

Laboratorio di biotecnologie cellulari vegetali



Attività di ricerca

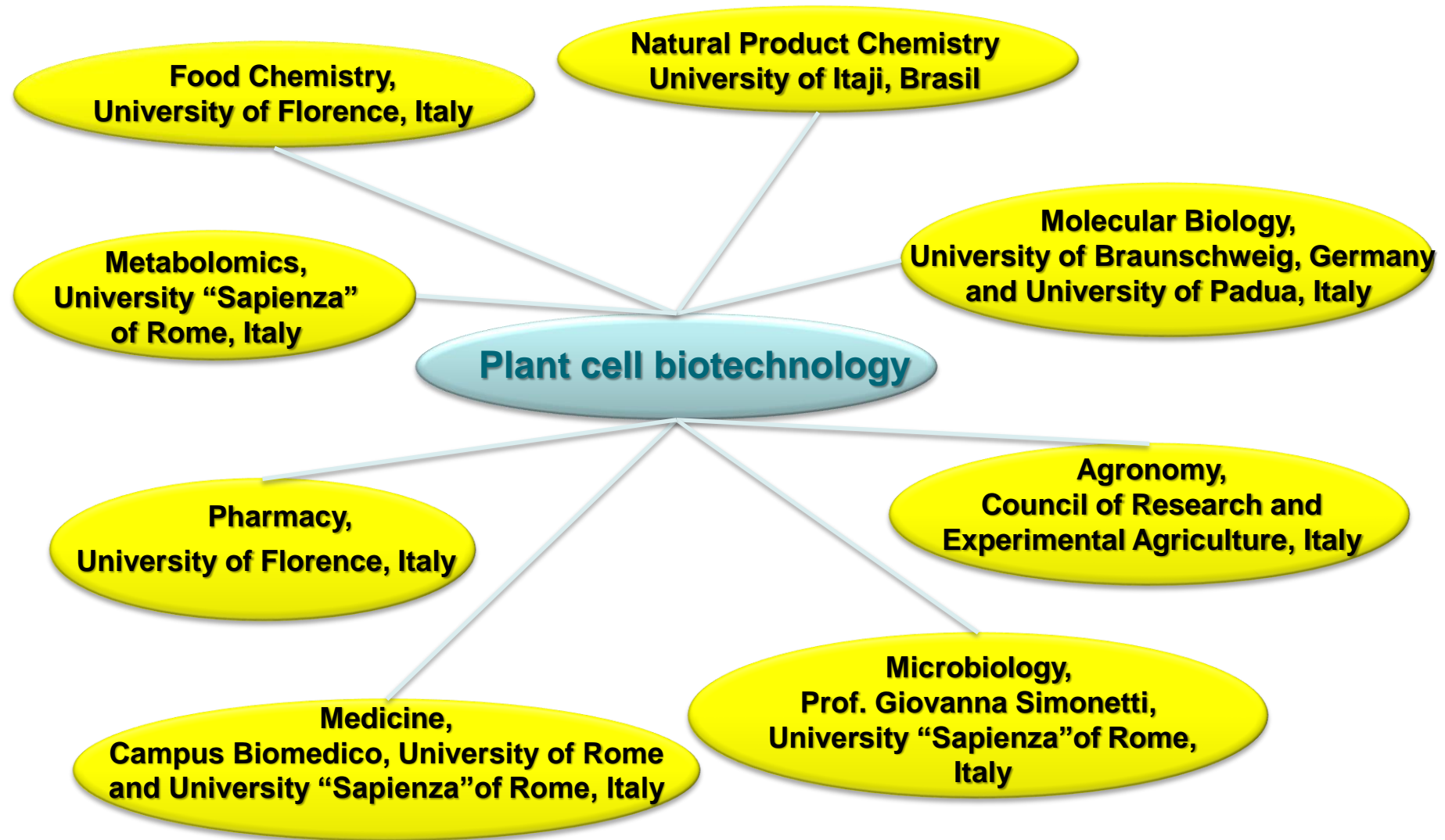


- Scoperta di prodotti naturali bioattivi nelle piante e loro caratterizzazione chimica
- Studio degli effetti dell'ambiente sulla biosintesi di metaboliti secondari



- Sviluppo di protocolli per colture cellulari propagazione clonale di piante e coltura di radici
- Ottimizzazione di processi per la produzione di composti bioattivi in sistemi in vitro.

Network di collaborazioni



Le piante e la cosmesi

olio di argan per la cura della pelle



Fette di cetriolo



Succo di limone per sbiancare



Estratto di petali di rosa per profumi



Diretta estrazione di molecole bioattive da piante spontanee o coltivate



Problematiche che influenzano la raccolta e standardizzazione degli estratti vegetali:

- Limitata distribuzione geografica di alcune specie
- Non coltivabilità di alcune specie fuori del loro habitat
- Difficoltà di standardizzare le pratiche colturali
- Alta variabilità della concentrazione dei composti negli estratti
- Sintesi dei prodotti limitata ad un particolare stadio di sviluppo della pianta o tessuto o organo specifici
- Contaminazione degli estratti vegetali con inquinanti come erbicidi o metalli pesanti e tossine.

Inoltre...

lo sfruttamento intensivo delle risorse naturali potrebbe rappresentare una minaccia per la conservazione delle specie a rischio di estinzione

Nuovo trend nella cosmetica: Cellule staminali vegetali



Dolichos biflorus: stimolatore di produzione di collagene

Psilanthus bengalensis: volumizzante

Nicotiana sylvestris: antirughe

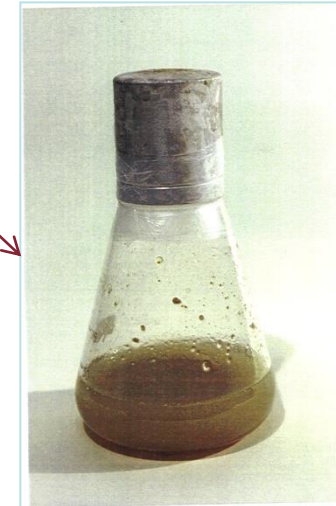
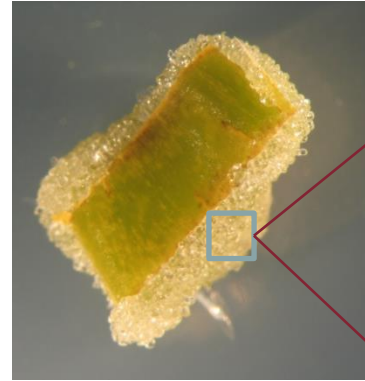
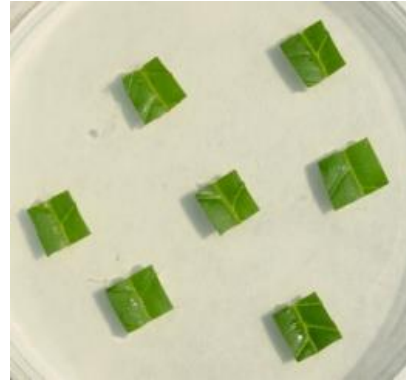
Nymphaea alba: antiinfiammatorio

Solanum lycopersicum: rassodante

Nicotiana sylvestris: antirughe

Malus domestica: antiossidante

Cosa sono le cellule staminali vegetali?



Le cellule staminali vegetali si ottengono in coltura e sono cellule dedifferenziate biosinteticamente totipotenti. Ogni cellula in coltura conserva tutta l'informazione genetica ed è in grado di produrre sostanze chimiche che sono prodotte dalla pianta madre

Perché le cellule staminali vegetali sono così interessanti per la cosmesi?

Le biotecnologie cellulari vegetali rappresentano uno strumento valido per lo sviluppo di nuovi prodotti cosmetici di origine vegetale con attività dermatologica



La produzione di estratti bioattivi ed ingredienti da colture di cellule vegetali è:

- **Costante nel tempo e indipendente da variazioni stagionali**
- **La composizione degli estratti è standardizzabile**
- **Gli estratti da colture cellulari sono liberi da contaminanti che possono essere presenti in material vegetale da piante cresciute in campo (tossine, pesticidi, metalli pesanti)**
- **E' migliorabile la concentrazione dei metaboliti desiderati attraverso trattamenti con elicitori fisici e chimici**

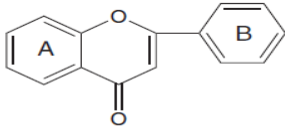
Inoltre...

Attraverso processi di biotrasformazione cellule vegetali producono nuove molecole a partire da precursori a basso costo

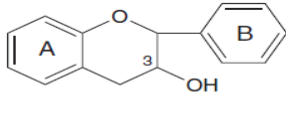
Quando le colture cellulari sono un sistema utile per la produzione di metaboliti secondari?

Quando i metaboliti secondari per essere prodotti non necessitano di speciali strutture secretorie o differenziamento di organi

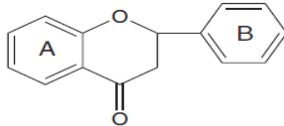
Composti fenolici: Più di 4.000 differenti composti fenolici sono conosciuti e molti hanno proprietà biologiche interessanti.



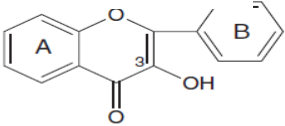
Flavoni



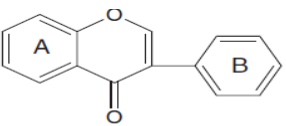
Flavanoli



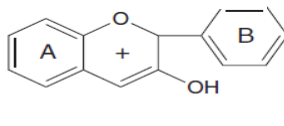
Flavanoni



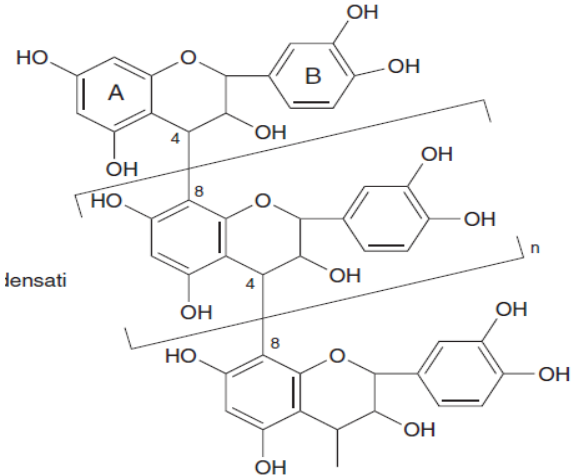
Flavonoli



Isoflavoni



Antocianine

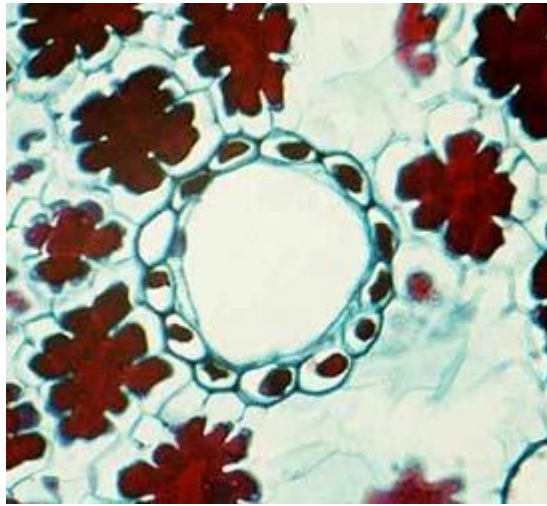


Procianidine

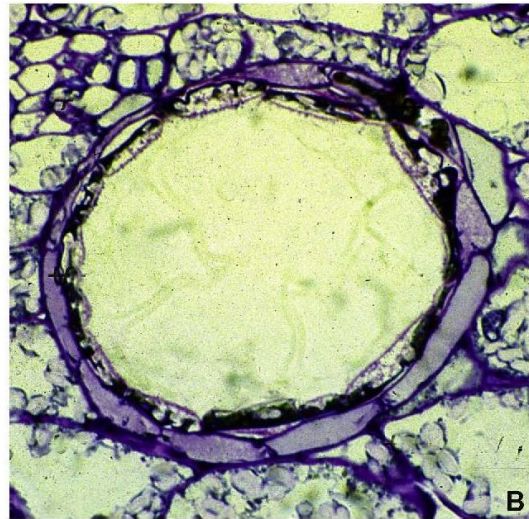
Flavonoidi ed antociani sono responsabili del colore di fiori e frutti

Flavoni e flavonoidi proteggono le cellule dalle radiazioni UV

stilbeni e procianidine sono ROS scavengers



Canali resiniferi Pinus pinea



Tasca secretoria in arancio

In questi casi è necessario utilizzare colture di organi o indurre rigenerazione di organi da colture cellulari



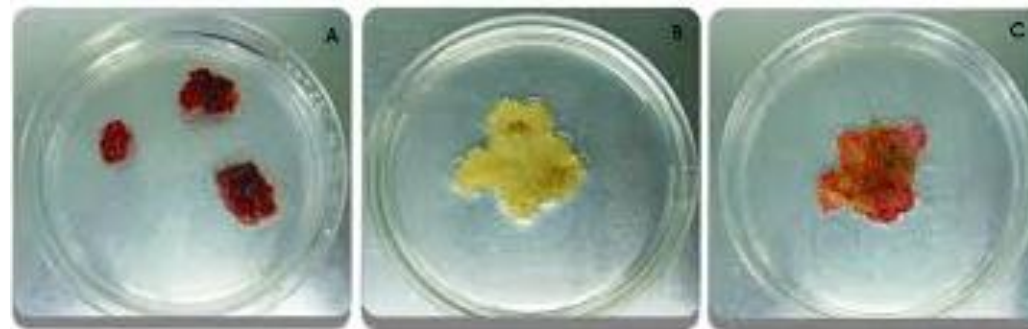
Quali strategie possono essere adottate per stimolare la produzione di metaboliti e per recuperarli dai sistemi colturali?

- Ottimizzazione della composizione del mezzo colturale
- Elicitazione
- Biotrasformazione/uso di Precursori

Variazioni della composizione del mezzo colturale possono stimolare la produzione di alcuni metaboliti



Le condizioni di illuminazione possono stimolare alcune vie biosintetiche



Elicitazione

Risposta di difesa chimica

Molti composti bioattivi sono prodotti in risposta a fattori di stress, sia biotici che abiotici



Difesa chimica ed elicitazione delle colture cellulari



Trattamenti chimici
e fisici

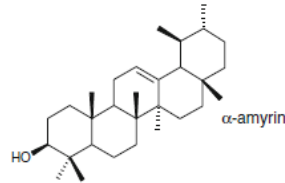


Induzione/ incremento
della produzione di metaboliti

Gli elicitori biotici più usati sono: acido giasmonico, acido acetilsalicilico, chitosano estratti di lievito. Gli elicitori abiotici: stress di luce e temperatura, ultrasuoni.

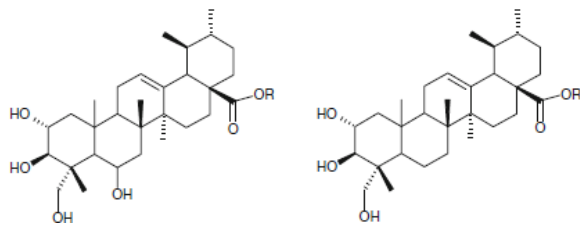
Biotrasformazioni in colture cellulari

Le cellule in coltura possono effettuare biotrasformazioni, grazie alla presenza di enzimi, a partire da precursori a basso costo a composti di alto valore, anche estranei alla specie vegetale in coltura.

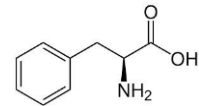


Oxydation,
glycosilation

Centella asiatica



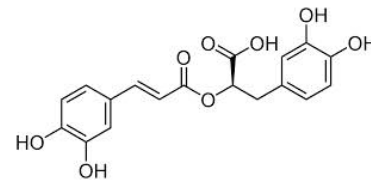
Stimolatori del collagene



Phenylalanin

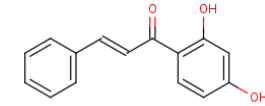


Salvia officinalis



Rosmarinic acid

Antiossidanti, antiinfiammatori,
antimicrobici

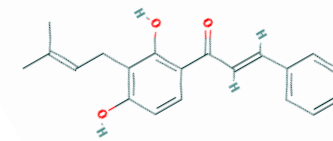


2,4-dihydroxychalcone



Prenylation

Morus nigra



Isocordoin

Antitumorali

Specie studiate nel laboratorio di Biotecnologie cellulari vegetali

• *Maclura pomifera*

• *Hypericum perforatum*

• *Vitis vinifera* (bucce , foglie)

• *Angelica archangelica*

• *Cassia didymobotrya*

• *Azadiracta indica*

• *Taxus baccata*

• *Camptotheca acuminata*

• *Vismia guianensis*

• *Vitis vinifera* (semi)

Colore kaki delle divise americane, pesticida

Attività antidepressiva ed antifungina

Attività antiossidante, antiinfiammatoria ed antiinvecchiamento

Attività antimicrobica ed insetticida

Attività antitumorale

Attività antimicotica



Vitis vinifera

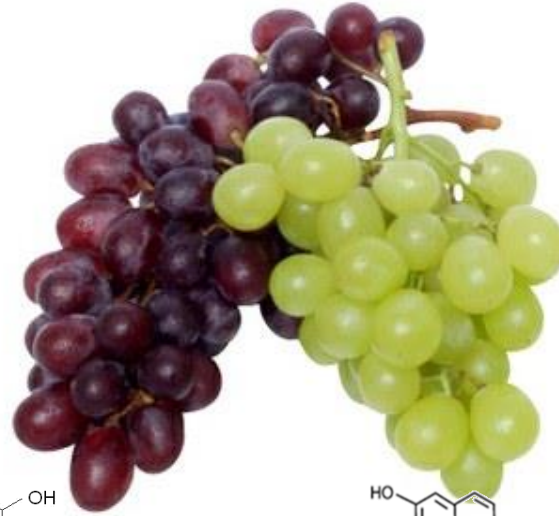
- **Antiossidante**
- **UV protettore**
- **Attività sul microcircolo**
- **Attività antimicotica**

Hypericum perforatum

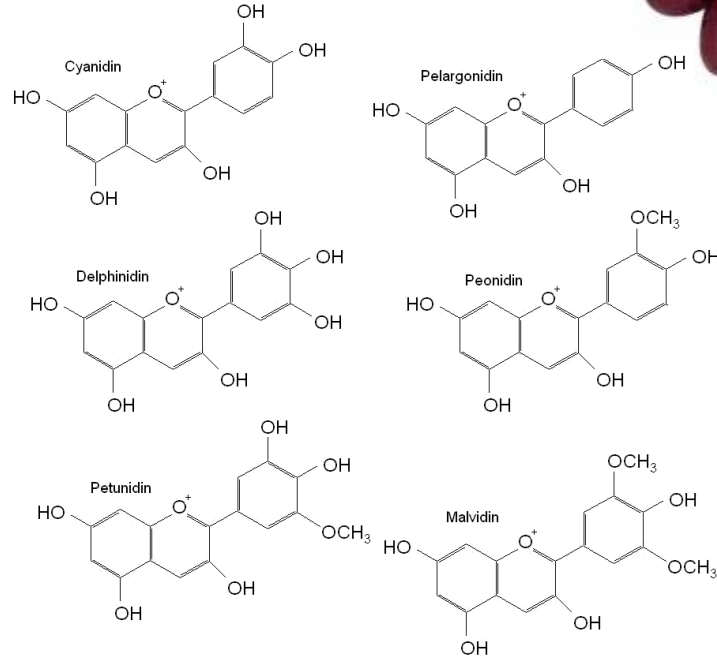
- **Anidepressivo**
- **Antimicotico**



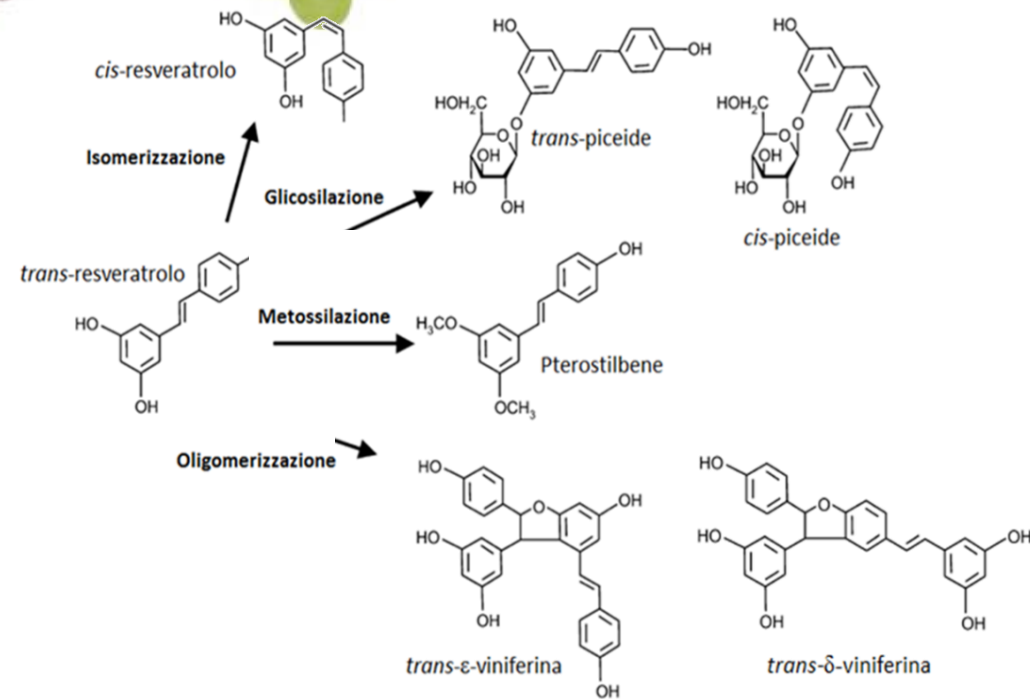
Vitis vinifera



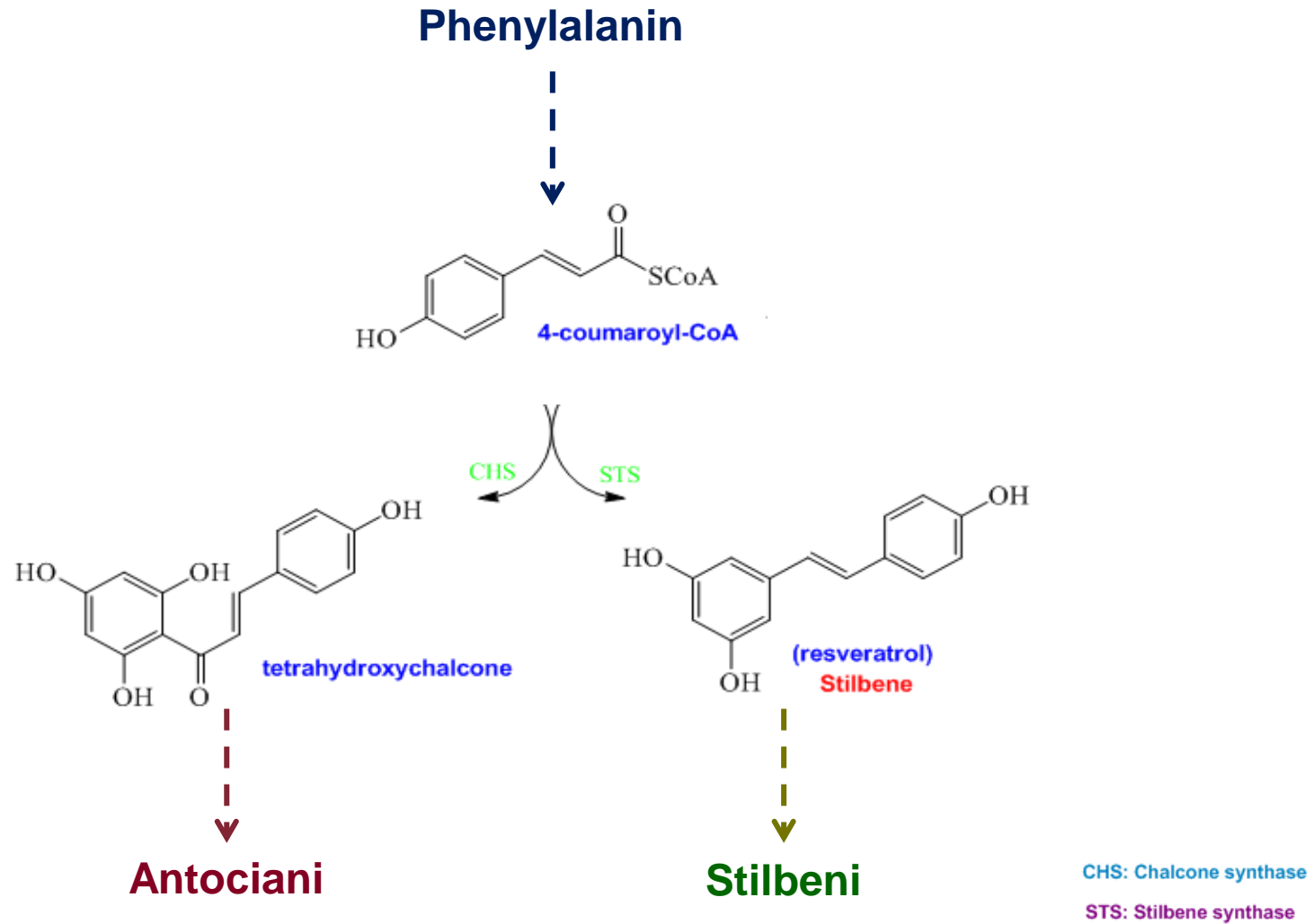
Antociani



Stilbeni (resveratrolo and viniferine)



Metabolismo in *Vitis vinifera*



Anthocyanins and flavan-3-ols from grapes and wines of *Vitis vinifera* cv. Cesanese d’Affile. Natural Product Research 2008. 22: 1033–1039

N. Mulinacci, A.R. Santamaria, C. Giaccherini M. Innocenti, A. Valletta, G. Ciolfi and G. Pasqua*

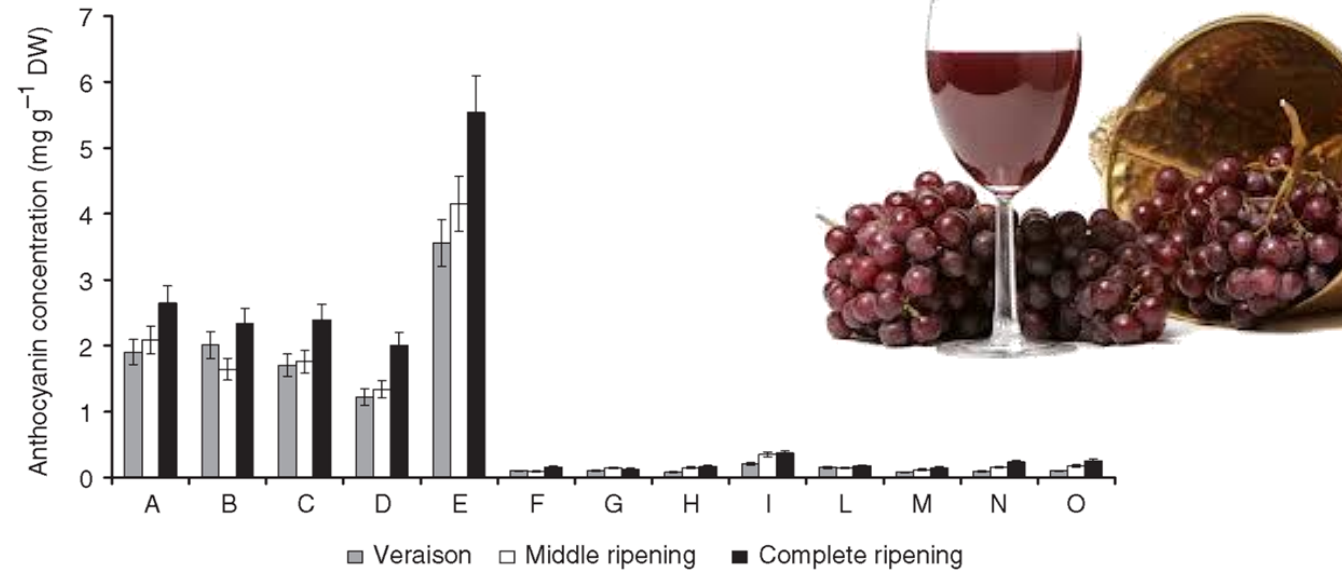


Figure 1. Anthocyanin content in the skin of cv. Cesanese d’Affile at different stages of ripening. Each value represents the mean of three determinations \pm SD and the results are expressed in malvin. A) delphinidin 3-*O*-monoglucoside; B) cyanidin 3-*O*-monoglucoside; C) petunidin 3-*O*-monoglucoside; D) peonidin 3-*O*-monoglucoside; E) malvidin 3-*O*-monoglucoside; F) cyanidin 3-*O*-(6-*O*-acetyl) monoglucoside; G) petunidin 3-*O*-(6-*O*-acetyl)monoglucoside; H) peonidin 3-*O*-(6-*O*-acetyl) monoglucoside; I) malvidin 3-*O*-(6-*O*-acetyl)monoglucoside; L) cyanidin 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroyl) monoglucoside; M) petunidin 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroyl)monoglucoside; N) peonidin 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroyl) monoglucoside; O) malvidin 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroyl)monoglucoside.

Vitis vinifera

Romero Perez et al., 2000 J. Agr. Food Chem,

grape variety	°Brix	µg/g of dry skin			total amount
		<i>trans</i> -resveratrol	<i>trans</i> -piceid ^a	<i>cis</i> -piceid ^b	
white					
Parellada	16	12.54	9.92	37.80	60.26
Parellada	15	11.04	8.08	43.27	62.39
Parellada	19	16.59	nq ^c	5.50	22.09
Macabeo	19	47.60	5.04	11.82	64.46
Chardonnay	18	26.25	12.13	39.68	78.22
Xarel·lo	18	18.13	64.31	307.18	389.61
red					
Cariñena	19	18.32	24.03	11.14	53.49
Cariñena	21	21.35	38.43	20.89	80.66
Cariñena	17	17.28	20.89	12.39	50.55
Cabernet Sauvignon	20	26.65	11.12	51.31	89.09
Cabernet Sauvignon	17	19.35	5.49	9.80	34.64
Cabernet Sauvignon	21	39.38	6.44	4.00	49.83
Merlot	16	38.26	342.66	645.47	1026.39



Bavaresco et al., 2008 J. Agr. Food Chem,

Table 1. Effect of Soil Type, Fungal Infection, and Phenological Phase on the Berry Tested Parameters^a

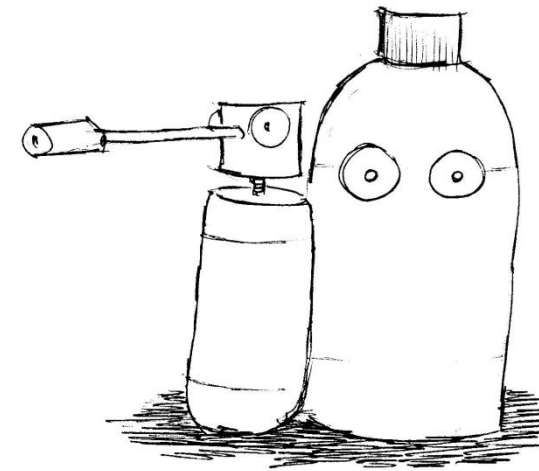
		symptoms (%)	ochratoxin A (µg/kg of FW)	<i>trans</i> -resveratrol (µg/g of FW)	ϵ -viniferin (µg/g of FW)
soil type	neutral	29 a	30.5 a	1.24 a	0.60 a
	calcareous	34 b	94.9 b	1.46 a	0.98 a
fungal infection	control	0 a	0.0 a	0.29 a	0.04 a
	<i>A. carbonarius</i>	86 b	125.5 b	2.41 b	1.55 b
phenological phase	veraison	20 a	90.3 a	1.50 a	1.36 a
	ripening	45 b	35.2 b	1.21 a	0.23 b

^a Each value is the mean of 12 data. Values in each column without the same letters are significantly different ($P \leq 0.05$)

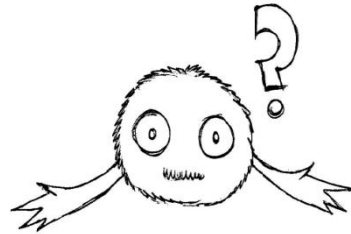
Attività antimicrobica dei cosmetici funzionali

Prodotti della cura personale che svolgono azione benefica

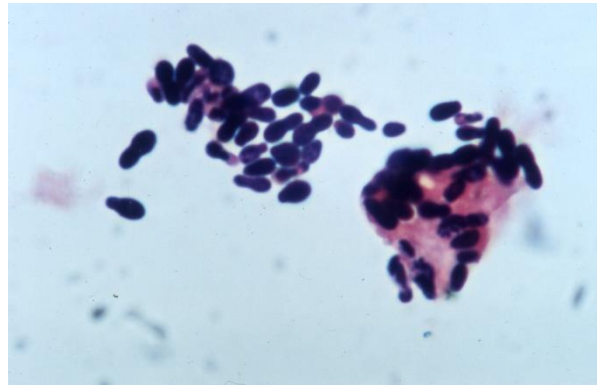
- Cura dei capelli: scampo antiforfora
- Cura della pelle: prodotti anti-acne
- Cura igiene orale: dentifrici
- Igiene personale: saponi e deodoranti



Quali microbi causano la forfora?

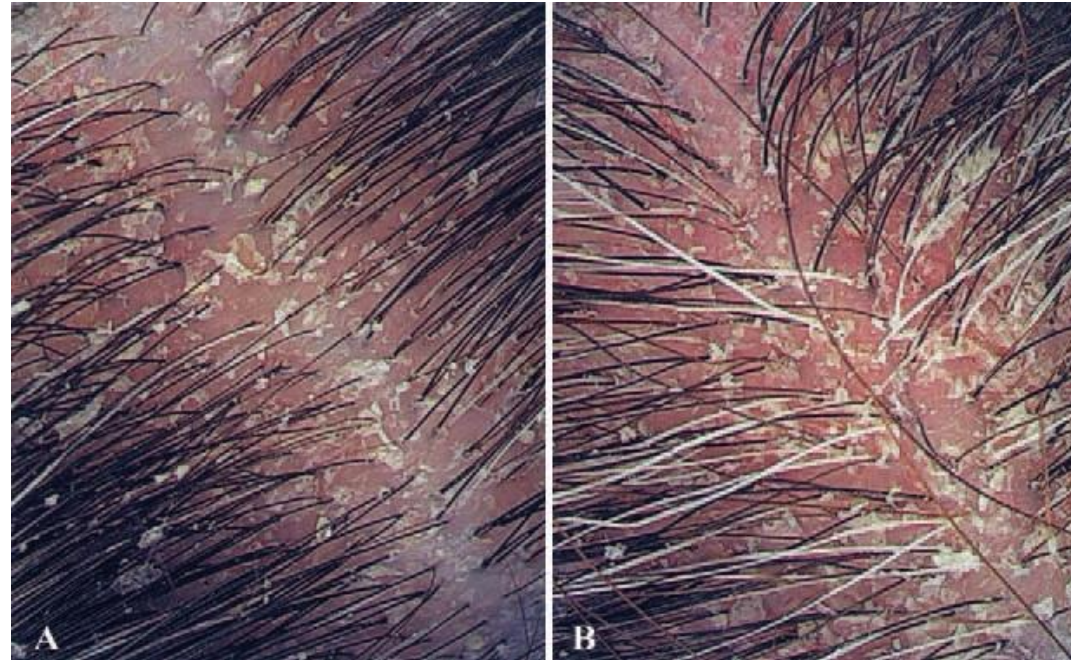


*I funghi appartenenti al genere **Malassezia** causano la forfora*



Forfora e dermatite seborroica

Malassezia fungi



Dandruff (A) and seborrheic dermatitis (SD) (B) on scalp. Note larger, yellowish scale and scalp erythema in SD versus dandruff.

***Malassezia* species possono essere anche associati a diversi problemi della cute**



Come la folliculite:



A

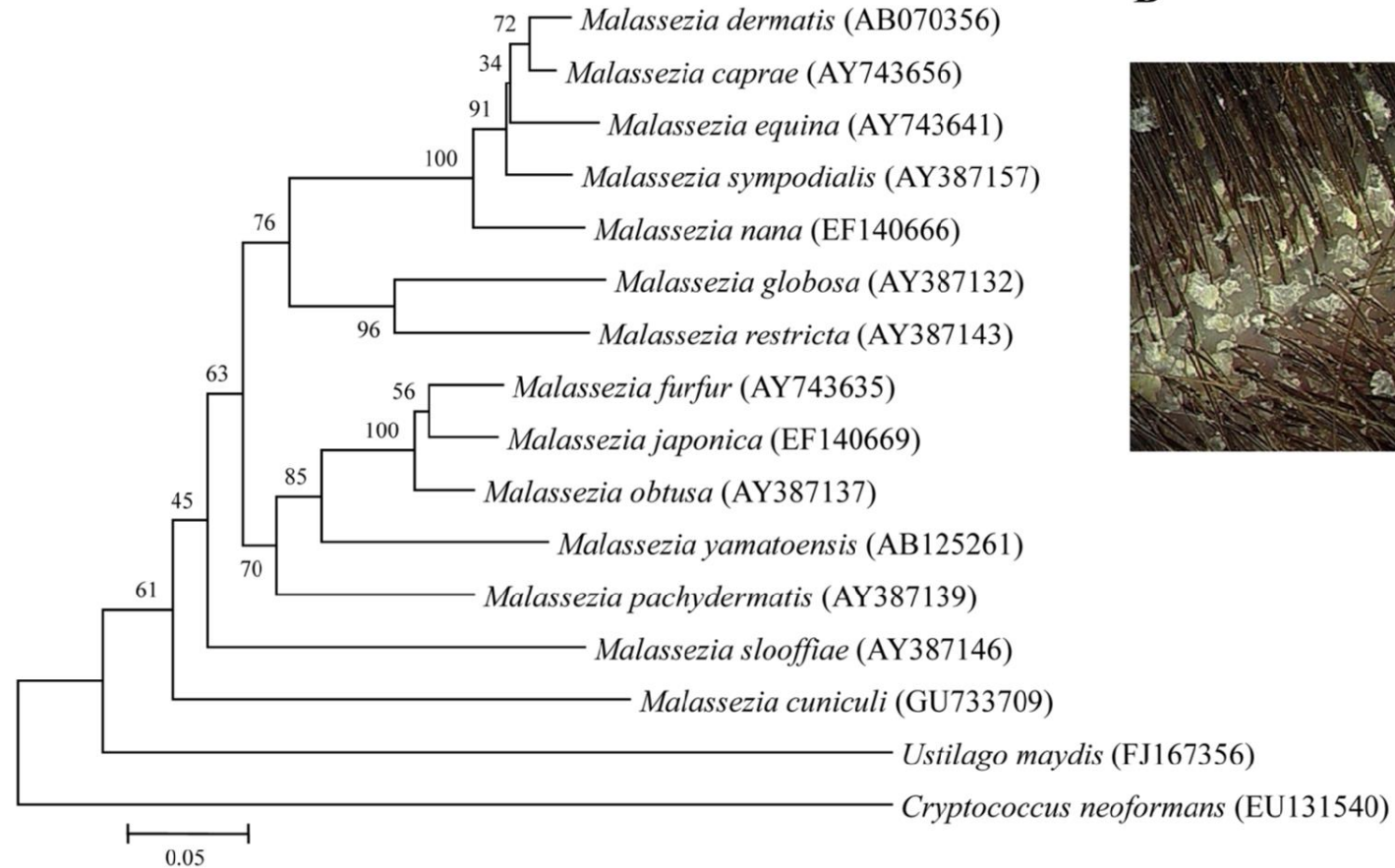


B

Figure 3. Patient with *Malassezia* folliculitis: A. Before treatment with antifungal; B. After treatment with antifungal.

Ci sono evidenze sperimentali che alcuni prodotti antifungini sono benefici in pazienti con problemi alla pelle

Ad oggi ci sono 14 specie conosciute di *Malassezia*



Malassezia fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases. Saunders CW, Scheynius A, Heitman J (2012) PLoS Pathog 8(6): e1002701.

OUR RECENT STUDIES ON ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM ROOT CULTURES OF *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium*

- Noemi Tocci, Giovanna Simonetti, Felicia Diodata D'Auria, Simona Panella, Anna Teresa Palamara, Alessio Valletta, Pasqua Gabriella. Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 91 (4): 977-987 (2011). DOI: 10.1007/s00253-011-3303-6.
- Noemi Tocci, Felicia Diodata D'Auria, Giovanna Simonetti, Simona Panella, AnnaTeresa Palamara, Gabriella Pasqua. A three-step culture system to increase the xanthone production and antifungal activity of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* in vitro roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 54-58. (2012)
- Noemi Tocci, Felicia Diodata D'Auria, Giovanna Simonetti, Simona Panella, Anna Teresa Palamara, Aline Debrassi , Clovis Antonio Rodrigues, Valdir Cechinel Filho, Fabio Sciubba, Gabriella Pasqua. Bioassay-guided fractionation of extracts from *Hypericum perforatum* in vitro roots treated with carboxymethylchitosans and determination of antifungal activity against human fungal pathogens *Plant Physiology and Biochemistry* 70 :342-347(2013)
- N. Tocci, G. Simonetti, F. D. D'Auria, S. Panella, A. T. Palamara, F. Ferrari & G Pasqua ,Plant Biosystems Chemical composition and antifungal activity of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* roots from wild plants and plants grown under controlled conditions, *Plant Biosystems* (2013) DOI: 10.1080/11263504.2013.806964

Presenza di placca

Carie dentali
gingiviti
Malattie dentali



Assenza di placca

Cos'è la **placca dentale batterica** e come si forma?

La placca è un insieme di germi che aderiscono alla superficie dentale



Dopo alcune ore dal lavaggio dei denti si forma una **pellicola di proteine** salivari che favorisce l'adesione dei batteri



I batteri in presenza di zuccheri si riproducono **formando la placca** e producendo acidi ed enzimi



Tali acidi ed enzimi attaccano lo smalto disgregandolo, il che espone la dentina e la polpa dentaria all'attacco dei batteri che **causano la carie**

MEDICINA360.COM

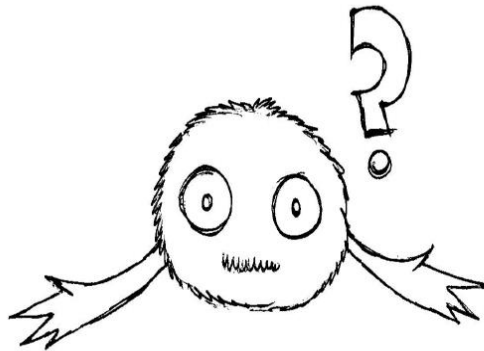
©

L'assenza di placca comporta: denti puliti, alito fresco.

Cos'è la placca dentale?
È un biofilm microbico

Malattia parodontale è spesso dovuta ad una risposta infiammatoria al
biofilm

BIOFILM??



Un **biofilm** è una comunità strutturata di cellule batteriche racchiuse in una matrice polimerica autoprodotta ed adesa ad una superficie inerte o vivente.

La letteratura scientifica riporta la formazione dei biofilm da parte di una serie sempre più ampia di specie microbiche: tutti i tipi di superficie, incluso le foglie di piante di prezzemolo, protesi e presidi medici e persino i recipienti di alluminio usati per conservare combustibile nucleare spento, possono essere colonizzate da biofilm microbici. Gruppi di ceppi mutanti ben caratterizzati si sono dimostrati potenti strumenti nella ricerca dei meccanismi con cui i batteri iniziano la formazione del biofilm.

Nel caso dell'*E. coli*, mutanti difettivi nella formazione di biofilm sul cloruro di polivinile (PVC) sono stati ottenuti tramite mutagenesi per inserzione di trasposoni.

Questi ceppi risultavano incapaci di produrre i **pili di tipo I** oppure non erano mobili. I pili di tipo I sono adesine sensibili al mannosio e il loro ruolo si svolge nelle fasi di inizio dei biofilm.

Un'ulteriore analisi del ruolo della mobilità ha mostrato che i mutanti mancanti dei **flagelli** o che avevano i flagelli paralizzati, erano seriamente difettivi nella capacità di formare il biofilm. Le poche cellule non mobili che riuscivano ad attaccarsi al PVC restavano localizzate in piccoli gruppi. La struttura di un biofilm maturo varierà con la localizzazione, la natura dei microrganismi costituenti e la disponibilità dei nutrienti. La struttura di un biofilm può variare da densi strati confluenti di cellule (placche dentali o biofilm di catetere urinario) a microcolonie disperse o cumuli di cellule che fuoriescono da uno strato basale sottile (biofilm che si formano sulle superfici nelle acque naturali oligotrofiche).

Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection

Steven L Percival, Charlotte Emanuel, Keith F Cutting, David W Williams

Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. Int Wound J 2012; 9:14–32

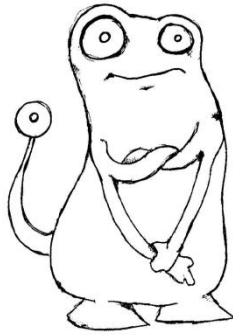
biofilms in dermatologia

- Acne
- Candidiasi
- Dermatite atopica
- Ferite



BIOFILM

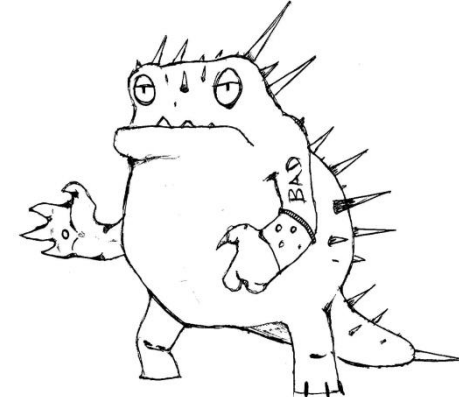
MICROBIAL BIOFILM



Ceppi Suscettibili

cel. planctoniche: cellule libere

cel. sessili (cellule attaccate)



Ceppi resistenti

Un biofilm contenente differenti specie prende solitamente il nome di consorzio batterico, ed è quantitativamente più frequente di biofilm composti da singole specie. Ogni specie presente nel consorzio svolge differenti funzioni metaboliche e presenta solitamente diverso **trofismo**, richieste di ossigeno o **nicchia ecologica**. In questo modo il consorzio è più efficiente senza che le diverse specie entrino in conflitto tra loro. Il biofilm è tenuto insieme e protetto da una matrice di composti polimerici escreti. La matrice protegge le cellule all'interno e facilita la comunicazione tramite segnali chimici o fisici.

Biofilms sono altamente resistenti agli agenti antimicrobici

CATTIVO ODORE DEI PIEDI ??



Cattivo odore dei piedi è spesso dovuto a trasformazione del sudore ad opera di funghi e batteri

Conservazione dei prodotti cosmetici

Conservanti aggiunti ai prodotti:

- per prevenire il deterioramento e prolungare la durata del prodotto;
- proteggere il consumatore da potenziali infezioni

C'è un grande interesse nello sviluppo di conservanti che non siano tossici (ad esempio problematiche legate ai parabeni sostanze conservanti ad azione battericida e fungicida, molto utilizzate nei cosmetici, potenziali interferenti endocrini cioè in grado di alterare l'equilibrio ormonale)

Sostanze vietate e limitate

Recentemente è stata pubblicata una nota Ue, in cui la Commissione esprime le sue intenzioni. Ecco quali sono i parabeni oggetto dell'annuncio e i provvedimenti.

Parabeni vietati: isopropylparaben, isobutylparaben, phenylparaben, benzylparaben e pentylparaben (in generale, sono già poco usati).

Parabeni in procinto di essere vietati per i pannolini e limitati negli altri cosmetici (si vuole passare da una concentrazione massima consentita dello 0,8% a una dello 0,14%): propylparaben e butylparaben (entrambi molto usati nelle formulazioni dei cosmetici).

Alcuni parabeni sono “naturali”, nel senso che sono composti di origine vegetale presenti in natura. Il Methylparaben, ad esempio, si trova nei mirtilli: è la pianta a produrlo per difendersi dai parassiti.

Di sintesi chimica sono invece i parabeni a catena lunga e ramificata, più stabili e più assorbibili per via cosmetica, come l'Isobutyl paraben e l'Isopropyl paraben. Recentemente i parabeni, quelli ramificati in particolare, sono stati posti sotto osservazione per presunti effetti avversi sulla salute. Per questo, per il fatto che sono quasi inutilizzati in cosmesi e perché poco amati dall'opinione pubblica, **il Legislatore ha stabilito l'uscita di scena a partire da luglio 2015 dei parabeni a catena ramificata.**

Per rispondere alle richieste dei consumatori molti cosmetologi hanno scelto comunque di escludere tutti i parabeni dai loro prodotti.

Ma la dicitura **“senza parabeni” o “paraben free” non significa che il cosmetico sia più sicuro.**

Innanzitutto perché l'esclusione di parabeni può significare il ricorso a **conservanti più rischiosi per la salute, come il triclosan e il kathon.** Il mio consiglio quindi è di non accontentarsi dell'indicazione “paraben free”, ma di leggere tutta l'etichetta per verificare che il prodotto non contenga ingredienti più pericolosi.

New systems for a long-term presevation

AAPS PharmSciTech (© 2013)
DOI: 10.1208/s12249-013-9972-y

Research Article

Solid Lipid Nanoparticles as Effective Reservoir Systems for Long-Term Preservation of Multidose Formulations

Felice Cerreto,^{1,4} Patrizia Paolicelli,¹ Stefania Cesa,¹ Hend M. Abu Amara,² Felicia Diodata D'Auria,³ Giovanna Simonetti,³ and Maria Antonietta Casadei¹

Cosmetic multidose preparations, as well as pharmaceutical ones, are at risk of contamination by microorganisms, due to their high water content. Besides the risk of contamination during manufacturing, multidose cosmetic preparations may be contaminated by consumers during their use. In this paper, the results of the utilization of nanoparticles as reservoir systems of parabens, the most used class of preservatives, were reported.

NUOVE TECNOLOGIE NELLA COSMETICA

Nutricosmetics can be described as a recent result of a convergence phenomenon between cosmetics and food industries, still unfamiliar to many consumers and sometimes even to foods and cosmetics experts. Nutricosmetics advertisements describe such oral supplementation of nutrients sometimes as beauty pills.

The main ones are collagen, hyaluronic acid, vitamins and antioxidants.

Green cosmetics, also known as bio cosmetics or eco-friendly makeup, are cosmetics that are generally manufactured using all-natural, non-toxic ingredients. Many green cosmetics use naturally occurring mineral ingredients for coloring and sun protection purposes.

Nanotechnologies use materials on an incredibly small scale so that they take on new properties compared to their larger form. UV filters used in sunscreens produced in nano form, for example, become clear rather than white when compared to their larger form. Some of these materials could present new risks .

Nutricosmetic Ingredients: Vitamins, Carotenoids, and Omega 3



Vitamins

- Natural vitamins are in great demand with increase in consumers knowledge on its health benefits and consumers skepticism over engineered food.
- Vitamin C is widely used in nutricosmetics products for its antioxidant properties and its role in collagen production. It also helps reduce the effect of UV radiation on skin.
- The largest manufacturers of vitamins are DSM, BASF and Roquette.



Carotenoids

- Carotenoids are the best known antioxidants and the major types are beta carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin, astaxanthin, phytoene and phytofluene.
- Carotenoid supplements have proven to boost skin softness and suppleness and are one of the major ingredient in nutricosmetics supplement tablets.
- Beta carotene is the major ingredient that is used in beverages, fruit based drinks and dairy products for food coloring.



Omega-3 fatty acids

- Omega 3 and 6 are major types of polyunsaturated fatty acids that are widely used in nutricosmetics applications with beneficial effects mainly for skin health.
- Many companies are looking to invest R&D in omegas as this ingredient has a great potential in functional food and beverage applications
- The largest manufacturers of omega-3 fatty acids are Cargill, Cognis and Lonza.
- For example, ANTI AGE 40+ and Radiance Formula from functionalab has omega-3 fatty acids EPA & DHA and is positioned for skin health.

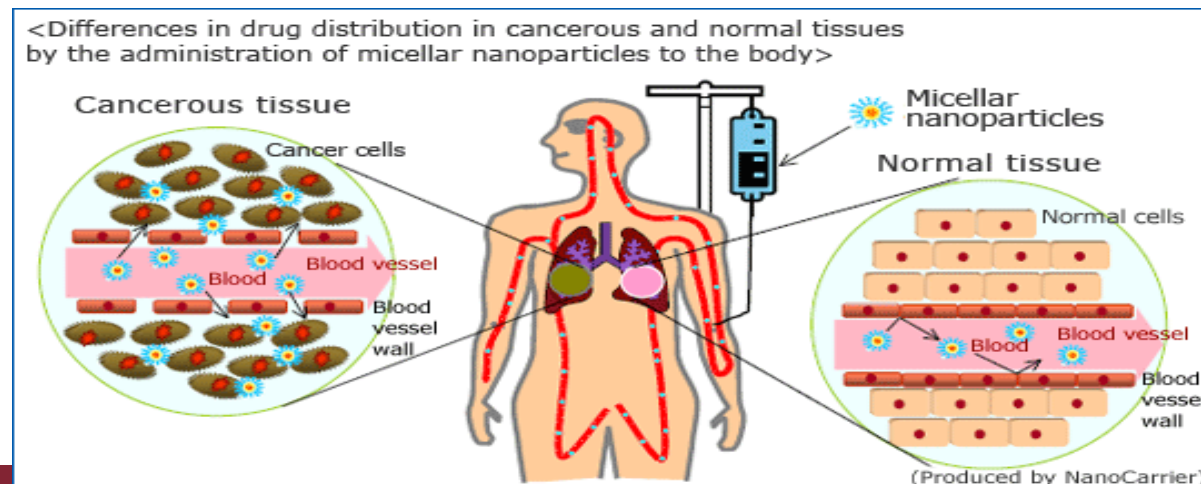
Green cosmetic

Cosmetica aiurvedica formula i prodotti che portano un equilibrio armonioso per il corpo e la mente. Hanno molti prodotti per i problemi comuni della pelle come invecchiamento, acne, pigmentazione e per capelli come forfora e caduta dei capelli. Ci sono anche una grande varietà di saponi fatti a mano con fragranze come legno di sandalo, lavanda, citronella e gelsomino



An important application of nanobiotechnology is the use of **nanocarriers** for the **delivery of bioactive compounds**

Up today, the nanobiotechnology has been studied mainly in **biomedical field**

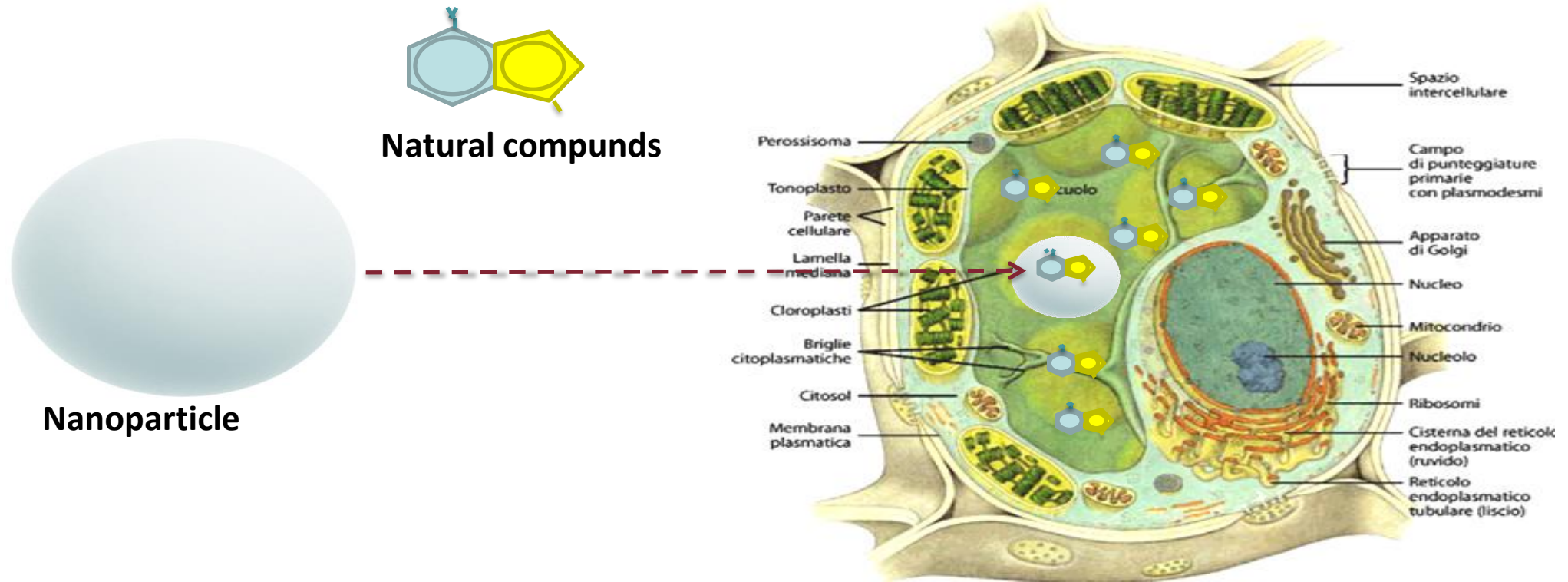




Nanobiotechnology

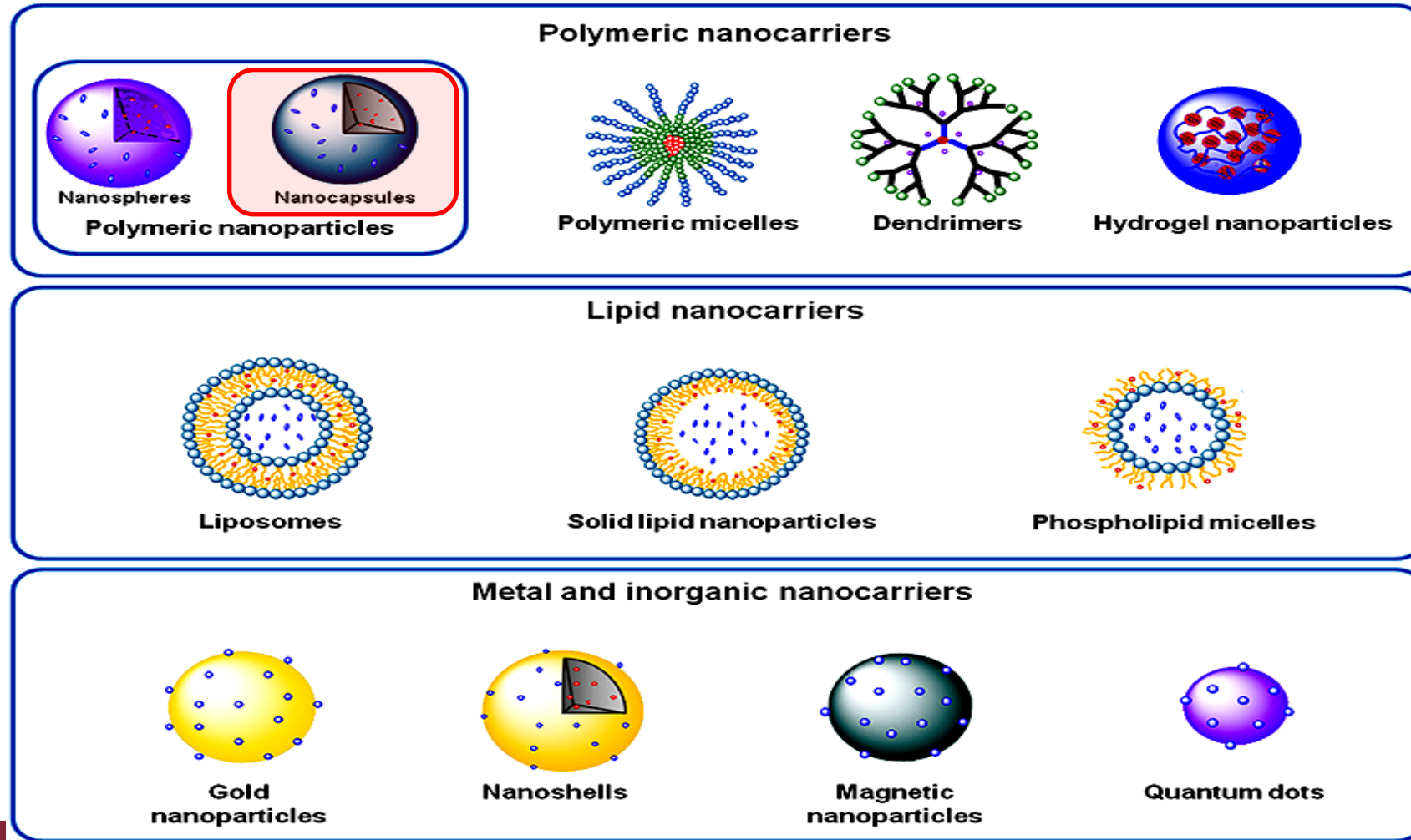


Natural compounds administration through nanocarrier





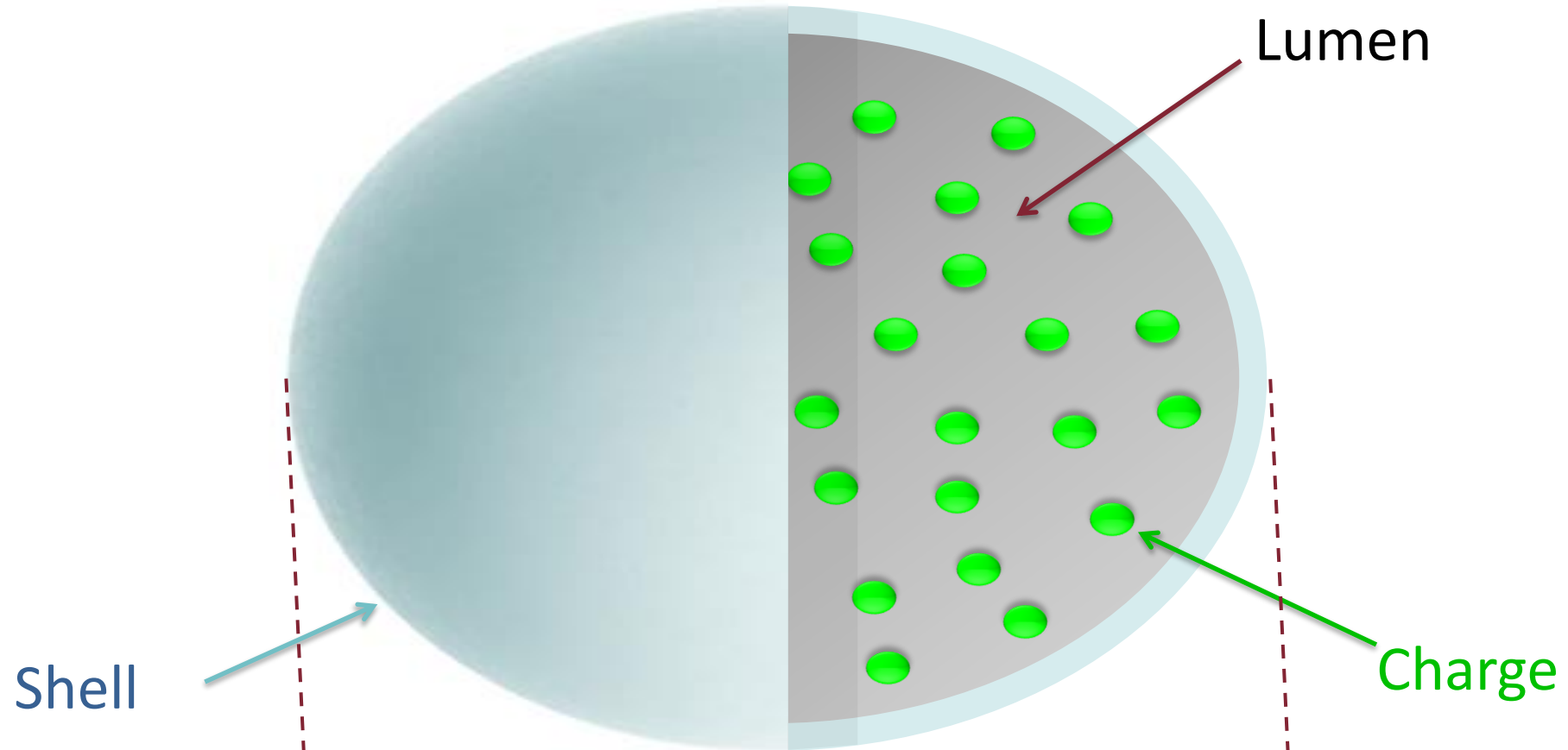
Nanocarriers





Nanoparticles

Polymeric nanocapsules



10-1000 nm