



Università di Pisa

# Centro Interdipartimentale di Farmacologia Marina



MarinePHARMA

## 1° Workshop *Un mare di opportunità*

PISA, 15 luglio 2021



Raccolta degli abstract del 1° Workshop del **Centro Interdipartimentale di Farmacologia Marina dell'Università di Pisa (MarinePHARMA)** - Pisa, 15 luglio 2021.

**Comitato organizzatore**

Simone Brogi

Graziano Di Giuseppe

Debora Fontanini

Alma Martelli

Paola Nieri

Laura Pistelli

Lara Testai

Link Youtube alla videoregistrazione del Workshop:

[https://www.youtube.com/channel/UC8-DwHoHtIJgb\\_iQyB\\_fiqQ](https://www.youtube.com/channel/UC8-DwHoHtIJgb_iQyB_fiqQ)

Pubblicazione “1° Workshop del Centro Interdipartimentale di Farmacologia Marina (MarinePHARMA): Un Mare di Opportunità”, a cura del Centro *MarinePHARMA*.

ISBN 978-88-944430-3-5

# SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE</b>	3
● Farmaci dal mare, Paola Nieri (Direttore <i>MarinePHARMA</i> )	4
<b>PRIMA PARTE</b>	4
● Ruolo della Ficocianina C nella neurodegenerazione (Lidia Ciccone, Dip. Farmacia, UniPi)	5
● Effetto virucida di molecole prodotte da ciliati acquatici (Ileana Federigi, Dip. Biologia, UniPi)	6
● Proprietà farmacologiche e potenziale applicazione nutraceutica dell'olio di Krill (Valentina Citi, Dip. Farmaci, UniPi)	7
● Potenziale in ambito biomedico di polisaccaridi estratti da meduse (Anna Piras, Dip. Farmacia, UniPi)	8
● Estrazione di composti ad alto valore aggiunto da <i>Chlorella zofingensis</i> : <i>scale up</i> dal laboratorio alla produzione a livello impiantistico (Gianni Lutz, TereGroup)	9
<b>SECONDA PARTE</b>	10
● Antiossidanti da <i>Posidonia oceanica</i> (L.) Delile (Debora Fontanini, Dip. Biologia, UniPi)	10
● Attività anti-melanoma in molecole di origine marina (Beatrice Polini, Dip. Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare o dell'Area Critica, UniPi)	11
● Le diverse applicazioni del polisaccaride ulvano, estratto dalle alghe <i>Ulva</i> sp. (Laura Pistelli, Dip. Scienze Agrarie, Alimentari e Agroambientali, UniPi)	12
● La risposta a farmaci ed erbicidi quali inquinanti ambientali da parte di microalghe del lago di Massaciuccoli (Adriana Ciurli, Dip. Scienze Agrarie, Alimentari e Agroambientali, UniPi)	13
● Produzione di biomassa, clorofilla e carotenoidi da <i>Chlorella protothecoides</i> utilizzando la scotta come mezzo di crescita (Andrea Andreucci, Dip. Biologia, UniPi)	14

# INTRODUZIONE

## Farmaci dal mare

**Paola Nieri**

Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa

**Direttore del Centro MarinePHARMA**

L'ambiente terrestre del nostro pianeta è da sempre una fonte importante di molecole utilizzate in campo farmaceutico. Fra i farmaci antitumorali e antimicrobici, addirittura più del 50% è stimato sia, infatti, ottenuto, come tale o come derivato, da piante o da microrganismi viventi sulla terraferma. Meno sfruttato, finora, è stato, invece, l'ecosistema marino.

Negli ultimi due decenni, nuove tecnologie in grado di favorire le ricerche in questo ambiente, insieme a spinte economico-politiche (*Blue economy, Blue Growth*), hanno, tuttavia, permesso di avere un significativo aumento della ricerca di composti bioattivi in organismi acquatici: dai microrganismi agli organismi superiori, sia vegetali che animali. Più di 30000 composti sono stati, ad oggi, identificati e, negli ultimi anni, più di mille molecole all'anno sono state scoperte. Questi dati non stupiscono, dato che il mare e gli ambienti acquatici, nel loro insieme, occupano più del 70% della superficie del pianeta e sono popolati da una biodiversità straordinaria, che esprime una ricchissima chemodiversità. Questo patrimonio chimico è già diventato, e ancora di più lo sarà nel futuro, la fonte di nuovi farmaci che arriveranno sul mercato.

La prima scoperta di composti marini, che hanno avuto successo in terapia, si fa risalire allo studio di Bergmann e Feeney (1951), riguardante l'estrazione di spongosine (*spongouridina e spongotimidina*) dalla spugna caraibica *Tethya cripta*, e alla scoperta dell'italiano Brotzu nel 1945 relativamente alle proprietà del fungo marino *Acremonium chrysogenum* (Bo, 2000), nonché al lavoro di Newton e Abraham (1956), che ne hanno successivamente identificato il principio attivo, ovvero la *cefalosporina C*. Dalle spongosine sono derivati analoghi nucleosidici per uso antitumorale (*citarabina, fludarabina e nelarabina*) e antivirale (*vidarabina*), mentre dalla *cefalosporina C* sono derivate le cefalosporine, importanti antibatterici della classe dei beta-lattamici. Altri 11 farmaci derivati da organismi marini sono già stati approvati da EMA e/o FDA, di cui 7 (*trabectedina, lurbinectedina, eribulina, brentuximab-vedotin, polatuzumab-vedotin, enfortumab-vedotin, belantamab-mafodotin*) per il trattamento di malattie oncologiche, uno per il dolore cronico (*ziconotide*) e gli altri per l'ipertrigliceridemia grave (*esteri etilici di acidi grassi polinsaturi omega3 e acidi omega3 liberi*).

Il panorama dei farmaci di origine marina è arricchito, inoltre, da più di 30 molecole attualmente in sperimentazione clinica (Mayer and coll., 2021).

La ricerca di composti marini sta dando, dunque, un impulso importante alla Farmacologia marina, una disciplina moderna che fonde la farmacologia dei composti naturali con le biotecnologie marine o biotecnologie blu.

### Referenze:

Newton, G.G.F and Abraham, E.P. m. (1956). *Biochem. J.*, 62, 658.

Bergmann, W. and Feeney, R. (1951). *J. Org. Chem.*, 16, 981.

Bo, G. (2000). *Clin. Microbiol. Infect. Suppl.*, 3, 6.

Mayer AMS and coll. 2021: <https://www.midwestern.edu/departments/marinepharmacology.xml>

## PRIMA PARTE

### Ruolo della Ficocianina C nella neurodegenerazione

*Lidia Ciccone*

Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una irreversibile perdita della funzione neuronale nel cervello e nel midollo spinale che si traduce in una progressiva difficoltà dei movimenti e/o un deterioramento delle funzioni mentali.

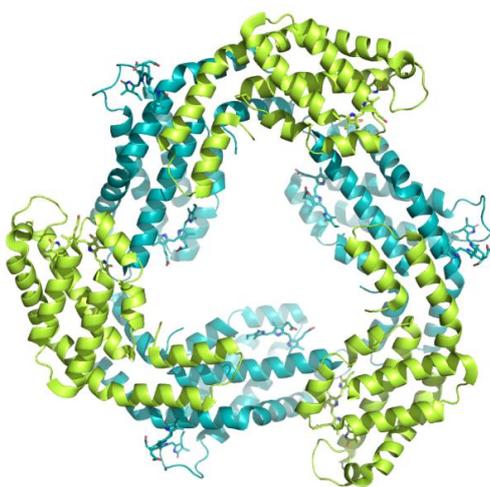
Nel 2019 è stato stimato che circa 50 milioni di persone, nel mondo, sono affette da demenza, e questo numero è destinato ad aumentare fino a 152 milioni di casi nel 2050.

L'Alzheimer (AD) è la patologia più comune che riguarda il disordine neurologico, seguita poi dalla sclerosi laterale amiotrofica (SLA), dalla malattia di Huntington (HD), di Parkinson e dall'ataxia spinocerebellare. Nonostante le numerose ricerche siano state condotte su queste patologie, le terapie farmacologiche approvate gestiscono principalmente i sintomi ma non prevengono il progressivo deterioramento neuronale.

Una famiglia di proteine che negli ultimi anni è stata molto studiata nei processi di neurodegenerazione e neuroinfiammazione è quella nelle metalloproteasi (MMPs). Le MMP sono endopeptidasi capaci di modificare un ampio spettro di proteine con funzioni chiave sia a livello extracellulare che pericellulare.

Conoscere meglio le molecole che modulano le MMPs può ispirare nuovi approcci per combattere le malattie neurodegenerative. Vari sono i prodotti naturali che sono in studio pre-clinico o clinico nel trattamento di patologie neurodegenerative.

Oltre al mondo terrestre, il mondo marino rappresenta un'enorme fonte di potenziali composti bioattivi. Negli ultimi anni, molte sono le molecole di origine marina identificate quali efficaci modulatori delle MMPs. Qui evidenziamo il potenziale ruolo che la ficocianina C (figura 1), una proteina isolata e purificata da varie alghe, potrebbe avere nel trattamento dell'AD attraverso la modulazione della MMP-2 e 9.



*Rappresentazione grafica della ficocianina C PDB code 3O18.*

## Effetto virucida di molecole prodotte da ciliati acquatici

**Ileana Federigi**

Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

L'attuale scenario epidemiologico sottolinea l'importanza della circolazione ambientale dei patogeni virali umani. Soprattutto in situazioni di emergenza, la necessità di conoscenze sull'uso di composti virucidi di origine naturale è ancora maggiore, a causa dei noti effetti collaterali dei disinfettanti chimici. Il ruolo dei composti naturali sull'inattivazione virale è ben noto, in particolare per quanto riguarda le sostanze di origine vegetale, come i polifenoli. Tuttavia, anche microorganismi eucariotici che vivono in ambienti acquatici, come i protisti, possono rappresentare una importante fonte di nuovi metaboliti secondari bioattivi. Tra i protisti ciliati d'acqua dolce, la specie *Climacostomum virens* produce una tossina incolore utilizzata per difesa chimica contro i predatori, chiamata climacostolo (5-[(2Z)-non-2-en-1-il]benzene-1,3-diolo). Analisi di laboratorio hanno dimostrato una attività biologica di tale composto nei confronti di patogeni batterici e fungini, protozoi, linee cellulari umane ma anche animali (es. di topo) e mitocondri isolati. Tuttavia, ad oggi, una possibile attività nei confronti dei virus umani non è ancora stata studiata.

In considerazione dell'habitat acquatico di *C. virens*, in questo studio è stata valutata l'attività di climacostolo su adenovirus umano (HAdV), in qualità di surrogato dei virus a trasmissione idrica. Gli HAdV sono suddivisi in sette gruppi (da A a G) che infettano l'uomo, causando un'ampia gamma di sintomi clinici, quali sindromi del tratto respiratorio superiore (faringite, rinite e anche polmonite), gastroenterite, cheratocongiuntivite e malattie urinarie. Gli HAdV sono anche responsabili di un gran numero di infezioni asintomatiche, che ne giustificano l'ampia distribuzione su scala globale.

Gli esperimenti sono stati condotti *in vitro* utilizzando HAdV sierotipo 5 di cui è stata valutata l'infettività sulla linea cellulare Henrietta Lacks (HeLa) cell line (ATCC CCL-2). Preliminarmente ai saggi di contatto tra climacostolo e HAdV-5, sono state eseguite prove di citotossicità per stabilire la "concentrazione di lavoro" del climacostolo, ovvero la concentrazione che non interferisce con la crescita delle cellule HeLa, che è risultata pari a 0.0002 mg/mL. I saggi di esposizione di HAdV al climacostolo sono stati condotti a temperatura ambiente (23–25 °C) e con un tempo di contatto di 30 minuti. Sono state saggiate sospensioni di HAdV-5 con diverso titolo virale in base ai valori comunemente misurati negli ambienti idrici, pari ad  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml (50% tissue culture infective dose per milliliter). I risultati mostrano che HAdV-5 è sensibile alla concentrazione di lavoro del climacostolo utilizzata nei saggi, con una riduzione di circa 3 Log<sub>10</sub> (99.9%) nel caso delle sospensioni virali con titolo  $10^4$  e  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Sebbene questi risultati siano preliminari, rappresentano un punto di partenza per ulteriori ricerche volte a migliorare la caratterizzazione dell'attività del climacostolo in diverse condizioni sperimentali (es. temperatura, pH e tempo di contatto) e nei confronti di diversi virus, compresi quelli dotati di envelope (es. coronavirus). Inoltre, la produzione di climacostolo da parte di un protista che vive in acqua dolce suggerisce una possibile applicazione nel trattamento delle acque reflue. Negli impianti di depurazione, infatti, il fango attivo è composto da una miscela di protozoi che rimuovono le sostanze organiche e i nutrienti disciolti (amebe e flagellati) o si cibano di batteri (ciliati). In questo contesto, l'utilizzo di un protista ciliato in grado di liberare anche sostanze virucide contribuirebbe a migliorare la sicurezza igienico-sanitaria dell'effluente depurato.

## Proprietà farmacologiche e potenziale applicazione nutraceutica dell'olio di Krill

**Valentina Citi**

Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa

*Euphausia superba*, comunemente conosciuto come krill, è un piccolo crostaceo dell'oceano Atlantico di cruciale importanza per l'ecosistema marino e rappresenta una delle principali fonti di acidi grassi poli-insaturi omega 3 (acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesanoico (DHA)). EPA e DHA presenti nell'olio di krill hanno mostrato diverse proprietà farmacologiche utili nella gestione di numerose disfunzioni croniche, comprese le malattie cardiovascolari, neurologiche e infiammatorie, la prevenzione del cancro e la salute del microbiota intestinale. A questo proposito, l'integrazione con acidi grassi polinsaturi del krill può rappresentare una strategia nutraceutica da sfruttare in combinazione con le terapie convenzionali. I numerosi effetti farmacologici sono dovuti, oltre alla presenza degli omega-3, anche ad altri componenti minori come flavonoidi e astaxantina. Quest'ultima è un potente antiossidante capace di attivare Nrf2 e di promuovere effetti citoprotettivi. Vista la complessa composizione dell'olio di krill in termini di molecole farmacologicamente attive, numerose metodiche precliniche possono essere sfruttate per investigare i potenziali effetti benefici.

## Potenziale in ambito biomedico di polisaccaridi estratti da meduse

***Anna Maria Piras, Brunella Grassiri, Chiara Migone e Ylenia Zambito***

Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa

Le meduse sono considerate una nuova potenziale risorsa per l'industria alimentare, farmaceutica e biomedica. Gli effetti salutistici delle sostanze bioattive contenute nelle meduse le rendono una risorsa nutraceutica ben conosciuta nei paesi del Sud-Est Asiatico, adottata nella cucina e nella medicina tradizionale cinese contro l'ipertensione, l'artrite e le ulcere. A livello alimentare sono considerate un'alternativa sostenibile e sono state inserite dall'Unione Europea nella lista dei *novel food* a partire dal 2017. Nel Mar Mediterraneo le specie di Cnidari più abbondanti e comunemente registrate sono principalmente tre: *Aurelia sp.1*, *Cotylorhiza tuberculata* e *Rhizostoma pulmo*. La principale componente macromolecolare della massa corporea delle meduse è il collagene, seguito da polisaccaridi e lipidi. I polisaccaridi di origine naturale trovano ampia applicazione in ambito tecnologico farmaceutico e recentemente sono stati descritti come componenti funzionali con proprietà immunomodulatorie, antiossidanti, antimicrobiche e antitumorali.

Nel presente lavoro è stata messa a punto l'estrazione di polisaccaridi simil-glucosamminoglicani da specie *Rhizostoma pulmo*, pescate nel mar Tirreno. L'estratto crudo è stato caratterizzato ed ulteriormente distinto in due frazioni ad elevato peso molecolare e con diversa carica netta. I prodotti ottenuti sono stati caratterizzati con tecniche chimico-fisiche per la determinazione del peso molecolare, contenuto residuo di proteine, contenuto in gruppi solfato. La determinazione della composizione saccaridica è attualmente in corso. Il loro impiego come promotori della rimarginazione di ferite (*wound healing*) è stato valutato mediante *scratch test in vitro* su linee cellulari di fibroblasti murini (Balb/3T3 clone A31) e su cheratinociti umani (HaCaT). Entrambe le frazioni hanno effetto stimolante della migrazione e proliferazione delle due linee cellulari, aprendo a nuove possibilità di impiego in prodotti coadiuvanti della guarigione di ferite.

Progetto finanziato da DN360 s.r.l.

## Estrazione di composti ad alto valore aggiunto da *Chlorella zofingensis*: scale up dal laboratorio alla produzione a livello impiantistico

**Giovanni Antonio Lutz**

Tere Group Lab Manager, Modena, Italia

Le microalghe possono essere assimilate a bio-fabbriche per la produzione di composti ad alto valore aggiunto utilizzabili in ambito alimentare, farmaceutico, cosmetico, e per le industrie energetiche, possono essere potenzialmente sfruttate come risorse rinnovabili e rispettose dell'ambiente per la produzione di biocarburanti liquidi. Nutrienti e approvvigionamento idrico per la coltivazione di microalghe rappresentano i principali fattori di costo per il pieno sfruttamento della coltivazione di massa delle microalghe. L'abbattimento dei costi può essere ottenuto con il ricorso ad acque reflue (industria alimentare, agricoltura, allevamento) quali terreni di coltura.

*Chlorella zofingensis* è emersa come un potenziale accumulatore di lipidi per la produzione di biodiesel in condizioni di stress adeguato. La stessa alga accumula anche grandi quantità del carotenoide astaxantina, di cui sono note le proprietà antiossidanti e di rafforzamento del sistema immunitario. Questo ceppo algale può trasformare il suo metabolismo autotrofo in uno eterotrofico/mixotrofico con un'influenza diretta sul contenuto lipidico, sulla composizione degli acidi grassi (FAME) e sulla produzione di astaxantina stessa. Tra le ultime frontiere della biochimica c'è l'aggiunta al terreno di coltura di piccole sostanze chimiche come modulatori genici, quali etanolamina (ETA) e trietilammina (TEA) che agiscono come attivatori o inibitori del metabolismo, per promuovere l'accumulo di lipidi. In questo studio viene valutato per la prima volta l'effetto di diversi reflui organici dell'industria alimentare, come siero del latte (DWW) e melassa di canna da zucchero (MOL), nonché di sostanze chimiche tali da indurre uno stress metabolico sul metabolismo lipidico di *C. zofingensis* e sul suo profilo FAME. Il profilo FAME ottenuto è stato caratterizzato quantitativamente e qualitativamente al fine di produrre un biodiesel in accordo con le direttive europee standard per ottenere un carburante di buona qualità.

L'attività sperimentale ha potuto dimostrare come la crescita cellulare risultava favorita quando venivano impiegati come mezzi di coltura DWW e MOL, in particolare MOL3. Inoltre l'impiego di MOL e DWW favoriva l'aumento delle concentrazioni lipidiche ( $\text{g L}^{-1}$ ) rispetto al mezzo di controllo BBM, anche quando la quantità di biomassa prodotta era simile o inferiore al BBM. Lo stress chimico indotto dall'aggiunta nel mezzo di coltura di ETA e TEA non ha prodotto un effetto significativo sull'accumulo di biomassa e del contenuto lipidico. Al contrario biomassa e lipidi aumentavano in seguito all'aggiunta di  $30 \text{ g L}^{-1}$  di sale. La condizione di mixotrofia ha ridotto il grado di saturazione degli acidi grassi aumentando il livello di insaturazione, cosa che rende la qualità generale dei FAME coerente con i range prescritti dagli standard americani ed europei per il biodiesel. La biomassa microalgale finale, considerando il suo alto contenuto di lipidi e la sua conformità agli standard per la qualità del biodiesel, rende il mezzo di coltura MOL come una valida opzione praticabile per la coltivazione di ceppi microalgali. Lo stesso principio adottato per la produzione dei lipidi è attualmente sotto investigazione nei nostri laboratori per la produzione di astaxantina.

## SECONDA PARTE

### Antiossidanti da *Posidonia oceanica* (L.) Delile

**Debora Fontanini, Antonella Capocchi, Fabio Bulleri e Chiara Ravaglioli**

Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

*Posidonia oceanica* (L.) Delile è una monocotiledone appartenente alla famiglia monogenerica delle Posidoniaceae. È endemica del mare Mediterraneo, dove forma grandi praterie subacquee che rappresentano una parte essenziale dell'habitat di un gran numero di specie marine costiere.

Oltre alla sua importanza ecologica, questa pianta è stata impiegata tradizionalmente in decotti come rimedio per diabete e ipertensione; alcuni studi hanno mostrato i suoi effetti antidiabetici e vasoprotettivi, le possibili applicazioni alla cura della pelle e la sua possibile efficacia come farmaco antitumorale. Le molecole principalmente coinvolte in questi effetti sono composti fenolici e consistono di una miscela di acidi fenolici, flavonoidi e tannini condensati (proantocianidine). Alcuni di questi composti sono già stati identificati mediante GS, UPLC e MS ad alta risoluzione.

È stato dimostrato che *P. oceanica* risponde agli stress abiotici e biotici modificando la quantità di composti fenolici presenti nelle sue foglie; in effetti queste molecole hanno il ruolo biologico di proteggere i tessuti vegetali dallo stress ossidativo indotto da alterazioni dell'ambiente provocato da stressogeni biologici (predatori, competitori) e fisici (nutrienti, luce, pH). La capacità antiossidante degli estratti di *P. oceanica* è stato oggetto di un numero limitato di studi che hanno investigato solo parzialmente tutto il potenziale antiossidante, sia a causa del numero e del tipo dei metodi di misurazione adottati, sia alla limitata attenzione alla completezza dell'estrazione dei composti.

Nel nostro studio, fronde di *P. oceanica* raccolte all'isola di Capraia (Livorno) a differenti profondità, erano studiate per i loro composti antiossidanti, tra cui i pigmenti Chl a, Chl b e carotenoidi. Tutti i metodi impiegati erano spettrofotometrici. Mentre pigmenti, fenoli e flavonoidi erano estratti e misurati con metodi classici (metodi colorimetrici Folin-Ciocalteu e cloruro di alluminio, rispettivamente per gli ultimi due), per misurare la capacità antiossidante totale era impiegato un metodo piuttosto recente che sta essendo utilizzato sempre più frequentemente per campioni di natura vegetale. Il cosiddetto metodo QUENCHER (QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible) è indipendente dall'estrazione e, evitando la fonte di variabilità dei risultati dovuta a diverse condizioni di estrazione, permette un facile confronto di dati tra laboratori. Inoltre, misura agilmente i cosiddetti fenoli legati, evitando l'impiego di solventi forti per l'estrazione, estrazioni complesse e lunghe procedure. Infatti, il metodo permette di misurare la capacità antiossidante totale (TAC, total antioxidant capacity) di costituenti di miscele complesse direttamente nelle farine ottenute dai tessuti vegetali essiccati, solubilizzando i fenoli con il reagente TAC stesso. Sia la capacità di *scavenging* del radicale ABTS, che la *cupric reducing antioxidant capacity* (CUPRAC) di farine da fronde di *P. oceanica* erano misurate direttamente con il metodo QUENCHER; allo stesso modo, i tannini condensati erano quantificati con un metodo diretto usando il saggio *HCl-butanol-acetone-iron* (HBAI).

I dati raccolti, oltre a confermare i reports pregressi sul potenziale antiossidante di *P. oceanica*, offrono nuovi indizi sia sugli approcci metodologici da impiegare per la loro analisi, che sulle classi di molecole da valutare come potenti antiossidanti per un uso farmacologico di *Posidonia*.

## Attività anti-melanoma in molecole di origine marina

**Beatrice Polini**

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare o dell'Area Critica e Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa

Il melanoma cutaneo è la forma più grave e letale di tumore della pelle. Il trattamento di questo tipo di cancro presenta numerose difficoltà per la refrattarietà a molte delle terapie disponibili. In questo contesto si inserisce la farmacologia marina, poiché sempre più composti provenienti dal mare stanno venendo indagati per le loro potenziali attività anti-tumorali. In questo intervento, verranno presentati due studi che hanno approfondito la capacità di contrastare il melanoma cutaneo da parte di composti di origine marina.

Il primo studio ha valutato l'attività anti-tumorale dell'Euplotina C (EC), un metabolita secondario citotossico prodotto dal ciliato marino *Euplotes crassus*, di cui è stato approfondito il meccanismo d'azione. L'EC ha mostrato un potente effetto citotossico in tre diverse linee cellulari di melanoma (A375, 501Mel and MeWo) con un IC50 (concentrazione inibitoria del 50%) circa 30 volte maggiore rispetto a cellule non tumorali (fibroblasti dermici umani, HDFa). Il composto ha mostrato attività pro-apoptotica e una significativa diminuzione della migrazione delle cellule di melanoma. È stato, inoltre, osservato che l'EC è in grado di inibire le vie di segnale Erk e Akt, coinvolte nella regolazione di molti aspetti correlati all'aggressività del melanoma. Un antagonista del recettore della rianodina (RyR), il dantrolene, ha inibito in modo concentrazione-dipendente la citotossicità della EC, suggerendo, insieme a studi di modellistica molecolare, un ruolo di questo recettore come bersaglio diretto di EC.

Il secondo lavoro ha investigato l'attività anti-melanoma e il meccanismo di due molecole, il Pelorolo (PEL) e il 5-Epi-ilimaquinone (EPI), derivanti dalla spugna *Dactylospongia elegans*.

Entrambi i composti hanno indotto un'inibizione della crescita nella linea cellulare di melanoma metastatico 501 Mel, in maniera tempo e concentrazione dipendente, determinando un blocco della progressione del ciclo cellulare nella fase G1. Un significativo effetto pro-apoptotico, attraverso una riduzione dei livelli trascrizionali di molecole anti-apoptotiche (BCL2, BIRC5 e MCL1) e un aumento dell'espressione di molecole pro-apoptotiche (BAX), è stato osservato in seguito al trattamento con le molecole spongine. Concordemente, PEL e EPI hanno portato a una modulazione dell'espressione di alcuni microRNA, coinvolti nella regolazione dell'espressione di quei mRNA precedentemente osservati deregolati in seguito al trattamento. Inoltre, entrambi i composti hanno mostrato di influenzare i livelli di espressione di microRNA coinvolti nella regolazione di molecole appartenenti al *pathway* PI3K/Akt. Studi di docking molecolare hanno, inoltre, suggerito che PEL e EPI possano comportarsi come inibitori di PI3K agendo, in particolare, su una tasca dell'isoforma PI3K $\alpha$ .

Questi lavori sono un esempio dell'interessante potenziale dei composti di origine marina, i quali possono fornire nuovi promettenti scaffold per lo sviluppo di nuovi composti per il trattamento del melanoma e di altri tipi di cancro.

## Le diverse applicazioni del polisaccaride ulvano, estratto dalle alghe *Ulva* sp.

**Laura Pistelli**

Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa

Le Chlorophyta Ulvales sono alghe molto comuni distribuite in tutto il mondo. I due generi principali *Ulva* ed *Enteromorpha* sono particolarmente noti perché alcune specie sono coltivate o raccolte per il consumo alimentare e altre sono associate a proliferazioni in acque costiere eutrofizzate. Tra i polimeri sintetizzati da queste alghe, i polisaccaridi della parete cellulare rappresentano circa il 38-54% della sostanza algale secca. (Kidgell et al., 2016)

L'ulvano è il polisaccaride più diffuso, ed è per lo più distribuito in modo omogeneo in tutta la fronda essendo più predominante all'interno lo spazio intercellulare e nella parete fibrillare.

Gli ulvani sono una classe di polisaccaridi solfati altamente ramificati e solubili in acqua, contenenti xilosio, ramnosio e acido uronico. La composizione degli ulvani è estremamente variabile a seconda della specie considerata, ma anche a seconda delle cause ambientali come stagionalità e temperatura, nonché delle condizioni di trattamento post-raccolta (Kidgell et al., 2019)

L'ulvano, come parte della parete cellulare delle alghe verdi, possiederebbe funzioni osmotiche, compreso un ruolo sull'equilibrio ionico o sulla prevenzione dell'essiccamento delle alghe a causa della sua natura altamente igroscopica.

L'ulvano mostra una peculiare caratteristica poiché le sue unità ripetute (acido glucuronico e gruppi solfato) hanno affinità chimica con gliccoaminoglucani (e.g. ialuronani e condroitin solfato). A questo proposito, ulvano trova potenziali applicazioni nella scienza dei biomateriali (medicinali per ferite, ingegneria dei tessuti, prevenzione del biofilm ed eccipienti), nutraceutici (antivirali, antiossidanti, antiiperlipidemici, antitumorali e immunostimolanti (Amin 2020)). È stata anche studiata in vitro l'attività antibatterica dell'ulvano contro i microbi patogeni, 4 gram-positivi e 3 gram-negativi (Kidgell et al., 2019). In agricoltura è stato evidenziato come l'ulvano sia in grado di ridurre la gravità della malattia in diversi biosistemi ospite-patogeno stimolando attività enzimatiche specifiche (Jaulneau et al., 2010). Un nostro recente studio ha evidenziato l'azione di biostimolante dell'ulvano, inducendo la produzione di acido salicilico e aumento dei composti fenolici e controllo dell'aroma in piante officinali di basilico e prezzemoli (Paulert et al., 2021).

### Referenze:

Amin, H.H. (2020), Asian J. Fish. Aquat. Res., 6, 47-54. doi:10.9734/AJFAR/2020/v6i430105

Jaulneau, et al. (2010) J. Biomed. Biotechnol. doi:10.1155/2010/525291

Kidgell, JT., et al. (2019). Algal Res., 39. doi.org/10.1016/j.algal.2019.101422

Paulert, R., et al. (2021) Plants, 10, 1391. doi.org/10.3390/plants10071391

## La risposta a farmaci ed erbicidi quali inquinanti ambientali da parte di microalghe del lago di Massaciuccoli

**Adriana Ciurli**

Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa

Gli ecosistemi acquatici rappresentano gli ambienti che contano la maggior biodiversità di fitoplancton e contribuiscono alla maggior parte della produzione primaria sulla terra. Il Lago di Massaciuccoli situato in Toscana (Italia) con una superficie compresa tra le provincie di Pisa e Lucca è una delle più grandi aree umide nazionali; in antichità ricopriva interamente la pianura costiera della Versilia. Nonostante le sue numerose peculiarità, soprattutto l'eutroficità delle sue acque, i suoi consorzi microalgali autoctoni non sono mai stati identificati fino ad ora. Nel lavoro descritto vengono isolati quattro ceppi di microalghe autoctone provenienti da diversi siti del lago.

In questo lavoro sono stati isolati e descritti quattro ceppi di microalghe autoctone, prelevati da diverse aree del lago e denominati con le iniziali dell'area di raccolta (Foce Barra, FB; Idrovora, Idr, Centro Lago scuro e chiaro, CL\_Sc, e CL\_Ch rispettivamente); i quattro ceppi di microalghe sono stati identificati all'interno del clade *Chlorella sorokiniana*. I ceppi sono stati esposti a dieci contaminanti ambientali tra i più emergenti al fine di descriverne le risposte alle sostanze testate: cinque metalli (As, Fe, Ni, Cu e Zn), due erbicidi (Metolaclo e Sethoxydim), due antibiotici (Ciprofloxacina e Benzilpenicillina) e un farmaco antinfiammatorio non steroideo (Ibuprofene). Le risposte fisiologiche dei ceppi evidenziano differenze intraspecifiche; ceppo CL\_Sc è stato il più tollerante in presenza di metalli, mentre il ceppo Idr è risultato il più sensibile. Tutti i ceppi erano sensibili al Sethoxydim e tolleranti al Metolaclo, a tutte le concentrazioni testate. I ceppi FB e Idr erano i più sensibili in presenza di Ibuprofene mentre il ceppo CL\_Ch era il più sensibile alla più alta concentrazione di Benzilpenicillina. La resistenza evidenziata dal ceppo Idr in qualche modo riflette sia "l'isolamento filogenetico che geografico" da tutti gli altri tre ceppi. Infine, l'osservazione al microscopio ottico ha confermato alcune differenze anche nell'aspetto morfologico delle microalghe. Nel complesso, tutti i ceppi hanno mostrato risposte interessanti in presenza di elevate concentrazioni delle sostanze testate, rappresentando validi putativi candidati per la bonifica di acque lacustri eutrofiche nel trattamento delle acque stesse.

## Produzione di biomassa, clorofilla e carotenoidi da *Chlorella protothecoides* utilizzando la scotta come mezzo di crescita

**Andrea Andreucci**

Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

I sistemi a base di microalghe per la produzione di molecole di alto valore sono un'area emergente che rappresenta una grande promessa per le applicazioni industriali. La sfida principale, tuttavia, è lo sviluppo di strategie ad alta efficienza per la produzione su larga scala ed a costi contenuti. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'utilizzo del siero del latte (scotta) come substrato alternativo a basso costo per coltivare la microalga *Chlorella protothecoides*. Inoltre, è stato studiato il modo di migliorare il processo di carotenogenesi utilizzando stress salino e luminoso. Una significativa riduzione della concentrazione di lattosio è stata osservata durante la crescita nei terreni di coltura contenenti scotta, indicando che *C. protothecoides* è passata a una crescita mixotrofica, utilizzando la fonte di carbonio organico fornita. Le colture mixotrofiche presentavano una maggiore quantità di biomassa rispetto a quelle autotrofe, tuttavia, la quantità di clorofilla e carotenoidi è risultata maggiore in quest'ultima coltura. Nonostante ciò, la strategia di stress che è stato applicato ha potenziato la carotenogenesi, consentendo l'accumulo dei carotenoidi astaxantina e luteina/zeaxantina. I risultati hanno suggerito che la scotta ha un grande potenziale come terreno di coltura per la coltivazione di *C. protothecoides*. Inoltre, attraverso un'adeguata strategia di stress è possibile controllare la carotenogenesi, consentendo la produzione di elevate quantità di molecole ad alto valore.

