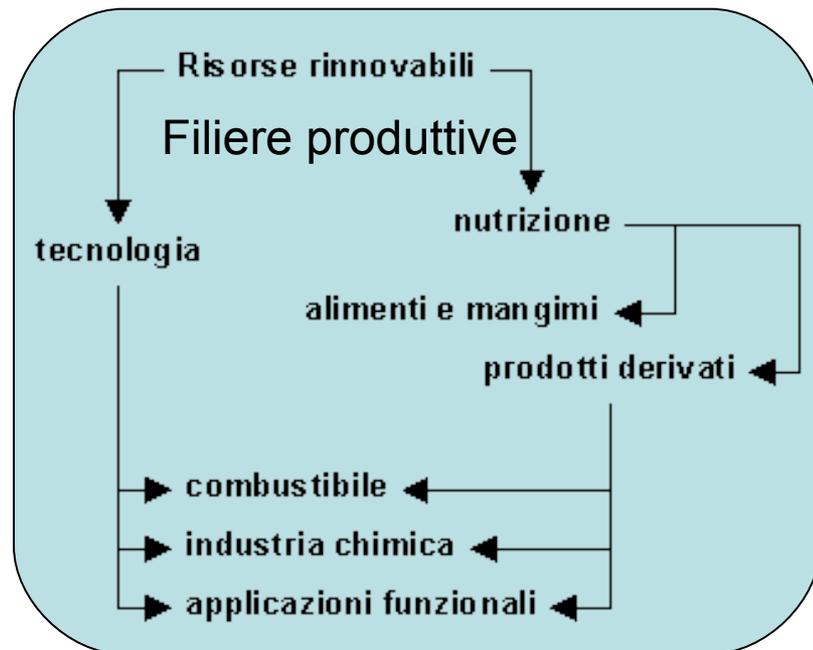
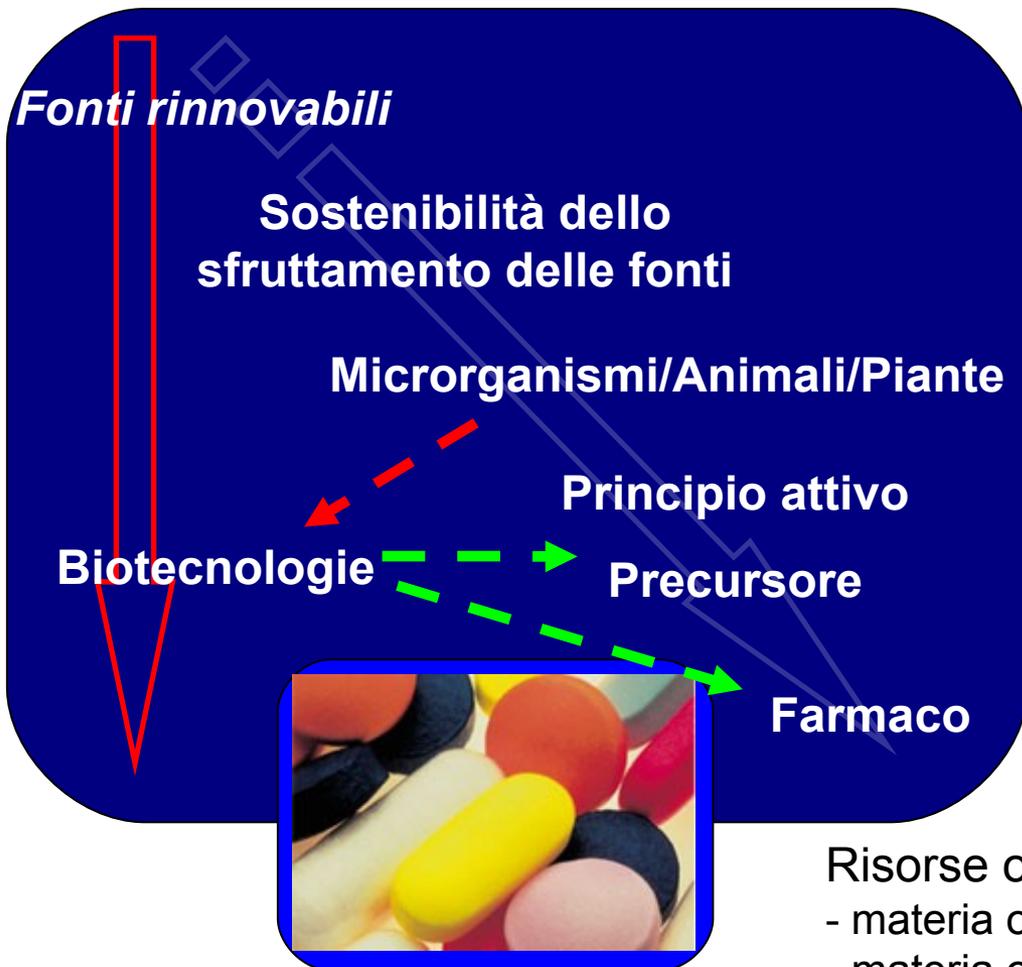


Dalle fonti naturali alle fonti *rinnovabili* dei farmaci: le piante e le biotecnologie

Se il farmaco è ottenibile da fonti rinnovabili e diversificate il valore aggiunto aumenta



Risorse o fonti rinnovabili:

- materia organica totale di un ecosistema
- materia organica vegetale da organismi fotosintetici
- materia totale sintetizzata derivante da fermentazioni



BIOTECNOLOGIE VEGETALI COME FONTI DI PRODOTTI SALUTISTICI

Definizione: insieme di discipline volte a valorizzare le capacità metaboliche e biologiche di organismi vegetali

Settori: Diagnostica, agricoltura, ingegneria impiantistica, farmaceutica, cosmetica, erboristica

PRODOTTI

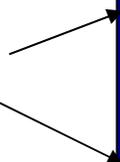
1. **CELLULE:** aggregati indifferenziati, in sospensione in bioreattori per ottenere P.A. e prodotti di biotrasformazione
2. **PIANTE RIGENERATE:** clonate, OGM (non le trattiamo), selezione

La produzione di sistemi vegetali mediante biotecnologie si attua generalmente attraverso

A: MICROPROPAGAZIONE

B: PRODUZIONE DI CALLI

Riproduzione
agamica
artificiale



DEFINIZIONI

Micropropagazione: coltivazione *in vitro* di apici (radicali o del germoglio) di piante erbacee o legnose per ottenere un alto tasso di propagazione cellulare (plantule *in vitro*)

Colture di calli: da frammenti di organi (espianti) sottoposti ad impianto *in vitro* su terreni di coltura opportuni (per nutrienti e soprattutto per composizione in ormoni vegetali). Si ottiene la generazione ammassi di tessuti indifferenziati (*calli*): colture in liquido o “in sospensione”

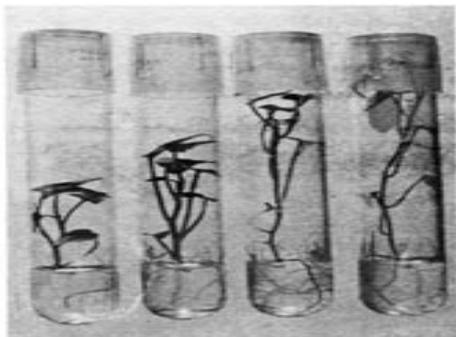


Figure 3. Sequence of in vitro development

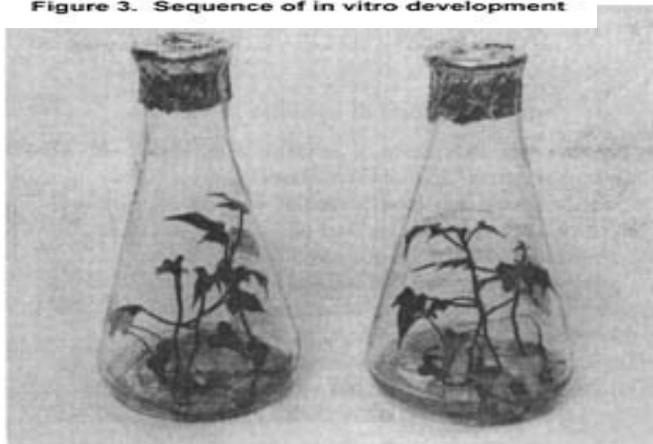
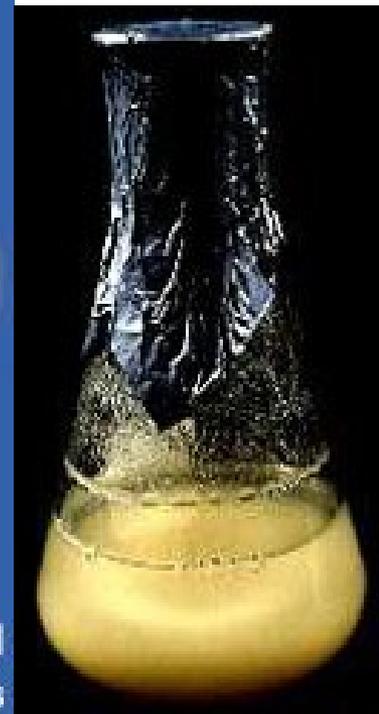


Figure 5. Liquid medium culture for rapid propagation



TERRENI DI COLTURA

Soluzione acquosa di varie sostanze scelte per la capacità di promuovere la crescita avvicinando le condizioni nutrizionali in vitro alle condizioni in cui la cellule si trova nell'organismo integro.

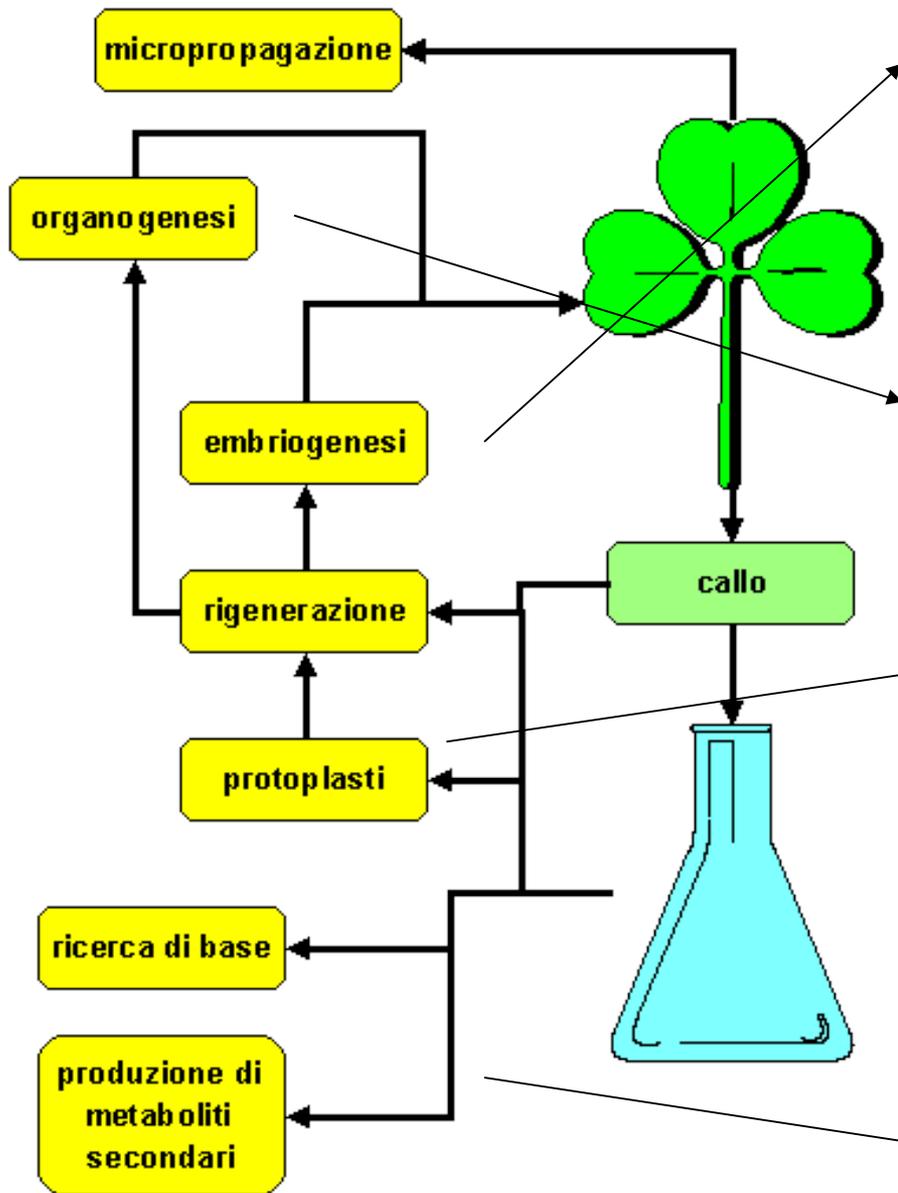
- evidenze sperimentali hanno determinato le reali ed essenziali esigenze nutrizionali delle cellule vegetali *in vitro*
- se avviene fotosintesi spesso NON è sufficiente a sopperire al fabbisogno energetico della coltura
- le richieste nutrizionali sono spesso specifiche per ciascun tipo di coltura orientata e stabilizzata
- attualmente esistono terreni standardizzati e chimicamente definiti (Muraschge & Skoog; Gamborg's, ecc.) ai quali vengono associate le esigenze specifiche di ciascuna coltura
- terreni di coltura liquidi
- terreni di coltura solidi (agar, gelatine, gel di poliacrilamide)

COMPOSIZIONE DI ALCUNI TERRENI USATI PER LA COLTURA DI CELLULE VEGETALI IN VITRO (valori espressi in milligrammi per litro)

Composto	Terreni di coltura per cellule di:		
	Nicotiana tabacum ¹	Acer pseudoplatanus ²	Calli aploidi da polline di Nicotiana tabacum ²
KCl	—	750	—
NH ₄ NO ₃	1650	—	720
KNO ₃	1900	—	950
NaNO ₃	—	600	—
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	75	220
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250	185
KH ₂ PO ₄	170	—	62
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	—	130	—
Na ₂ · EDTA	37,3	—	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	—	27,8
FeCl ₃ · 6H ₂ O	—	1	—
H ₃ BO ₃	6,2	1	10
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	0,1	25
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6	0,8	8
KJ	0,83	0,01	—
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	—	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,03	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	—	—
Saccarosio	30.000	20.000	20.000
Acido indolacetico	2,5	1	0,1
Chinetina	0,2	0,25	—
Tiamina · HCl	0,4	1,0	0,5
Mio-inositolo	100	100	100
Acido pantotenico	—	2,5	—
Acido nicotinico	—	—	5
Piridossina · HCl	—	—	0,5
Acido folico	—	—	0,5
Biotina	—	—	0,05
Glicina	—	—	2
Colina cloruro	—	0,5	—
Cisteina · HCl	—	10	—
Urea	—	200	—
pH corretto a:	5,6	5,2	5,5

Per terreni solidificati si aggiunge lo 0,8-1,0% di agar.

Le soluzioni vengono sterilizzate in autoclave allo scopo di eliminare eventuali contaminazioni microbiche.



Embriogenesi: processo di rigenerazione della pianta intera attraverso la formazione di un embrione somatico

Organogenesi: processo di rigenerazione della pianta intera attraverso la formazione diretta di organi vegetali

Formazione di ibridi somatici tra piante di genere o specie diverse che in natura non avvengono a partire da cellule private di pareti cellulari

Produzione di metaboliti secondari

Biotrasformazioni

Organogenesi

Organogenesi
in *Nicotiana*
Tabacum



2.0

0.03

CALLO



4.0

2.56

GERMOGLI



0.1

0

RADICI



3.0 *Auxine* (mg/l)

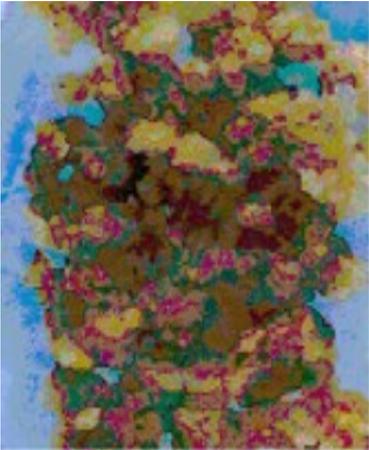
1.0 *Citochinine* (mg/l)

PLANTULE

Il rapporto tra concentrazione di auxine e citochinine è il principale fattore che guida il programma morfogenetico

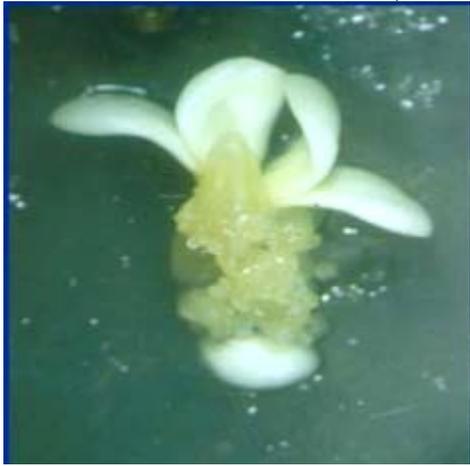
Embriogenesi somatica (sviluppo di embrioni da cellule diverse dalla zigote)

Da cellule uovo non fecondate, da cellule dei tessuti dell'ovulo, da cellule vegetative

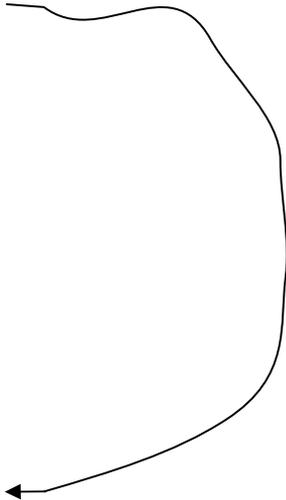


Callo

ormoni →



Embrione somatico



Pianta

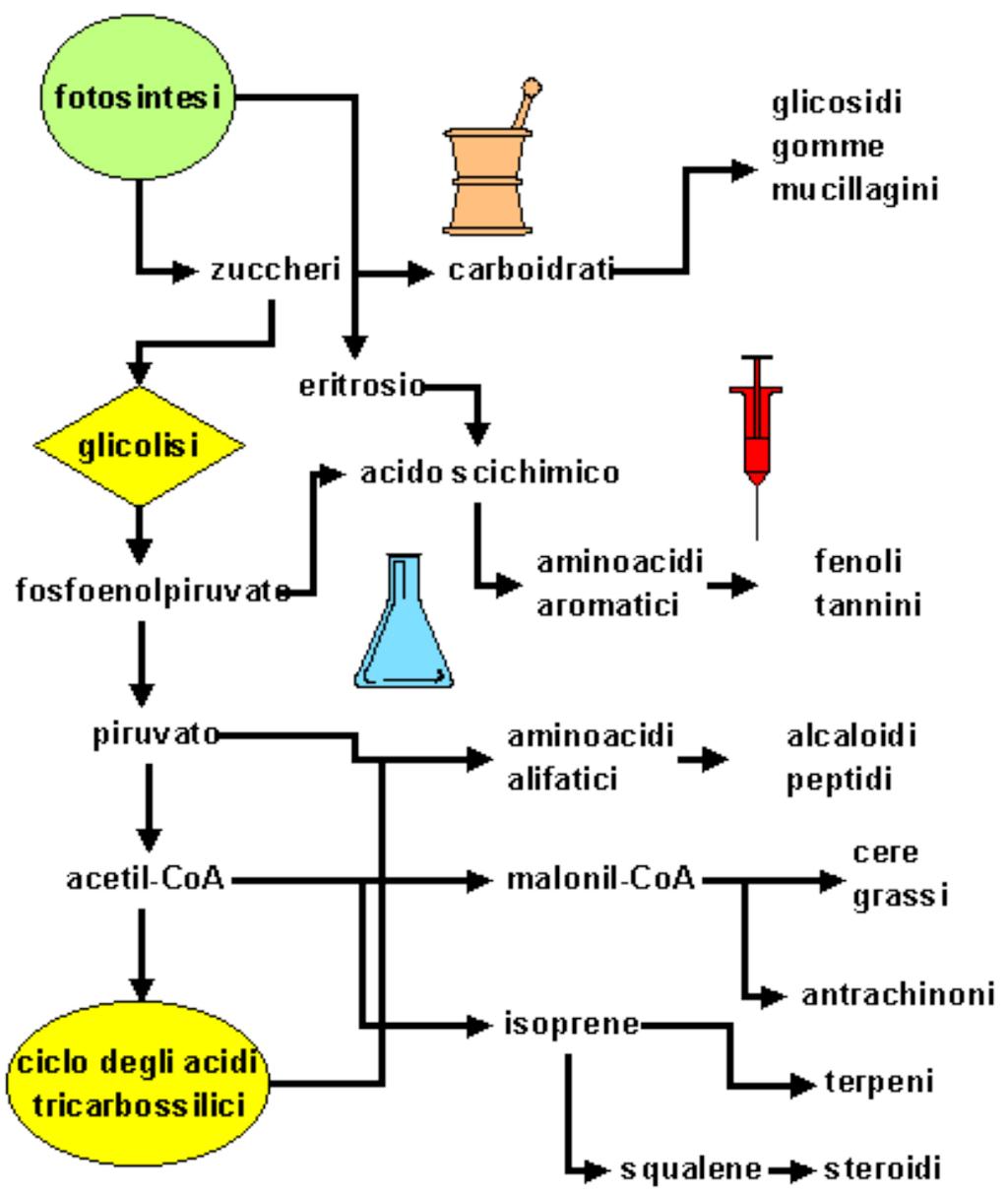
←

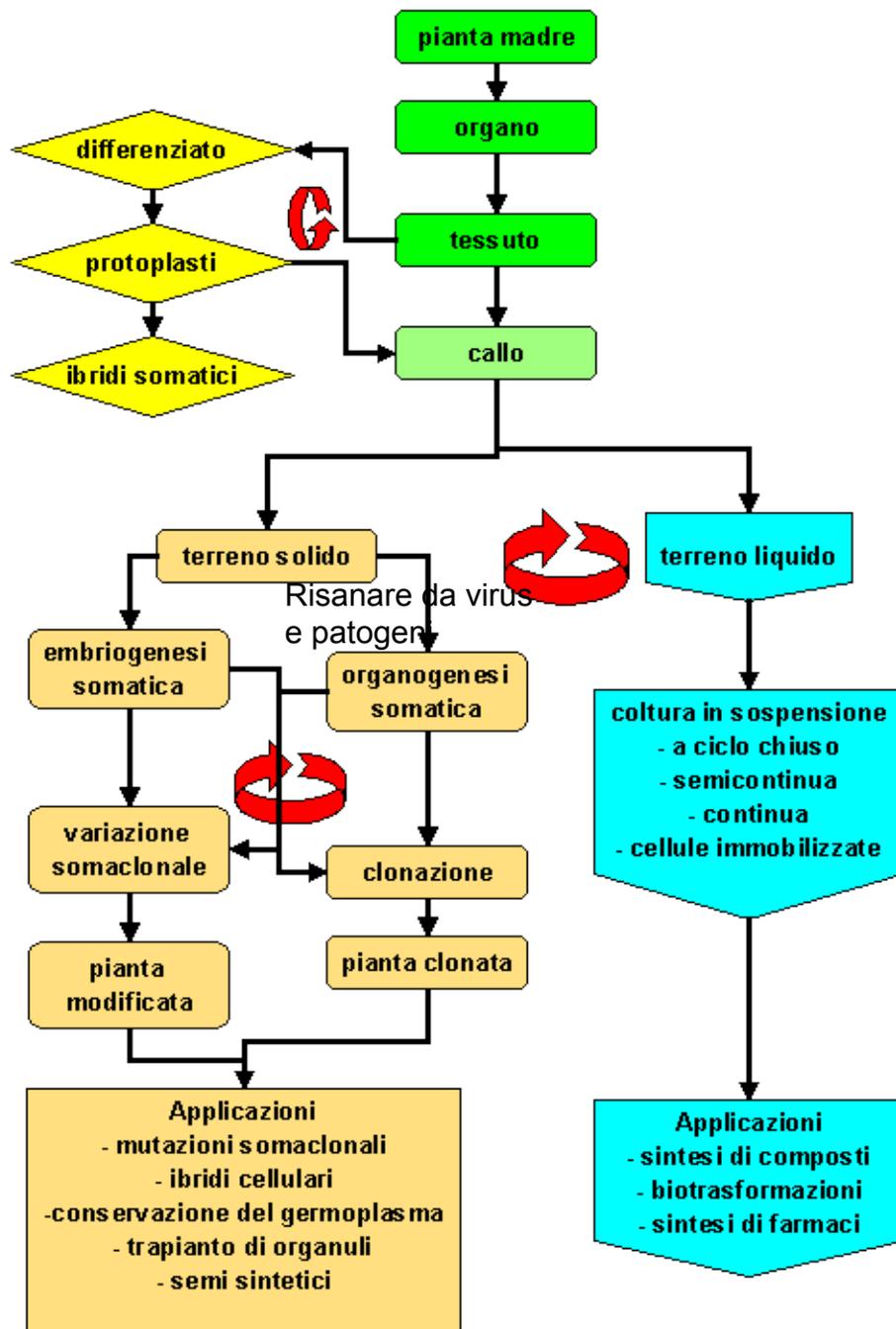


Plantula

vie metaboliche primarie

metaboliti secondari





1. **Colture in sospensione a ciclo chiuso**: mezzo liquido continuamente agitato. Circolazione d'aria; no ricambio nutrienti

2. **Colture in sospensione semi continue**: sistema "aperto"; analogo al precedente ma con ricambio continuo di terreno. Fase esponenziale di crescita costante

3. **Colture in sospensione continue**: chemostato + turbostato consentono un costante ricambio di terreno e cellule. La crescita avviene in condizioni estremamente controllate

Problematiche: rottura meccanica delle cellule; tendenza a formare aggregati; tendenza a differenziarsi

4. cellule immobilizzate all'interno di polimeri

GLI ORMONI VEGETALI

Sono composti determinanti nell'orientare e regolare la differenziazione e lo sviluppo degli organismi vegetali

- Sono prodotti in determinati distretti della pianta, vengono poi traslocati in zone più o meno lontane dove condizionano le attività metaboliche delle cellule e quindi lo sviluppo dell'intero organismo
- Non tutte le cellule vegetali in coltura sono in grado di produrre ormoni

GRUPPI PRINCIPALI di ormoni
classificabili in base alla funzione

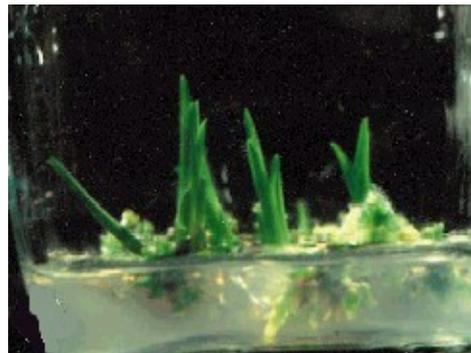
1. Auxine

2. Gibberelline

3. Citochine

4. Acido abscissico

5. Etilene



AUXINE

- la principale auxina isolata da tessuti vegetali è l'*acido indolacetico* (IAA). Altri composti con funzione auxinica sono stati sintetizzati in laboratorio

L'auxina regola una serie di processi di sviluppo come la **crescita per distensione del fusto**, **lo sviluppo del frutto**, **la formazione delle radici** e **la dominanza apicale**

GIBBERELLINE

- Giappone 1926, isolata per la prima volta da un fungo parassita del riso (*Giberella fujikuroi*). Il fungo producendo la gibberellina determinava un allungamento abnorme del fusto e delle foglie; le piante crescevano così deboli e stentate.

- 30 anni più tardi fu isolata una sostanza ad azione gibberellica e a struttura chimica analoga nel comune fagiolo (*Phaseolus vulgaris*): da qui la dimostrazione che tali sostanze sono comunemente presenti nelle piante ammalate

- scoperte ed isolate almeno 30 composti gibberellici

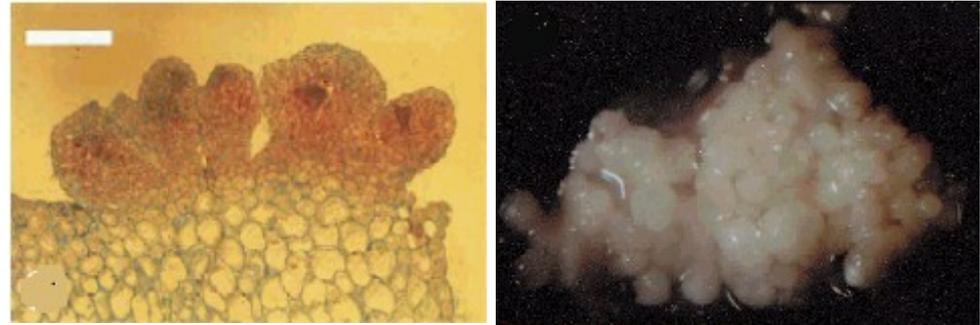
Influenzano la DIVISIONE CELLULARE e la crescita, regolano la FIORITURA e la DORMIENZA. Le gibberelline sono molto **sensibili al CALORE**: inducono **l'allungamento degli internodi** e **inibiscono la formazione delle RADICI**

CITOCHININE

- agli albori delle colture *in vitro* di cellule vegetali, per stimolare la divisione cellulare e la crescita della coltura veniva usato il latte di cocco, ingrediente dunque indispensabile dei terreni di coltura

- 1955, un composto di sintesi, la *kinetina*, sostituì il latte di cocco poiché in grado di stimolare la divisione cellulare.

- 1964, isolato per la prima volta dal mais (*Zea mays*) un composto ad azione citochininica, la *zeatina* (anche nel latte di cocco)



- sito di sintesi: probabilmente gli apici radicali.

- Stimolano la divisione cellulare;
- Inducono la formazione di germogli
- Inibiscono la formazione delle radici;
- Ritardano l'invecchiamento dei tessuti.

ACIDO ABSCISSICO

- è considerato il diretto antagonista degli ormoni detti della crescita (auxine, gibberelline, citochinine)

- isolato nel 1960; non chiari i siti di produzione, ma si accumula nelle foglie e nei frutti poco prima del distacco, nelle gemme e nei semi quiescenti.

È l'unico ormone gassoso a °T ambiente e a struttura chimica semplice

ETILENE



Provoca la maturazione dei frutti, lo sviluppo dei germogli, la caduta delle foglie in autunno e la morte di parti della pianta

Altri fattori che possono influenzare le colture verso la produttività di metaboliti secondari o verso la biotrasformazione

I fattori "LUCE" che influenzano la crescita e la produttività delle colture *in vitro* sono gli stessi che influenzano in senso analogo le piante in natura

- intensità (=quantità di luce)
- qualità (λ)
- fotoperiodo (luce/buio)

ELICITAZIONE

Elicitori biotici: omogenati e liofilizzati di funghi, batteri fitopatogeni autoclavati; filtrati e liofilizzati di terreni di coltura; particolari oligosaccaridi;

Elicitori abiotici: °T (caldo/freddo); salinità; luce (UV); sali di metalli pesanti;

Esempi:

- *Botrytis* spp. in colture di *Papaver somniferum* = sanguinarina 26 volte maggiore
- *Rhizopus arrhizus* in colture di *Dioscorea deltoidea* = diosgenina 2 volte superiori

AERAZIONE (O₂/CO₂)

Elementi importanti:

- a) dimensioni e forma del fermentatore
- b) modalità di aerazione (insufflazione, agitazione meccanica, ecc.)
- c) concentrazione di CO₂ non superiore al 5%

TEMPERATURA

Indicazioni sperimentali evidenziano che la temperatura ottimale di coltura oscilla tra 25-30°C. Sono comunque note eccezioni.

Alcuni esempi:

Rosa spp. 31-32 °C

Nicotiana spp. 32 °C

pH

In generale l'optimum è compreso tra 5 e 6 (correzione prima dell'autoclavaggio)

Nicotiana glutinosa, *N. tabacum* - pH iniziale 5.0, 5.5, 6.8, 7.5. Dopo 3 gg di coltura il pH era per tutte le linee compreso tra 5.0 e 5.3.

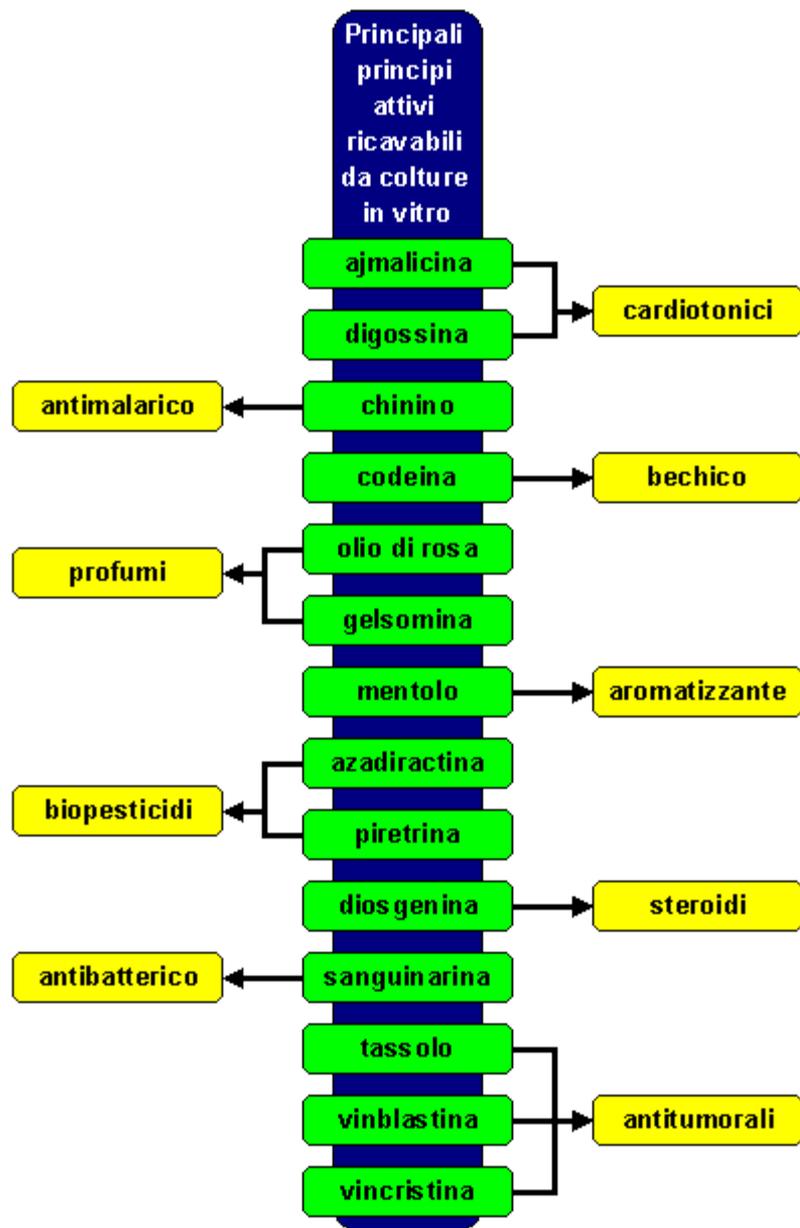
Importante: il pH influenza in modo consistente l'assimilazione ed il metabolismo di ammonio e nitrati (biosintesi di composti azotati: alcaloidi)

Influenza del dosaggio ormonale e della composizione del terreno sulla produttività di metaboliti secondari delle colture

Product	Plant species	Alteration of medium composition	Fold increase	Reference
Ajmalicine	<i>Catharanthus roseus</i>	Deletion of 2,4-D	5	Knobloch and Berlin (1980)
Cinnamoyl putrescines	<i>Nicotiana tabacum</i>	Reduction of phosphate	3	Schiel et al. (1984a)
Benzophenanthridines	<i>Eschscholtzia californica</i>	Increase of sucrose from 2–8%	10	Berlin et al. (1983)
β -Carboline alkaloids	<i>Peganum harmala</i>	Addition of CaSO ₄ to a medium devoid of it	8	Sasse et al. (1982)
Betacyanins	<i>Chenopodium rubrum</i>	Feeding of precursor tyrosine	2	Berlin et al. (1986)

Classi di metaboliti secondari di interesse farmaceutico prodotti da colture *in vitro* di cellule vegetali

Compound or class	Botanical sources	Therapeutic category/use
A. Steroids		
Hormones (derived from diosgenin, hecogenin, and stigmasterol)	<i>Dioscorea</i> spp. (Mexican yams), soybean-derived stigmasterol	Oral contraceptives and other steroid hormones
<i>Digitalls</i> glycosides (digoxin, digitoxin)	<i>Digitalis purpurea</i> , <i>D. lanata</i> (foxglove)	Cardiotonics
B. Alkaloids		
Belladonna alkaloids (atropine, <i>l</i> -hyoscyamine, scopolamine)	<i>Atropa belladonna</i> , <i>Datura stramonium</i> , and others	Anticholinergics
Opium alkaloids (codeine, morphine)	<i>Papaver somniferum</i> (opium poppy)	Analgesics
Reserpine	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihypertensive, psychotropic
<i>Catharanthus</i> alkaloids (vincristine, vinblastine)	<i>Catharanthus roseus</i> (Madagascar periwinkle)	Anticancer
Physostigmine	<i>Physostigma venenosum</i> (Calabar bean)	Cholinergic
Pilocarpine	<i>Pilocarpus</i> spp. (jaborandi)	Cholinergic
<i>Cinchona</i> alkaloids (quinine, quinidine)	<i>Cinchona</i> spp.	Antimalarial, cardiac antiarrhythmic
Colchicine	<i>Colchicum autumnale</i> (autumn crocus)	Antigout
Cocaine	<i>Erythroxylon coca</i> (coca leaves)	Local anesthetic
<i>d</i> -Tubocurarine	<i>Strychnos</i> spp., <i>Chondodendron tomentosum</i> (curare)	Skeletal muscle relaxant

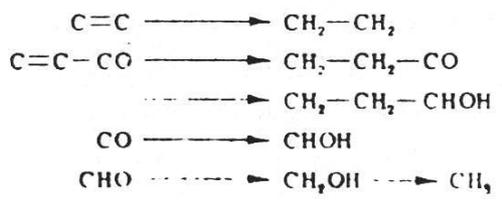


BIOTRASFORMAZIONI

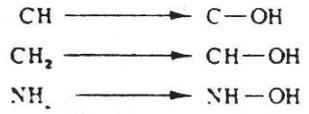
Conversione chimica di una sostanza chiamata *substrato*, non utilizzata come normale fonte di crescita dal microrganismo, in un'altra chiamata *prodotto*, per opera di **catalizzatori di origine biologica**, denominati appunto "biocatalizzatori"

Testate sostanze d'interesse farmaceutico, la cui sintesi chimica è costosa, non ecocompatibile, non selettiva verso gli enantiomeri

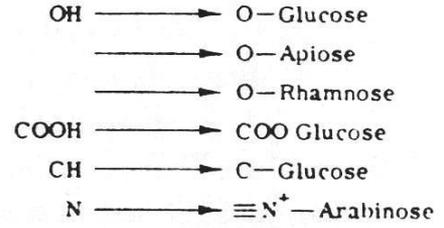
1. Reduction



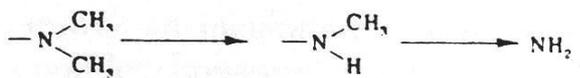
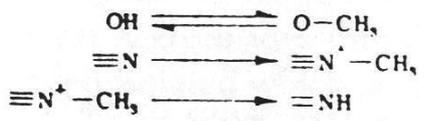
3. Hydroxylation



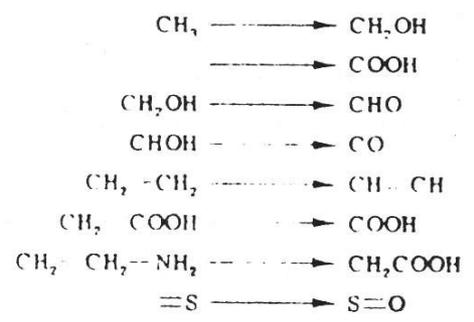
5. Glycosylation



7. Methylation and demethylation



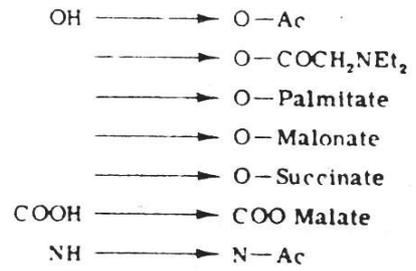
2. Oxidation



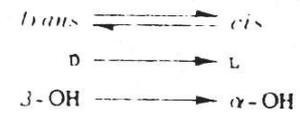
4. Epoxidation



6. Esterification



8. Isomerization



Biotrasformazioni nei nostri laboratori

FUNGHI ENDOFITI

di PIANTE AMAZZONICHE

(biodiversità)

Microrganismo che svolge l'intero ciclo biologico, o parte di esso, **negli spazi inter ed intracellulari dei tessuti sani** della pianta ospite, senza dar origine a processi di tipo patologico.

Simbiosi mutualistica a livello metabolico pianta-endofita: endofiti possono sintetizzare composti tipici della pianta ospite. Per questo se ne studiano le potenzialità biotrasformative

FUNGHI EPIFITI

di PIANTE AMAZZONICHE

(biodiversità)

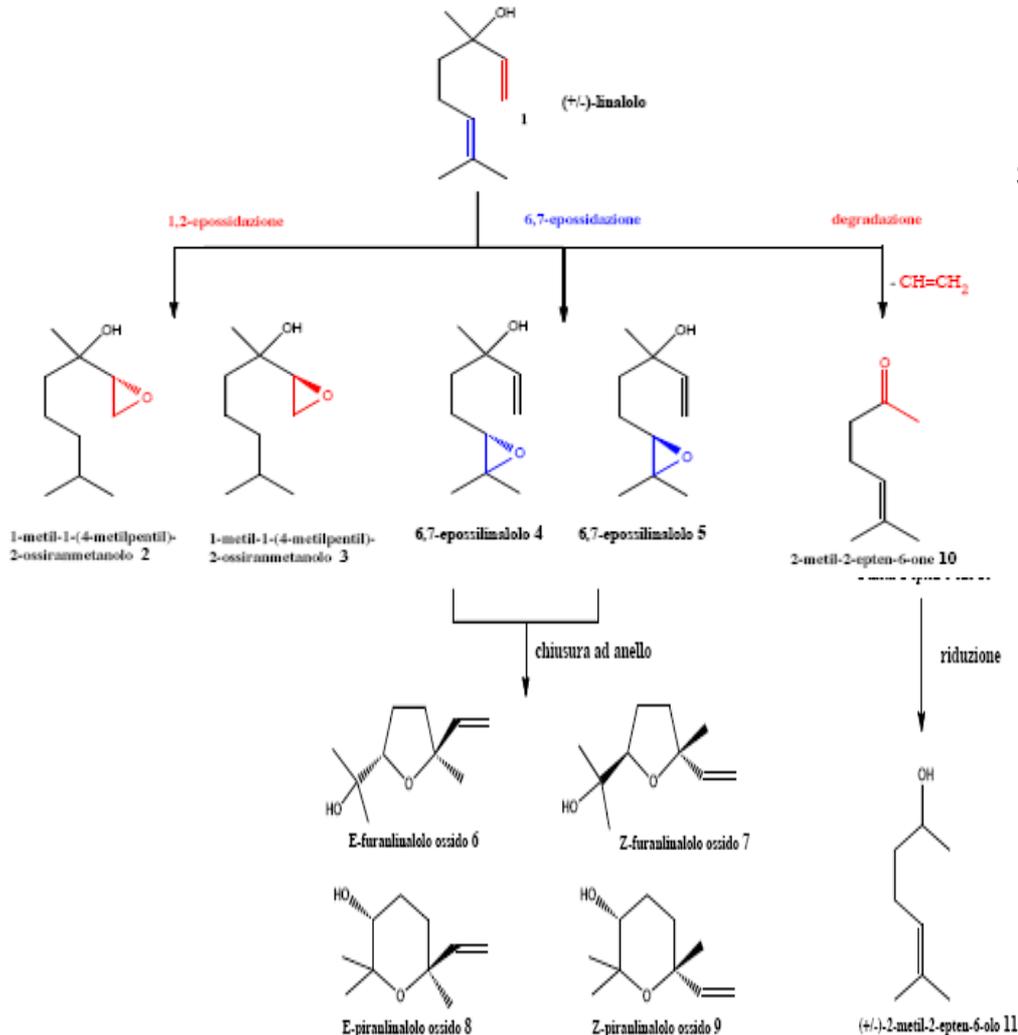
Un fungo epifita è un fungo che cresce sui tessuti esterni della pianta.

I funghi epifiti, quali gli *uredo* e gli *orcidium* conosciuti come *ruggine* in agricoltura, coprono interamente alcune piante erbacee, oppure prescelgono una parte specifica della pianta su cui svilupparsi: superficie inferiore delle **foglie** (funghi ipofiti), e altre su quella superiore (funghi epifiti); alcuni crescono soltanto sui **calici**, altri preferiscono la **scorza** dei frutti o le **radici**.

Funghi parassiti per lo più, ma in grado di metabolizzare prodotti della pianta.

Biotrasformazioni nei nostri laboratori

Alcuni risultati su funghi epifiti degli agrumi dell'Ecuador



il limonene ha subito Elicitazione nella biotrasformazione su oli essenziali

Biotrasformazioni di oli essenziali
Nuove attività terapeutico-salutistiche

Schema 2