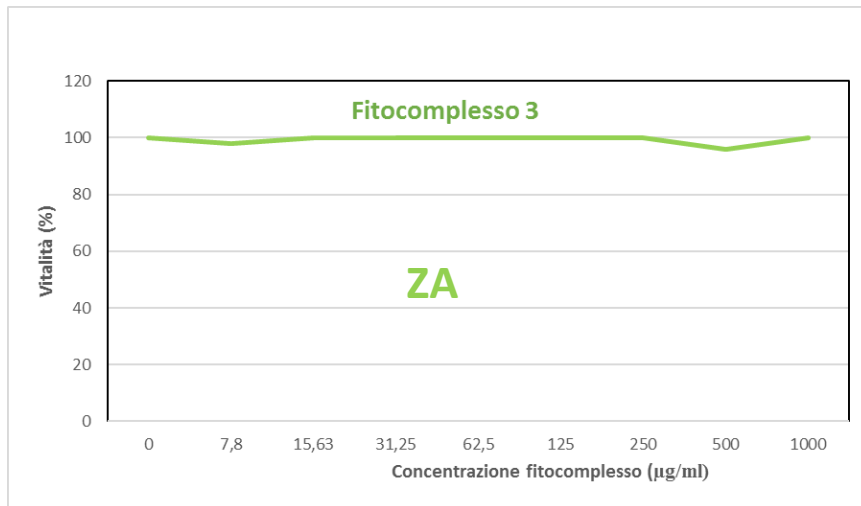
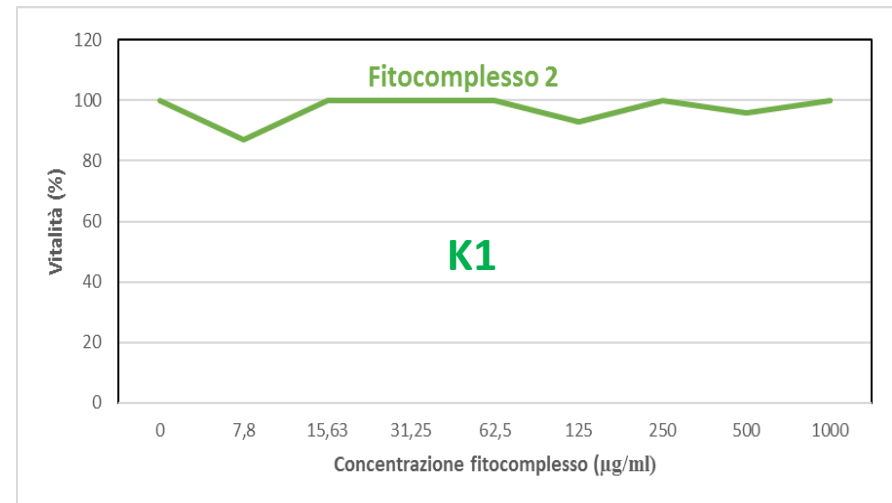
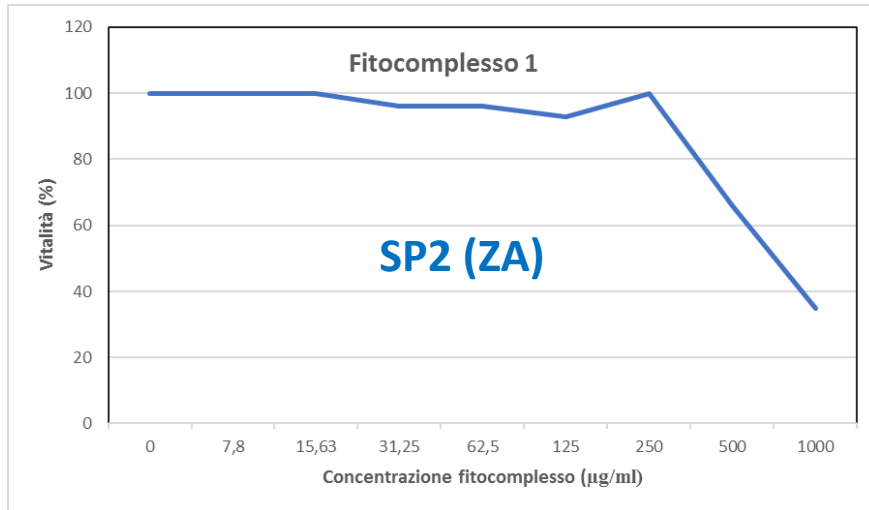
bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Il saggio MTT, misura l'attività degli enzimi mitocondriali (succinato deidrogenasi) che riducono l'MTT (giallo) a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo

Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica



Risultati MTT



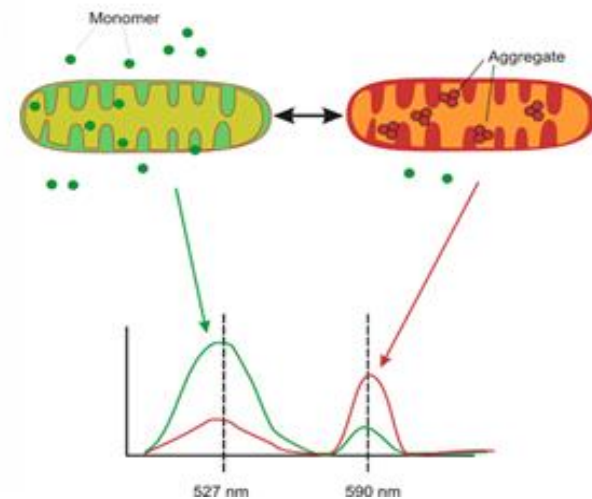
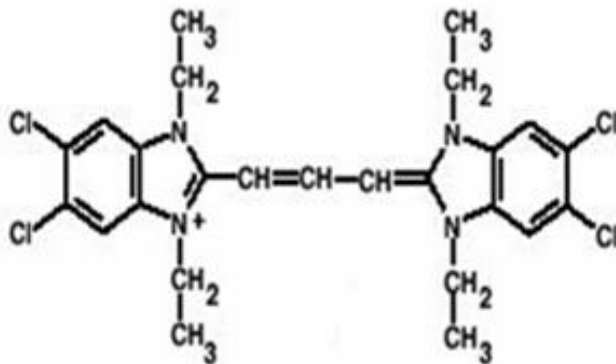
Il test per il potenziale mitocondriale in citofluorimetria

colorante fluorescente 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-traethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)

La sonda si accumula nella matrice mitocondriale interna grazie al gradiente elettrochimico a cavallo delle creste mitocondriali.

Alto potenziale di membrana: accumulo maggiore in forma degli aggregati (fluorescenza gialla-arancio).

Basso potenziale: accumulo di colorante a basse concentrazione in forma monomeric (fluorescenza verde).



Risultati test potenziale mitocondriale

| | | Fitocomplesso 1 | |
|-----------|------------|-----------------|--------------|
| H2O2 (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 97,6 (0,9) | 94,2 (0,8) | 92,1 (0,9) |
| 0,5 | 94,2 (1,5) | 88,2 (0,1) | 87,3 (0,8) |
| 1,5 | 68,5 (7,0) | 66,9 (0,3) | 72,3 (0,7) |
| 3,0 | 52,6 (1,0) | 38,5 (0,5) * | 44,7 (1,1) |
| 4,5 | 44,8 (6,6) | 32,1 (0,2) | 29,6 (2,2) * |

SP2 (ZA)

| | | Fitocomplesso 2 | |
|-----------|------------|-----------------|----------------|
| H2O2 (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 97,6 (0,9) | 96,0 (0,3) | 92,9 (1,2) |
| 0,5 | 94,2 (1,5) | 55,9 (0,3) *** | 47,1 (0,2) *** |
| 1,5 | 68,5 (7,0) | 31,4 (2,5) *** | 17,5 (0,3) *** |
| 3,0 | 52,6 (1,0) | 18,7 (1,1) *** | 10,0 (0,6) *** |
| 4,5 | 44,8 (6,6) | 6,6 (0,1) *** | 3,6 (2,5) *** |

K1

Fibroblasti con potenziale mitocondriale attivato (%), media \pm (DS), in colture di controllo e trattate per 24 ore con 4 fitocomplessi a concentrazione Bassa e Alta, dopo trattamento per 30 min. con H2O2 a concentrazioni crescenti.

MIGLIORATIVO PEGGIORATIVO

Risultati test potenziale mitocondriale

| | | Fitocomplesso 3 | |
|-----------|------------|-----------------|----------------|
| H2O2 (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 97,6 (0,9) | 95,7 (0,2) | 93,8 (0,4) |
| 0,5 | 94,2 (1,5) | 72,7 (1,6) *** | 50,2 (2,5) *** |
| 1,5 | 68,5 (7,0) | 55,5 (0,7) | 23,8 (0,9) *** |
| 3,0 | 52,6 (1,0) | 25,4 (3,9) *** | 4,2 (0,9) *** |
| 4,5 | 44,8 (6,6) | 6,9 (0,2) *** | 1,4 (0,2) *** |

ZA

| | | Fitocomplesso 4 | |
|-----------|------------|-----------------|----------------|
| H2O2 (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 97,6 (0,9) | 93,6 (0,2) | 94,5 (0,2) |
| 0,5 | 94,2 (1,5) | 84,3 (1,7) * | 89,0 (1,5) |
| 1,5 | 68,5 (7,0) | 75,5 (1,2) | 80,3 (1,1) |
| 3,0 | 52,6 (1,0) | 45,1 (3,5) | 61,4 (1,3) |
| 4,5 | 44,8 (6,6) | 20,1 (0,7) *** | 22,4 (2,2) *** |

SP (K1)

Fibroblasti con potenziale mitocondriale attivato (%), media \pm (DS), in colture di controllo e trattate per 24 ore con 4 fitocomplessi a concentrazione Bassa e Alta, dopo trattamento per 30 min. con H2O2 a concentrazioni crescenti.

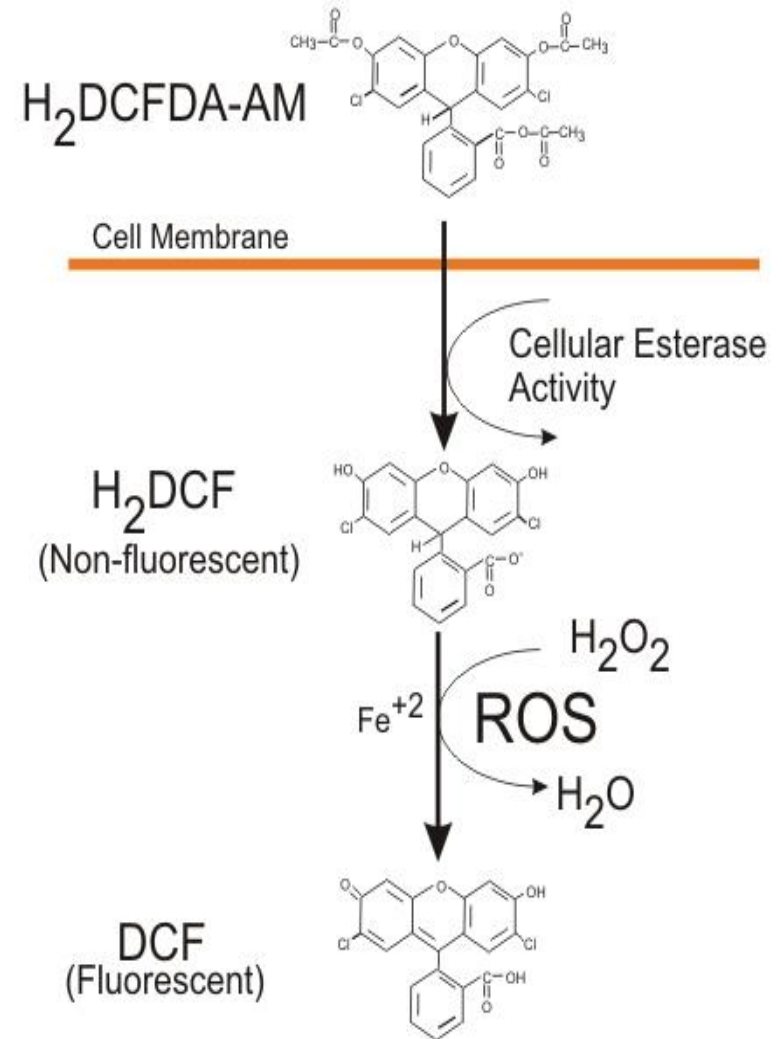
MIGLIORATIVO PEGGIORATIVO

Il test per la valutazione dei ROS in citofluorimetria

colorante fluorescente diidro-2'-7'-diclorofluoresceina diacetato (H₂DCF-DA)

La sonda H₂DCF-DA penetra nelle cellule dove viene trasformata dalle esterasi endogene in una forma non fluorescente (H₂DCF).

In presenza di ROS intracellulari, la H₂DCF è ossidata in un composto fluorescente, la diclorofluoresceina (DCF). La DCF prodotta è quantificata (intensità di fluorescenza) mediante lettura con citometro a flusso ed è proporzionale alla quantità di ROS.



Risultati test valutazione dei ROS

| | | Fitocomplesso 1 | |
|------------------------------------|-------------|-----------------|-------------|
| H ₂ O ₂ (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 21,6 (3,0) | 21,5 (0,2) | 21,6 (0,2) |
| 0,5 | 30,6 (5,6) | 35,3 (0,1) | 30,8 (0,3) |
| 1,5 | 60,3 (9,4) | 68,8 (0,4) | 55,0 (0,5) |
| 3,0 | 84,1 (1,9) | 87,8 (0,4) | 74,3 (1,9) |
| 4,5 | 112,5 (1,7) | 113,2 (3,0) | 100,2 (1,5) |

SP2 (ZA)

| | | Fitocomplesso 2 | |
|------------------------------------|-------------|-----------------|-------------|
| H ₂ O ₂ (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 21,6 (3,0) | 17,4 (4,8) | 21,5 (0,1) |
| 0,5 | 30,6 (5,6) | 33,1 (3,9) | 33,3 (0,4) |
| 1,5 | 60,3 (9,4) | 51,4 (6,8) | 54,6 (0,4) |
| 3,0 | 84,1 (1,9) | 72,1 (7,3) | 76,8 (2,9) |
| 4,5 | 112,5 (1,7) | 92,4 (8,2) | 103,6 (1,0) |

K1

Intensità di fluorescenza verde (Unità Arbitraria) media ± (DS), in fibroblasti di controllo e trattati per 24 ore con 4 fitocomplessi a concentrazione Bassa e Alta, dopo trattamento con H₂O₂ a concentrazioni crescenti.

MIGLIORATIVO **PEGGIORATIVO**

Risultati test valutazione dei ROS

| | Fitocomplesso 3 | | |
|------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| H ₂ O ₂ (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 21,6 (3,0) | 22,1 (1,2) | 25,9 (0,1) |
| 0,5 | 30,6 (5,6) | 31,5 (1,3) | 32,0 (0,5) |
| 1,5 | 60,3 (9,4) | 57,3 (3,3) | 60,9 (3,5) |
| 3,0 | 84,1 (1,9) | 85,6 (0,5) | 74,2 (0,5) |
| 4,5 | 112,5 (1,7) | 101,1 (7,8) | 103,2 (0,8) |

ZA

| | Fitocomplesso 4 | | |
|------------------------------------|-----------------|--------------|-------------|
| H ₂ O ₂ (mM) | Controllo | Bassa | Alta |
| 0 | 21,6 (3,0) | 29,1 (1,1) | 28,7 (0,9) |
| 0,5 | 30,6 (5,6) | 34,3 (0,2) | 37,6 (7,0) |
| 1,5 | 60,3 (9,4) | 56,7 (0,7) | 63,6 (0,2) |
| 3,0 | 84,1 (1,9) | 70,3 (0,2) | 90,1 (7,7) |
| 4,5 | 112,5 (1,7) | 118,7 (16,0) | 103,2 (0,3) |

SP (K1)

Intensità di fluorescenza verde (Unità Arbitraria) media ± (DS), in fibroblasti di controllo e trattati per 24 ore con 4 fitocomplessi a concentrazione Bassa e Alta, dopo trattamento con H₂O₂ a concentrazioni crescenti.

MIGLIORATIVO PEGGIORATIVO



Grazie dell'attenzione!

alex.severgnini@istitutospallanzani.it

roberto.puglisi@istitutospallanzani.it

Progetto finanziato da:



fondazione
cariplo

Sponsor dell'evento:



LUMSON
Cosmetic Packaging Industries

GRAFICHE CAM

Pandino (CR)