



Co-funded by
the European Union



GUIDA

Titolo del progetto: Cooperazione per implementare metodi innovativi per la valutazione delle piante medicinali con ruolo centralo nella farmaceutica, nell'agricoltura e nella nutrizione.

Acronimo del progetto: EURO-PLANT-ACT

Progetto no: 2022-1-RO01-KA220-HED-000088958

La guida, indirizzata a specialisti di diversi settori come l'agricoltura, la biotecnologia, l'industria alimentare, la farmacia, la nutrizione, presenta le metodologie relative a: (i) selezione, coltivazione, raccolta e caratterizzazione di piante medicinali organiche, (ii) valutazione della composizione chimica e analisi delle proprietà farmacologiche, (iii) definizione del profilo di sicurezza farmacocinetica e metodi di valorizzazione delle piante medicinali e (iv) prodotti da esse derivati (estratti, oli essenziali).

Professori responsabili delle parti teoriche:

Coordinatore (UMFVBT): Dehelean Cristina Adriana, Pînzaru Iulia Andreea, Macașoi Ioana Gabriela, Șoica Codruța Marinela

Partner 1 (USVT): Alexa Ersilia, Negrea Monica, Cocan Ileana, Obistoiu Diana, Pop Georgeta

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Ravlić Marija

Partner 3 (UNICAL): Conforti Filomena, Statti Giancarlo

Partner 4 (ROMPAN): Voica Daniela, Avram Dana

Professori responsabili delle parti pratiche:

Coordinatore (UMFVBT): Dehelean Cristina Adriana, Pînzaru Iulia Andreea, Minda Daliana Ionela, Drăghici George Andrei

Partner 1 (USVT): Alexa Ersilia, Negrea Monica, Cocan Ileana, Obistoiu Diana, Pop Georgeta

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Ravlić Marija

Partner 3 (UNICAL): Conforti Filomena, Statti Giancarlo

Partner 4 (ROMPAN): Voica Daniela, Avram Dana



Indice

Capitolo 1. Metodi di ricerca sull'attività antifungina degli oli essenziali contro i funghi fitopatogeni (P2 - UNIOS)	4
1.1. Introduzione	4
1.2. Test volatile per valutare l'influenza degli oli essenziali in vitro	4
1.3. Test di contatto per la valutazione dell'effetto degli oli essenziali in vitro	9
Capitolo 2. Effetto erbicida degli estratti vegetali e degli oli essenziali (P2 - UNIOS)	12
2.1. Introduzione	12
2.2. Effetto erbicida degli estratti vegetali	13
2.3. Effetto erbicida degli oli essenziali	18
Capitolo 3. L'uso delle piante medicinali come ingredienti a valore aggiunto nell'industria dei prodotti funzionali da forno e pasticceria	21
3.1. Introduzione	21
3.2. Piante medicinali utilizzate per migliorare il gusto, il colore e l'aroma dei prodotti da forno	
3.3. Piante medicinali come agenti antiossidanti nei prodotti da forno	24
3.4. Piante medicinali come agenti antimicrobici nei prodotti da forno	35
3.5. L'attività delle piante medicinali contro i batteri patogeni prevalenti nell'industria alimentare	37
Capitolo 4. Tendenze attuali e metodi per la valutazione in vitro dell'attività biologica (CO - UMFVBT)	40
4.1. Introduzione	40
4.2. Preparazione di una linea cellulare per saggi cellulari	43
4.2.1. Regole generali per la sicurezza nei laboratori di colture cellulari	43
4.2.2. Tabella delle risorse chiave per scongelare/sottocoltura/crioconservare una linea cellulare	45
4.2.3. Dettagli del metodo passo passo	47
4.3. SAGGI BASATI SU CELLULE USANDO CELLE 2D	57
4.3.1. Test di vitalità cellulare	57
4.3.2. Metodi di colorazione con immunofluorescenza per la valutazione della morfologia cellulare	65
4.3.3. Metodi per valutare la capacità di migrazione cellulare	72
4.3.4. Test di biologia molecolare per lo studio dei meccanismi d'azione	74
4.4. Test cellulare utilizzando modelli 3D (tridimensionali).	77



Co-funded by
the European Union



4.4.1. Determinazione del potenziale irritante (EpiDerm Skin Irritation test – OECD TG 439).....	78
4.4.2. Determinazione della fototossicità (EpiDerm Phototoxicity Assay – OECD TG 498)	80
Capitolo 5. L'uso dei metodi in ovo per la valutazione dell'attività biologica (CO - UMFVBT)	84
5.1. Introduzione	84
5.2. Determinazione del potenziale antiangiogenico mediante test CAM	85
5.3. Determinazione del potenziale irritante e antiirritante	88
Capitolo 6. Metodi per ottenere preparati dalle piante (estratto e oli essenziali)	91
6.1. Introduzione	91
6.2. Macerazione	92
6.3. estrazione con Soxhlet	94
6.4. Tecniche di estrazione innovative	96
6.4.1. Estrazione assistita da ultrasuoni	96
6.4.2. Estrazione assistita da enzimi.....	98
6.4.3. Estrazione assistita da microonde	99
6.4.4. Estrazione di fluidi supercritici.....	100
6.4.5. Naviglio extractor ®.....	101
6.5. Estrazione dell'olio essenziale	103



Co-funded by
the European Union



Capitolo 1. Metodi di ricerca sull'attività antifungina degli oli essenziali contro i funghi fitopatogeni (P2 - UNIOS)

1.1. Introduzione

Gli oli essenziali (EO) sono noti come approccio biologico al controllo dei parassiti. Questo metodo prevede l'utilizzo di organismi e prodotti da essi derivati per gestire direttamente o indirettamente le popolazioni di parassiti. Allo stesso modo, gli estratti vegetali hanno dimostrato proprietà antifungine contro un ampio spettro di funghi dannosi. Questi estratti naturali offrono alternative rispettose dell'ambiente per proteggere le colture agricole dalle malattie [Wilson et al., 1997].

Un approccio alternativo alla protezione chimica delle piante contro i parassiti prevede l'utilizzo di vari composti ed estratti vegetali, come oli essenziali e loro componenti [Kishore et al., 2007]. È interessante notare che sono state identificate oltre 1.300 specie di piante per la loro capacità di sintetizzare composti con proprietà antimicrobiche [Wilkins e Board, 1989]. Gli oli essenziali, in particolare, presentano composizioni complesse, spesso costituite da numerosi componenti. Tipicamente, la composizione dell'olio è dominata da tre componenti principali, che rappresentano circa il 90% del suo volume complessivo, mentre i restanti costituenti si trovano in proporzioni minori [Dorman e Deans, 2000]. Vengono compiuti sforzi affinché gli oli essenziali e gli estratti vegetali diventino un'alternativa per il controllo dei patogeni delle piante perché sono una fonte di composti biologicamente attivi, che possono portare allo sviluppo di modi nuovi e più sicuri per proteggere le piante dagli agenti patogeni [Al-Reza et al., 2010; Veloz-Garcia et al., 2010].

Gli OE si presentano come miscele liquide, volatili, limpide e colorate di diversi composti aromatici. Si ottengono da tutte le parti vegetali, principalmente da erbe e spezie. Si conoscono circa 3000 OE, di cui 300 commercialmente importanti, utilizzati principalmente nel mercato degli aromi e delle fragranze ma oggi esistono numerosi studi sul loro utilizzo in ambito fitosanitario. Test *in vitro* indicano che sono molto efficaci contro i funghi fitopatogeni.

Per determinare l'attività antifungina vengono utilizzati diversi test tra cui si distinguono i test volatili e quelli di contatto. Gli oli vengono utilizzati in diverse concentrazioni.

1.2. Test volatile per valutare l'influenza degli oli essenziali *in vitro*

T Il protocollo sperimentale è condotto secondo il metodo di diffusione del disco descritto da Edris e Farrag (2003) e Silva et al. (2019).



Protocollo Step-by-step

- 1) al centro delle piastre Petri (V = 65 mL) contenenti 15 mL di terreno PDA (agar patate-destrosio), viene inserito con un ago sterile una sezione circolare di micelio (4 mm) (Figura 1.1) cresciuto su PDA (età del micelio di 7 giorni).

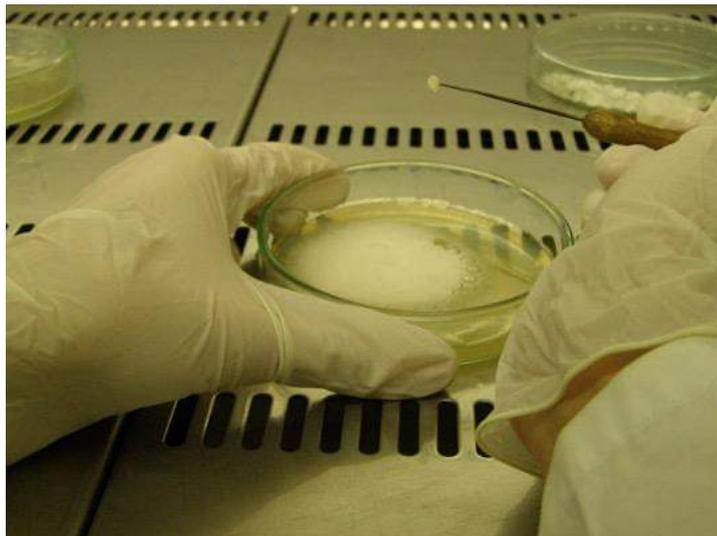


Figura 1.1. Sezione circolare di micelio.

- 2) una carta da filtro sterile del diametro di 7 mm viene posta nel coperchio della capsula Petri e ad essa viene aggiunto l'olio essenziale (Figura 1.2) per ottenere la frazione volumetrica di olio nell'aria prevista sperimentalmente.



Figura 1.2. Applicazione dell'olio essenziale.



- 3) le piastre Petri così preparate vengono chiuse con nastro parafilm e conservate in una camera termostatica ad una temperatura di 18-25°C (solitamente la temperatura dipende dal tipo di patogeno fungino) e un regime di luce di 12 ore di luce /12 ore di buio (Figura 1.3).



Figura 1.3. Piastre Petri conservate in una camera climatica.

- 4) la crescita del micelio viene misurata dopo 72 e 168 ore (di solito, dipende dalla specie fungina) (Figura 1.4 e 1.5). Come controllo viene utilizzata una carta da filtro imbevuta in una quantità adeguata di acqua distillata sterile. Dopo l'ultima misurazione del diametro del micelio nell'esperimento con funghi che producono sclerozi, ad es. *Sclerotinia sclerotiorum*, si contano gli sclerozi, si determina la loro massa media e, dopo 4 mesi di conservazione ad una temperatura di 4 °C, si determina la loro germinazione.

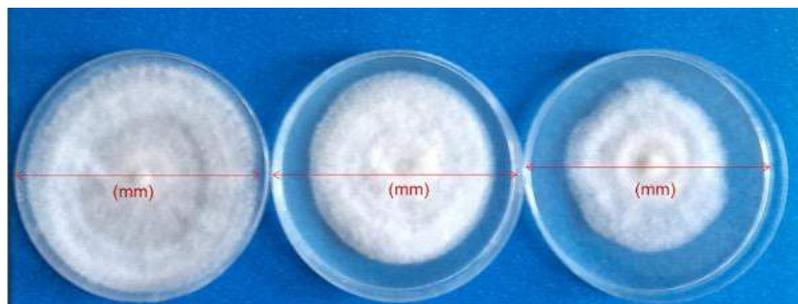


Figura 1.4. La crescita del micelio viene misurata dopo 48, 72 e 168 ore.



Figura 1.5. L'effetto di diversi oli essenziali sulla crescita del micelio del fungo *Neofusicoccum parvum*.

- 5) nell'esperimento con il fungo che ha prodotto conidi, dopo l'ultima misurazione del diametro del micelio, si può determinare la sporulazione preparando una sospensione di conidi in 100 mL di acqua distillata sterile e utilizzando un emocitometro per determinare la concentrazione di conidi per ml di sospensione per tutte le varianti dell'esperimento (Figura 1.6).

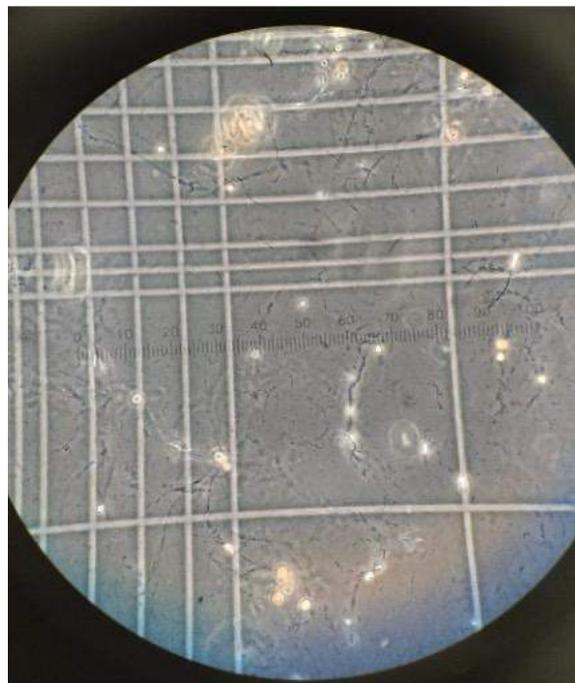


Figura 1.6. Conteggio delle spore mediante emocitometro.

- 6) per determinare la germinazione dei conidi dalla sospensione preparata per ciascuna variante dell'esperimento si prelevano 20 μ L e si distribuiscono sul substrato PDA precedentemente versato in piastre Petri del diametro di 60 mm. Le piastre Petri



vengono poste in una camera termostatica ad una temperatura di 18-25 °C e un regime di luce di 12 ore di luce/12 ore di buio. Dopo 24 ore, su un campione di 3 x 20 conidi, viene determinato il numero di conidi germinati. I conidi sono considerati germinati se il tubo germinale è uguale o maggiore della lunghezza dei conidi (Figura 1.7).



Figura 1.7. Germinazione dei conidi.

- 7) per i funghi che formano microsclerozi (es. *Sclerotium cepivora* e *Macrophomina phaseolina*), dopo l'ultima misurazione della crescita miceliale, si può prelevare una sezione circolare del diametro di 4 mm e si possono contare i microsclerozi. La sezione circolare prelevata per determinare il numero dei microsclerozi deve essere prelevata ad una distanza di 10 mm dal bordo del disco posto al centro della capsula Petri (Figura 1.8).

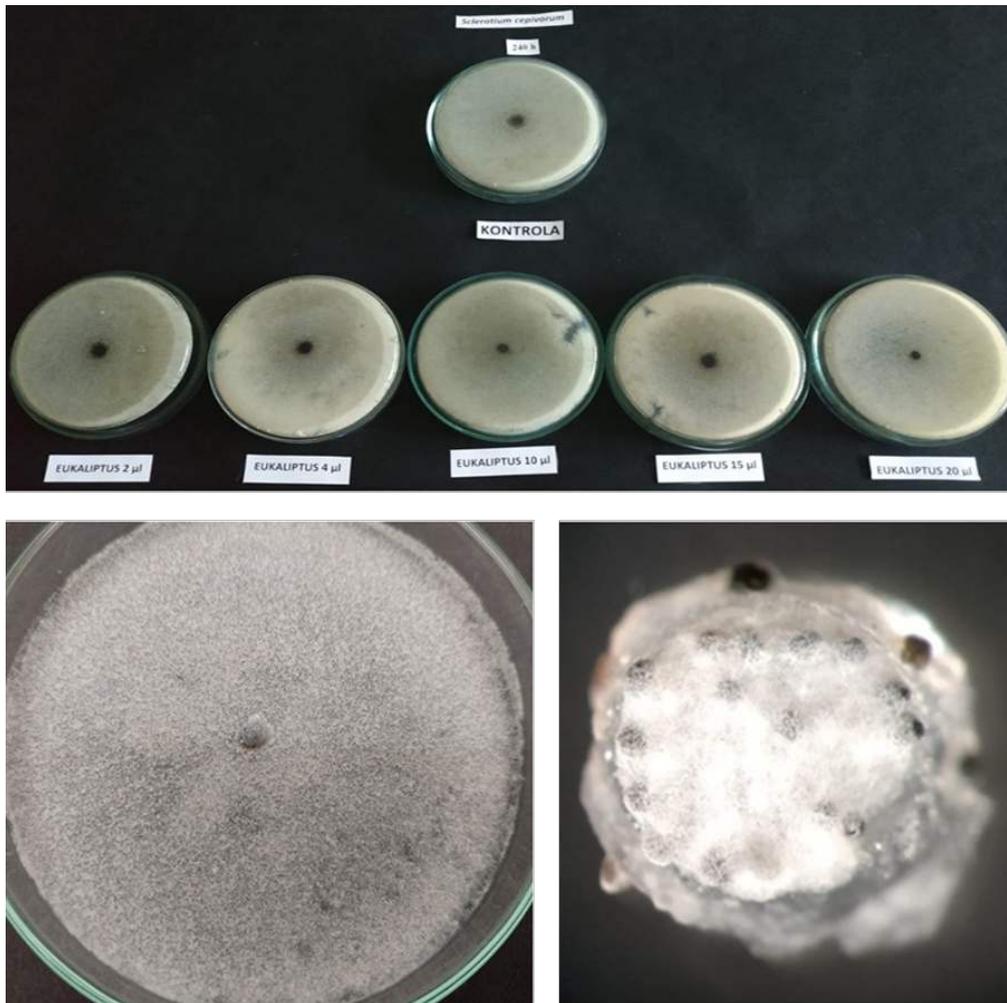


Figura 1.8. Influenza di diversi oli essenziali su *Sclerotium cepivora*.

1.3. Test di contatto per la valutazione dell'effetto degli oli essenziali *in vitro*

La procedura per il test di contatto è molto simile al test dei volatili con la differenza che l'olio viene miscelato nel PDA.

Protocollo Step-by-step

- 1) 10 mL di PDA vengono versati in piastre Petri del diametro di 90 mm, nelle quali l'olio essenziale viene precedentemente miscelato per ottenere la frazione volumetrica di olio prevista sperimentalmente nel substrato PDA. Il controllo negativo è acqua distillata sterile.
- 2) le piastre Petri vengono chiuse con nastro di parafilm e conservate in una camera termostatica ad una temperatura di 18-25°C, durante la quale si verifica la crescita del micelio del fungo (mm) e la comparsa della struttura riproduttiva (es. sclerozi o conidi) che sono monitorati.



Co-funded by
the European Union



- 3) la crescita micellare viene misurata solitamente dopo 62 e 168 ore.
- 4) l'inibizione della crescita micellare viene calcolata utilizzando la formula di Wu et al. (2013):

$$I(\%) = [(C-T)/(C-0.4)] \times 100,$$

dove:

I (%) - inibizione percentuale della crescita micellare sui composti testati

C - diametro di crescita dei funghi su PDA puro,

T - diametro della crescita dei funghi sul PDA trattato.

- 5) Sulla base dei dati ottenuti è possibile calcolare i valori EC50 per ciascun olio essenziale. I valori EC50 mostrano quali oli essenziali hanno avuto l'effetto di ridurre la crescita micellare del 50% (Figura 1.9).

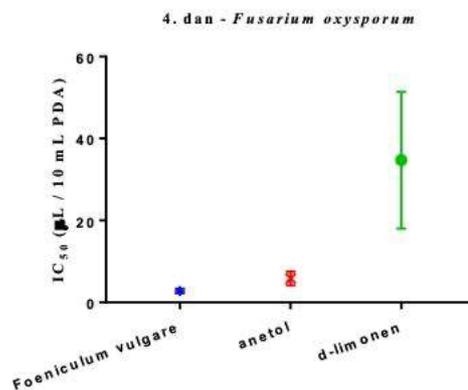


Figura 1.9. Confronto dell'EC50 dell'olio essenziale di finocchio (*Foeniculum vulgare*) e dei suoi componenti (anetolo e d-limonene) per *Fusarium oxysporum* utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) e il test di Tukey. I risultati sono presentati come limiti di confidenza al 95% per EC50.

Note!!!

- In entrambe le varianti dell'esperimento (di contatto e volatile), dove l'ultima misurazione non ha determinato alcuna crescita di micelio, viene prelevata una sezione circolare con micelio e trasferita in una nuova piastra Petri con mezzo PDA (senza olio).
- I campioni così preparati vengono conservati per 48 ore (es. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*) o 72 ore (es. *Sclerotium cepivora*) in una camera termostata a 25 °C.
- Se il fungo ha iniziato a sviluppare micelio dopo l'incubazione, l'effetto dell'olio è fungistatico, mentre se non si sviluppa nuovo micelio, l'effetto dell'olio è fungicida.



Co-funded by
the European Union



- La concentrazione (quantità) più bassa di olio alla quale è stata determinata l'inibizione completa della crescita micellare è designata come concentrazione inibente minima (MIC), mentre la concentrazione (quantità) più bassa di olio alla quale è stato determinato un effetto fungicida è designata come concentrazione minima concentrazione fungicida (MFC).

Bibliografia

Wilson CL, Solar JM, El-Ghaouth A, Wisniewski ME. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 1997; 81: 204-210.

Kishore GK, Pande S, Harish S. Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut, *Plant Disease* 2007; 91(4): 375-379.

Wilkins KM, Board RG. Natural antimicrobial systems, in: *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, G. W. Gould, ed., Elsevier, New York 1989; 285–362.

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-316.

Al-Reza SM, Rahman A, Ahmed Y, Kang SC. Inhibition of Plant Pathogens In Vitro and In Vivo with Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pestic. Biochem Physiol* 2010; 96: 86-92.

Veloz-Garcia R, Marin-Martinez R, Veloz-Rodriguez R, Rodriguez-Guerra R, Torres-Pacheco I, Monzalez-Chavira MM, et al. Antimicrobial Activities of Cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) Phenolics- Containing Extract against Fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Ind Crops Prod* 2010; 31: 134-138.

Edris AE, Farrag ES. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their mayor aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/Food* 2003; 47(2): 117-121.

Silva FFA, Alves CCF, Oliveria Filho JG, Vieira TM, Crotti AEM, Miranda MLD. Chemical constituents of essential oil form *Murraya paniculata* leaves and its application to in vitro biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Food Sci. Technol, Campinas* 2019; 39 (Supl.2): 413-417.

Wu J, Kang S, Luo L, Shi Q, Ma J, Yin J, et al. Synthesis and antifungal activities of novel nicotinamide derivatives containing 1, 3, 4-oxadiazole. *Chemistry Central Journal* 2013; 7(1): 64.



Capitolo 2. Effetto erbicida di estratti di piante e oli essenziali (P2 - UNIOS)

2.1. Introduzione

La gestione delle infestanti nell'agricoltura moderna si basa principalmente sull'uso di erbicidi di sintesi, grazie alla loro elevata efficacia, alla semplicità di applicazione e al loro rapporto costo-efficacia. Tuttavia, la loro applicazione impropria ed eccessiva porta alla comparsa di popolazioni resistenti alle infestanti, alla presenza di residui di erbicidi nella catena alimentare e ad effetti negativi sull'ambiente e sulla salute umana e animale [Macías et al., 2003; Singh et al., 2003]. Inoltre, il frequente divieto di utilizzo di principi attivi, la mancanza di prodotti fitosanitari registrati e le restrizioni nell'applicazione di erbicidi di sintesi nei sistemi agricoli biologici e nelle aree protette richiedono un approccio diverso nel controllo delle infestanti.

L'allelotropia è un fenomeno biologico, definito come qualsiasi effetto diretto o indiretto, dannoso o benefico, di una pianta sulla germinazione e la crescita di altre attraverso la produzione di sostanze allelochimiche che vengono rilasciate nell'ambiente [Rice, 1984]. L'allelotropia è considerata uno strumento alternativo per la gestione sostenibile delle infestanti. Le colture allelopatiche che possiedono un forte effetto erbicida possono essere utilizzate come erbicidi naturali sotto forma di estratti vegetali, polveri e oli essenziali per ridurre o inibire la germinazione e la crescita delle erbe infestanti [Singh et al., 2003; Ravlić et al., 2016].

Le piante medicinali di diverse famiglie botaniche, sia coltivate che selvatiche, rappresentano una grande fonte di composti bioattivi per lo sviluppo di nuovi bioerbicidi sicuri e biodegradabili [Bhowmik e Inderjit, 2003; Fujii et al., 2003; Amini et al., 2016]. I metaboliti secondari bioattivi delle piante (allelochimici) sono presenti in varie concentrazioni in tutte le piante e parti di esse [Alam et al., 2001]. Il potenziale fitotossico degli estratti vegetali e degli oli essenziali dipende da molteplici fattori, come l'origine geografica, le condizioni di coltivazione, le variazioni stagionali e lo stadio di crescita della pianta, nonché da fattori ambientali abiotici e biotici che possono aumentare la produzione di metaboliti secondari nelle piante e potenziarne l'effetto inibitorio [Safdar et al., 2014; Sarić-Krsmanović et al., 2019; Medina-Villar et al., 2020; Appiah et al., 2022; Ravlić et al., 2022]. L'attività è influenzata dalla concentrazione, dal metodo di estrazione e dal fatto che il materiale vegetale sia fresco o secco, ma dipende anche molto dalle specie bersaglio, che differiscono nella loro sensibilità [Fujii et al., 2003; Norworthy, 2003; Souza Filho et al., 2009; Ravlić et al., 2016; Ravlić et al., 2022].

Per lo screening di laboratorio delle piante al fine di valutarne il potenziale erbicida vengono utilizzati diversi test e tecniche.



Co-funded by
the European Union



2.2. Effetto erbicida degli estratti vegetali

Per la preparazione degli estratti vegetali il primo passo è la raccolta del materiale vegetale. La corretta identificazione botanica delle specie vegetali è fondamentale e tutte le piante raccolte vengono identificate in base alle loro caratteristiche morfologiche utilizzando chiavi dicotomiche e atlanti. Il materiale vegetale senza sintomi visibili di malattie e danni fisici viene raccolto in diverse località, in presenza di vari fattori ambientali e in diversi stadi di sviluppo della pianta.



Figura 2.1. Raccolta materiale vegetale (*Solidago gigantea*) durante la fioritura.

Se vengono analizzate diverse parti di pianta, prima dell'essiccazione le parti di pianta vengono separate (Figura 2.2).



Co-funded by
the European Union



Figura 2.2. Separazione delle varie parti del material vegetale (*Oenothera biennis*).

La biomassa fresca può essere utilizzata per la preparazione degli estratti, oppure può essere essiccata. Il materiale viene fatto essiccare all'ombra per 24-72 ore e successivamente essiccato in forno a 40-50 °C. La biomassa secca viene tagliata in piccoli pezzi, macinata con un macinino elettronico in polvere fine (Figura 2.3) e conservata in sacchetti di carta in un luogo asciutto e fresco.



Figura 2.3. Aspetto del material vegetale dopo la macinazione.

Protocollo Step-by-step per preparare estratti vegetali acquosi

Gli estratti acquosi vengono preparati seguendo la procedura di Norsworthy (2003) con alcune modifiche.



- 1) la biomassa vegetale fresca o secca nella quantità di 10 g viene estratta in 100 ml di acqua distillata a temperatura ambiente di $22 (\pm 2)$ °C per 24 ore (Figura 2.4). In alternativa, il materiale vegetale può essere estratto con acqua calda.



Figura 2.4. Preparazione degli estratti acquosi.

- 2) la miscela viene poi filtrata attraverso un panno di mussola per rimuovere i detriti e successivamente attraverso carta da filtro per ottenere un estratto acquoso al 10%. Gli estratti in varie concentrazioni si ottengono con ulteriori diluizioni con acqua distillata. Le concentrazioni utilizzate vanno dall'1% al 10%.

Protocollo Step-by-step per preparare un estratto etanolic

- 1) 1) gli estratti etanolic si ottengono per macerazione della polvere della pianta in etanolo da 24 a 72 ore (Figura 2.5).

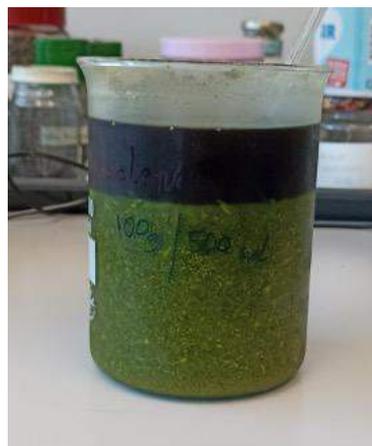
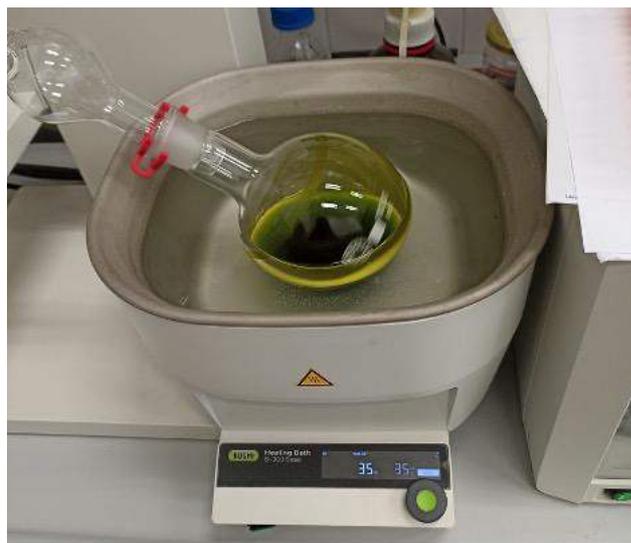


Figura 2.5. Preparazione degli estratti etanolic - macerazione del materiale vegetale in etanolo.



- 2) dopo l'estrazione, l'estratto viene filtrato e il solvente viene rimosso sotto pressione a temperature più basse per ottenere l'estratto grezzo di etanolo (Figura 2.6). Diverse concentrazioni sono ulteriormente ottenute sospendendo l'estratto grezzo in acqua distillata e Tween come disperdente [Silva et al., 2018]. Le concentrazioni utilizzate vanno dallo 0,01% al 5%.



3)

Figura 2.6. Preparazione degli estratti etanolici - ottenimento dell'estratto grezzo.

Protocollo Step-by-step per preparare un estratto vegetale da semi di piante infestanti

- 1) 1) i semi delle specie infestanti utilizzate nel biotest come specie test vengono puliti ed essiccati a temperatura ambiente (Figura 2.7).



Figura 2.7. Pulire e separare i semi delle erbe infestanti prima dell'esperimento.

- 2) prima dell'esperimento, si valuta la germinazione dei semi di erbe infestanti per determinare se la percentuale di germinazione è soddisfacente. Per lo screening di un gran numero di estratti si utilizzano semi di lattuga (Figura 2.8) o di ravanello e gli estratti con l'effetto più elevato vengono ulteriormente valutati sulle specie infestanti.

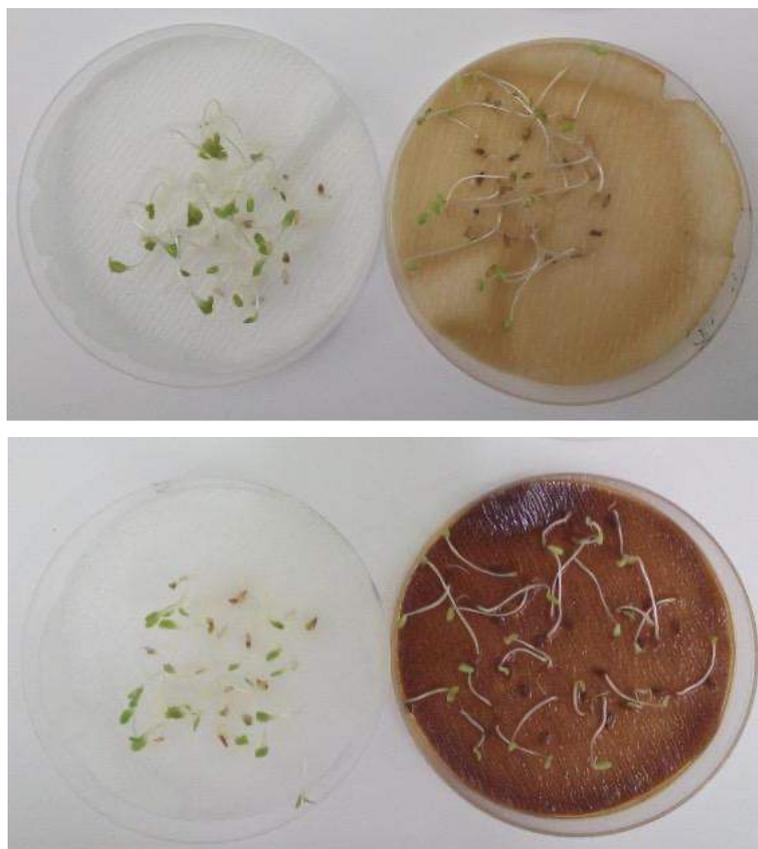


Figura 2.8. Screening di estratti di *Oenothera biennis* da varie parti della pianta (fusto e foglie) utilizzando la lattuga.

- 3) l'effetto degli estratti viene valutato in un biotest su piastra Petri in condizioni controllate di laboratorio. I semi delle piante infestanti vengono posti in piastre Petri sterilizzate e rivestite con carta da filtro. La carta da filtro viene inumidita con 4-6 ml di estratto (a seconda della specie in esame) in ciascuna concentrazione, mentre per il controllo si utilizza acqua distillata (Figura 2.9, 2.10, 2.11). I semi vengono incubati a temperature alternate o costanti e in condizioni di luce/buio ottimali per la germinazione e la crescita di ciascuna specie infestante.





Figura 2.9. Effetto erbicida dell'estratto acquoso di *Salvia pratensis* su *Abutilon theophrasti*.

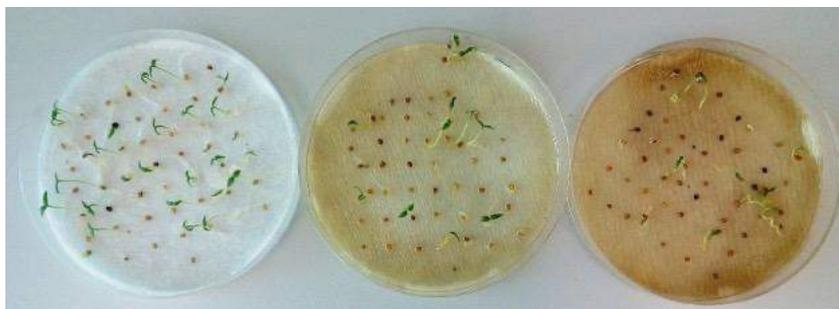


Figura 2.10. Effetto erbicida di varie concentrazioni di estratti di *Chelidonium majus* su *Solanum nigrum*.



Figura 2. 11. Effetto erbicida di varie concentrazioni di estratti acquosi di basilico su *Solanum nigrum*.

2.3. Effetto erbicida degli oli essenziali

L'effetto erbicida degli oli essenziali sulla germinazione e sulla crescita delle specie infestanti è valutato come effetto volatile [Souza Filho et al., 2009] e come effetto di contatto diretto [Sarić-Krsmanović et al., 2019].

Protocollo Step-by-step

- 1) gli oli essenziali sono acquistati o ottenuti da materiale vegetale raccolto ed essiccato all'ombra mediante idrodistillazione per 2,5 h in un apparecchio di tipo Clevenger.
- 2) si prepara una soluzione di oli essenziali in diverse concentrazioni (dallo 0,1 all'1%) con acqua distillata e si emulsiona con Tween.
- 3) nell'esperimento con l'effetto volatile, i semi delle specie infestanti vengono posti in capsule Petri su carta da filtro inumidita con acqua, mentre una soluzione di olio essenziale viene applicata alla carta da filtro fissata sul lato superiore del coperchio. Nel controllo viene utilizzata solo acqua distillata.
- 4) nell'esperimento con contatto diretto, i semi delle specie in esame vengono posti in piastre di Petri su carta da filtro inumidita con una soluzione di oli essenziali. Nel



trattamento di controllo, i semi delle specie in esame vengono fatti germinare senza oli essenziali, utilizzando solo acqua distillata.

- 5) in entrambi i metodi, i semi vengono incubati a temperature alternate o costanti e in condizioni di luce/buio ottimali per la germinazione e la crescita di ciascuna specie di erbacce.
- 6) valutazione del potenziale erbicida di estratti vegetali e oli essenziali.

Per tutti i metodi citati, alla fine del periodo di incubazione, per determinare il potenziale erbicida si misurano i seguenti parametri: germinazione, lunghezza delle radici e dei germogli delle piantine e peso fresco e secco delle piantine.

- La percentuale di germinazione viene calcolata per ogni replica utilizzando la formula:
 - **G (germinazione) = (semi germinati/semi totali) × 100.**
- Il periodo di incubazione è diverso per ogni specie in esame e varia in media da 8 a 12 giorni.
- Tutti i dati raccolti sono stati analizzati statisticamente con l'ANOVA e le differenze tra le medie dei trattamenti dei parametri misurati per ciascuna specie infestante sono state testate con il test LSD a un livello di probabilità di 0,05.
- Gli estratti di piante e gli oli essenziali sono classificati in base al loro potenziale di inibizione, ossia alla percentuale di inibizione rispetto al trattamento di controllo. I materiali più promettenti vengono ulteriormente testati in esperimenti in serra.

Bibliografia

Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A, Varela RM, Simonet AM, Carrera C, Molinillo JMG. Allelopathy as new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological Sciences in Space* 2003; 17(1): 18-23.

Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2003; 22: 239-311.

Rice EL. *Allelopathy*. 2nd edition. Academic Press, Orlando, Florida, 1984.

Ravlić M, Baličević R, Nikolić M, Sarajlić A. Assessment of allelopathic potential of fennel, rue and sage on weed species hoary cress (*Lepidium draba*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2016; 44(1): 48-52.

Bhowmik PC, Inderjit. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection* 2003; 22: 661–671.



Fujii Y, Parvez SS, Parvez MM, Ohmae Y, Iida O. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biology and Management* 2003; 3(4): 233-241.

Amini S, Azizi M, Joharchi MR, Moradinezhad F. Evaluation of allelopathic activity of 68 medicinal and wild plant species of Iran by Sandwich method. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 2016; 3(2): 243-253.

Alam SM, Ala SA, Azmi AR, Khan MA, Ansari R. Allelopathy and its Role in Agriculture. *Journal of Biological Sciences* 2001; 1(5): 308-315.

Safdar ME, Tanveer A, Khaliq A, Naeem MS. Allelopathic action of parthenium and its rhizospheric soil on maize as influenced by growing conditions. *Planta Daninha* 2014; 32(2): 243–253.

Sarić-Krsmanović M, Gajić Umiljendić J, Radivojević LJ, Šantrić LJ, Potočnik I, Đurović-Pejčev R. Bio-herbicidal effects of five essential oils on germination and early seedling growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.). *Journal of Environmental Science and Health Part B* 2019; 54: 247-251.

Medina-Villar S, Uscola M, Pérez-Corona ME, Jacobs DF. Environmental stress under climate change reduces plant performance, yet increases allelopathic potential of an invasive shrub. *Biological Invasions* 2020; 22: 2859–2881

Appiah KS, Omari RA, Onwona-Agyeman S, Amoatey CA, Ofosu-Anim J, Smaoui A, et al. Seasonal Changes in the Plant Growth-Inhibitory Effects of Rosemary Leaves on Lettuce Seedlings. *Plants* 2022; 11: 673.

Ravlić M, Markulj Kulundžić A, Baličević R, Marković M, Viljevac Vuletić M, Kranjac D, Sarajlić A. Allelopathic Potential of Sunflower Genotypes at Different Growth Stages on Lettuce. *Applied Sciences* 2022; 12(24): 12568.

Norsworthy JK. Allelopathic potential of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Weed Technology* 2003; 17: 307-313.

Souza Filho APS, Guilhon GMSP, Zoghbi MGB, Cunha RL. Comparative analyses of the allelopathic potential of the hydroalcoholic extract and essential oil of "Cipo-d'alho" (Bignoniaceae) leaves. *Planta Daninha* 2009; 27(4): 647-653.

Silva CGV e, Oliveira JCS de, Camara CAG da. Insecticidal activity of the ethanolic extract from *Croton* species against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 2018; 71(2): 8543-8551.



Capitolo 3. L'uso delle piante officinali come ingredienti a valore aggiunto nell'industria dei prodotti funzionali di panetteria e pasticceria

3.1. Introduzione

Le piante aromatiche e medicinali comprendono un numero molto elevato di piante che appartengono a diverse famiglie botaniche e hanno un ciclo di vita annuale, biennale o pluriennale.

Piante medicinali:

sono stati utilizzati per migliaia di anni in cucina e sono poco costosi, facilmente disponibili e salutari

nei pasti sono considerati un'alternativa all'uso di sostanze chimiche di sintesi

sono utilizzati in diverse formulazioni medicinali per curare e prevenire le malattie

sono utilizzati nel settore alimentare come antiossidanti naturali per prevenire l'ossidazione dei lipidi

migliorano il valore nutrizionale degli alimenti e conferiscono gusto a una varietà di bevande

Le piante medicinali possono essere aggiunte come tali o sotto forma di estratti, oli essenziali nei prodotti da forno con le seguenti finalità:

- i. per migliorare le proprietà sensoriali dei prodotti
- ii. per un effetto antiossidante determinato dai principi attivi polifenolici
- iii. per un ruolo antimicrobico dovuto ai composti antimicotici e antibatterici biologicamente attivi presenti nelle piante medicinali

Le piante contengono composti fenolici, glucosinolati, glicosidi cianogenici, ossilipine e alcaloidi.

Gli alimenti ricchi di metaboliti secondari e composti bioattivi come flavonoidi, alcaloidi e altri sono raccomandati per il consumo dalle linee guida dietetiche per prevenire stress, ipertensione e malattie cardiovascolari [Rivera et al., 2010].

Il valore delle piante medicinali della famiglia delle Lamiaceae risiede nella produzione di un'ampia gamma di metaboliti secondari con potenti attività antibatteriche, antiossidanti, antinfiammatorie, antimicrobiche, antivirali e antitumorali [Carović-Stanko et al., 2016].

Nelle sezioni seguenti verranno presentati diversi esempi di piante medicinali utilizzate nei prodotti da forno per migliorare le proprietà sensoriali, ma anche per gli effetti antiossidanti e antimicotici.



3.2. Piante medicinali utilizzate per migliorare il gusto, il colore e l'aroma dei prodotti da forno

Le piante medicinali aggiunte in diverse forme di preparazione dell'impasto ne migliorano le proprietà sensoriali, avendo effetti positivi o negativi sulle proprietà reologiche (*Lavandula*, *Cichorium intybus*) (Figura 3.1).



Figura 3.1. *Cichorium intybus* and *Lavandula* – piante medicinali utilizzate nell'industria della panificazione.

Data l'ampia gamma di impieghi, vengono utilizzate tutto l'anno, fresche o secche.

La tendenza a utilizzare coloranti naturali a scapito di quelli artificiali e sintetici è sempre più diffusa tra i consumatori e alcune piante medicinali, grazie alle loro caratteristiche cromatiche, possono rappresentare alternative salutari ai coloranti chimici sintetici nell'industria alimentare, come di seguito riportato:

Menta - un'erba rinfrescante che può essere utilizzata in torte, biscotti, creme, glasse e cioccolatini. Il suo sapore rinfrescante e leggermente dolce è perfetto per i dessert. La menta piperita e la mentuccia sono le varietà più comuni utilizzate in pasticceria. Si abbina bene al cioccolato e a frutti come bacche e agrumi [Sik et al., 2023].

Basilico - un'erba dal sapore dolce e leggermente pepato che può essere utilizzata in prodotti da forno dolci come torte, cupcake e gelati, ma anche in prodotti da forno salati come focacce o pizza. Si abbina bene a frutti come fragole, pesche e lamponi [Calderón Bravo et al., 2021].

Lavanda - un'erba profumata che viene spesso utilizzata in dolci come biscotti, torte e gelati. Il suo sapore leggermente dolce aggiunge un colore viola unico ai prodotti da forno. Si abbina bene ai sapori degli agrumi e aggiunge un aroma unico ai prodotti da forno. s [Valková et al., 2021].



Co-funded by
the European Union



Coriandolo - una pianta molto utilizzata in pasticceria per aggiungere un sapore fresco e agrumato agli alimenti. Il coriandolo essiccato può anche essere aggiunto agli impasti, al pangrattato o utilizzato per condire dolci salati. Si abbina bene al cioccolato e può essere utilizzato per aggiungere un sapore unico a dolci, pane, cracker e biscotti [Sriti et al., 2019].

Timo - è un'erba che viene spesso utilizzata in piatti salati come pane, pizza e focacce, ma può essere utilizzata anche in prodotti da forno dolci come i biscotti di pasta frolla. Il suo sapore terroso e leggermente mentolato è un'ottima aggiunta ai prodotti da forno burrosi.

Salvia - ha un sapore leggermente amaro e terroso e viene spesso utilizzata in prodotti da forno salati come pane, biscotti e condimenti. Può essere utilizzata anche in prodotti da forno dolci come frolle e focaccine. [Bassiouny et al., 1990].

Rosmarino - erba legnosa e aromatica che può essere utilizzata in prodotti da forno dolci come pane e biscotti. Può anche aggiungere un sapore unico ai prodotti da forno, soprattutto pane, quiche e crostate. È sufficiente tritare alcune foglie di rosmarino fresco e mescolarle all'impasto del pane o della pasta prima della cottura [Valková et al., 2021].

Origano - un'erba aromatica che si presta bene per prodotti da forno salati come la crosta della pizza e la focaccia. Può essere tritato finemente e mescolato all'impasto o usato come guarnizione con sale e olio d'oliva.

TPA MUFFINS BIOFUNZIONALI a base di farina integrale, fiori di lavanda e radice di cicoria con elevate proprietà nutrizionali, basso indice glicemico, alto potenziale biologico ed economico, la cui tecnologia di produzione può essere implementata nelle unità di cottura. (Figura 3.2).



Figura 3.2. TPA MUFFINS BIOFUNZIONALI.



3.3. Piante medicinali come agenti antiossidanti nei prodotti da forno

L'aggiunta del 5% di estratti di *Camellia sinensis*, *Asparagus racemosus* e *Curcuma longa* (Figura 3.3) ha aumentato la capacità antiossidante del pane senza alterarne le proprietà sensoriali. Le proprietà antiossidanti della polvere di tè verde in sostituzione di alcune farine nei pan di Spagna sono state riportate anche da Sik et al. (2023).



Figura 3.3. *Camellia sinensis*, *Asparagus racemosus* and *Curcuma longa* – piante medicinali con proprietà antiossidanti.

Gli acidi gallico e tannico hanno influenzato le proprietà del glutine e hanno prodotto film più rigidi e spessi con una minore permeabilità al vapore.

Le sezioni seguenti comprendono diverse ricette di prodotti da forno con l'aggiunta di piante medicinali, offrendo una descrizione dettagliata degli ingredienti utilizzati e dell'aspetto del prodotto finale.

Pane con *Curcuma longa* L. (Figura 3.4)

Protocollo Step-by-step - Ingredienti

- o farina di pane bianco
- o sale
- o curcuma in polvere
- o lievito ad azione rapida
- o olio di oliva
- o acqua.



Co-funded by
the European Union



Figura 3.4. Aspetto del pane con curcuma.

Note!!!

- Curcuma (*Curcuma longa* L.) in polvere è stata utilizzata per sostituire lo 0%, il 2%, il 4%, il 6% e l'8% della farina di frumento per la preparazione di pane di frumento alla curcuma.
- L'assunzione giornaliera di 50 g o di due fette di pane alla curcuma con il 4% di farina di frumento in sostituzione della curcuma in polvere può fornire circa 4,6 mg di curcumina e 40,12 mg di GAE di composti fenolici totali che possono apportare ulteriori benefici alla salute dell'organismo umano [Lim et al., 2011].
- Non sono disponibili dati sull'esatto dosaggio raccomandato di queste sostanze fitochimiche, ma sono stati condotti diversi studi in vitro e in vivo per analizzarne gli effetti biologici.

Torta dietetica con gelatina di olivello spinoso (*Hippophae rhamnoides*) (Figura 3.5)

Protocollo Step-by-step - Ingredienti

- Farina integrale di grano duro
- Latte
- Lievito
- saccarasio
- Burro
- Uova
- Gelatina di olivello spinoso (*Hippophae rhamnoides*).



Co-funded by
the European Union



Figura 3.5. Torta dietetica con gelatina di olivello spinoso.

Pane con lievito madre alla salvia (Figura 3.6)

Protocollo Step-by-step - Ingredienti

- Acqua - 697 g (73%)
- Lievito - 191 g (20%)
- Farina totale - 955 g (100%)
- Farina di pane - 859 g (90%)
- Farina integrale di grano duro - 95 g (10%)
- Aglio arrostito - 29 g (3%)
- salvia - 10 g (1%)
- sale - 19 g (2%)
- Totale 1900 g (199%) [<https://vituperio.com/roasted-garlic-sage-sourdough-bread/>].



Co-funded by
the European Union



Figura 3.6. Pane con lievito madre alla salvia.

Pane di grano, segale e cicoria (Figura 3.7)

Protocollo Step-by-step - Ingredienti

- Farina - 275 g
- Farina di segale - 275 g
- Sale - 1.5 tsp.
- Zucchero - 1.5 tbsp
- Lievito - 1.5 tsp.
- Aceto - 1/2 tsp.
- Cicoria - 1.5 tbsp
- Cumino - 2 tsp.
- Acqua - 400...420 ml
- Olio vegetale - 3 tbsp.



Figura 3.7. Pane di grano, segale e cicoria.



Pane al dente di leone (Figure 3.8)

Protocollo Step-by-step - Ingredienti

- Petali di dente di leone - $\frac{1}{3}$ tazza
- Latte - 1 tazza
- Lievito secco attivo - 1 Cucchiaino da tavola
- Acqua calda - $\frac{1}{2}$ tazza
- Miele - $\frac{1}{4}$ tazza
- sale - 2 cucchiaino da tè
- Burro, ammorbidito - $\frac{1}{2}$ tazza
- Uova - 2
- Farina di grano tenero - 5 tazze.



Figura 3.8. pane al dente di leone.

Pane con origano (Figura 3.9)

Protocollo Step-by-step - Ingredienti

- Farina di grano tenero
- Lievito secco attivo o lievito fresco
- Zucchero
- Olio extra vergine di oliva
- Miele
- Sale marino
- Origano fresco [<https://thegreekfoodie.com/greek-bread-with-oregano-and-olive-oil/>].



Co-funded by
the European Union



Figura 3.9. Pane con origano.

Note!!!

- ❖ ❖ Sono state osservate variazioni nei parametri di panificazione quando i pani sono stati preparati incorporando l'origano secco all'1, 2, 3 e 4% nella farina [Dhillon and Kaur Amarjeet, 2013]
- ❖ Il volume specifico (4,72 cc/g) è stato il migliore al livello dell'1% ed è sceso a 4,22 cc/g al livello del 4% di origano nella miscela.
- ❖ L'origano ha anche aumentato il peso della pagnotta da 145 g al livello dell'1% a 149 g al livello del 4% di origano nel pane.
- ❖ Al livello del 2% di origano, l'assorbimento di acqua è stato del 72,24% ed è aumentato al 75% al livello del 4%.
- ❖ Questo ha dimostrato che l'aumento del livello di origano ha un effetto negativo sul volume specifico del pane.

Panini al timo (*Satureja hortensis* L.) (Figura 3.10)

Protocollo Step-by-step - Ingredienti

- Farina integrale - 4 tazze (512 g)
- Sale - 2 cucchiaini (10 g)
- Zucchero - 2 cucchiaini (8 g)
- Lievito secco - 2 cucchiaini da tè (8 g)
- ● foglie di timo fresco tritate - 2 cucchiaini da tavola
- acqua - 2 tazze (454 g)

[https://www.sidechef.com/recipes/8333/no_knead_thyme_dinner_rolls/].



Co-funded by
the European Union



Figura 3.10. Panini al timo.

Note!!!

- ❖ L'aggiunta di timo aromatico (sia di sostanza secca che di olio essenziale) nella ricetta del pane ha determinato un'attività antimicotica sia contro *Penicillium* che contro *Aspergillus*.
- ❖ L'aggiunta di timo non ha mostrato alcun deterioramento fungino o batterico per quattro giorni, indicando il suo potenziale come conservante del pane [Skendi et al., 2020].
- ❖ L'incorporazione delle piante aromatiche nella loro forma secca in vitro può portare ad un effetto antimicotico nei prodotti da forno [Skendi et al., 2020].

Involtini al rosmarino

Protocollo Step-by-step– Ingredienti (Figura 3.11)

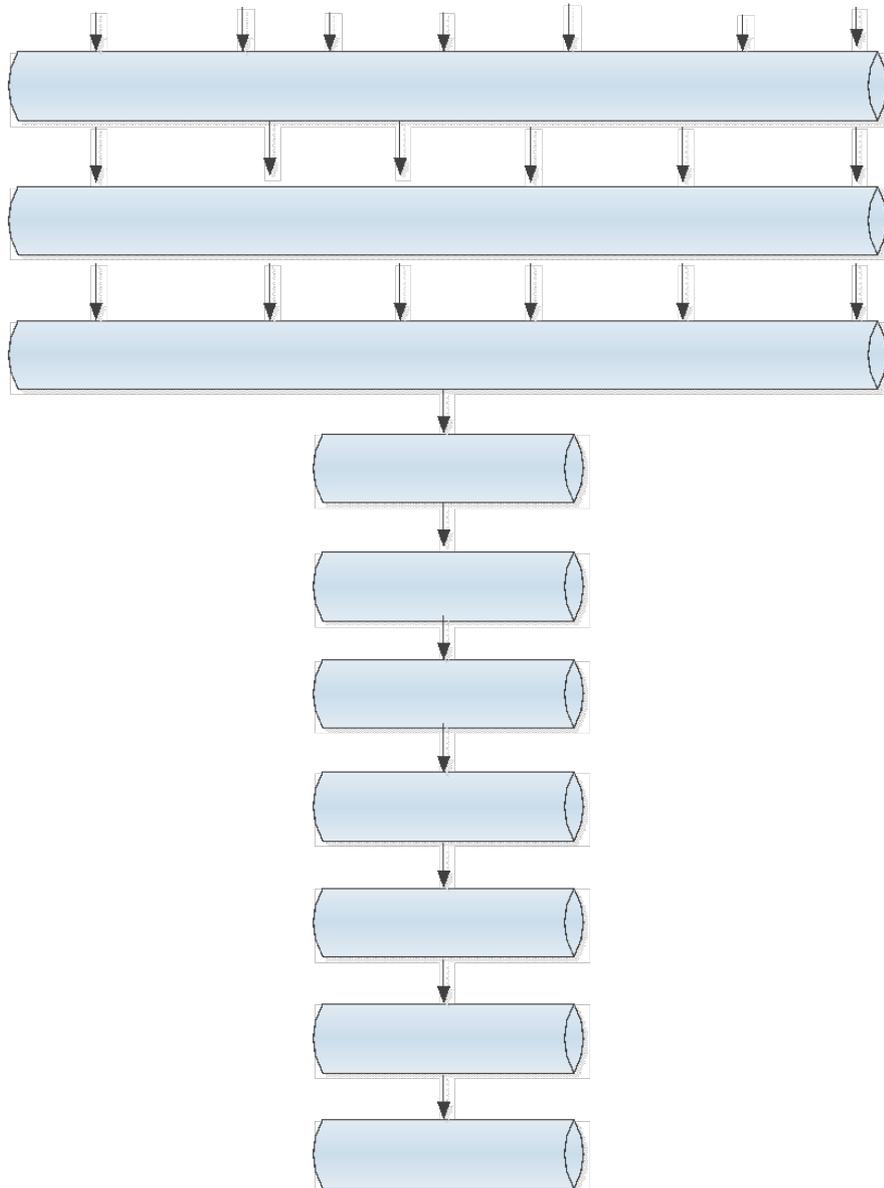


Figura 3.11. Protocollo schematico della preparazione dei rotoli di rosmarino
[<https://www.gimmesomeoven.com/one-hour-rosemary-garlic-dinner-rolls/>].



Co-funded by
the European Union



Figur 3.12. Involtini al rosmarino.

Muffin alla menta (Figura 3.13)

Protocollo Step-by-step– Ingredienti

- Spinaci freschi - 2 tazze
- Olio di cocco, sciolto - 1/2 tazza
- Salsa di mele - 1 tazza
- estratto di menta - 1 cucchiaino
- uova (o uova di lino) - 2
- farina d'avena - 1 3/4 di tazza
- lievito in polvere - 1 1/2 cucchiaino
- bicarbonato di sodio - 1/2 cucchiaino
- sale - 1/2 cucchiaino
- Gocce di cioccolato - 1 tazza [<https://www.milehighmitts.com/mint-chocolate-chip-oat-muffins-naturally-colored-gluten-free-dairy-free-sugar-free-option-vegan-option/>].



Figura 3.13. Muffin alla menta.



Co-funded by
the European Union



Pane dolce alla lavanda (Figura 3.14)

Protocollo Step-by-step– Ingredienti

- Latte - 3/4 di tazza
- fiori di lavanda essiccati tritati - 2 cucchiaini.
- farina di frumento - 2 tazze
- lievito in polvere - 1 cucchiaino e mezzo.
- sale - 1/4 di cucchiaino
- burro ammorbidito - 6 cucchiaini.
- zucchero - 1 tazza
- Uova - 2
- Glassa semplice
- Zucchero a velo - 1 tazza
- Estratto di vaniglia - 1/2 cucchiaino
- Succo di limone - 1/2 cucchiaino
- Latte - 1 cucchiaino e mezzo [<https://www.aliikulalavender.com/lavender-tea-bread/>].



Figura 3.14. Pane dolce alla lavanda.

Biscotti con chiodi di garofano

Protocollo Step-by-step– Ingredienti (Figura 3.15)

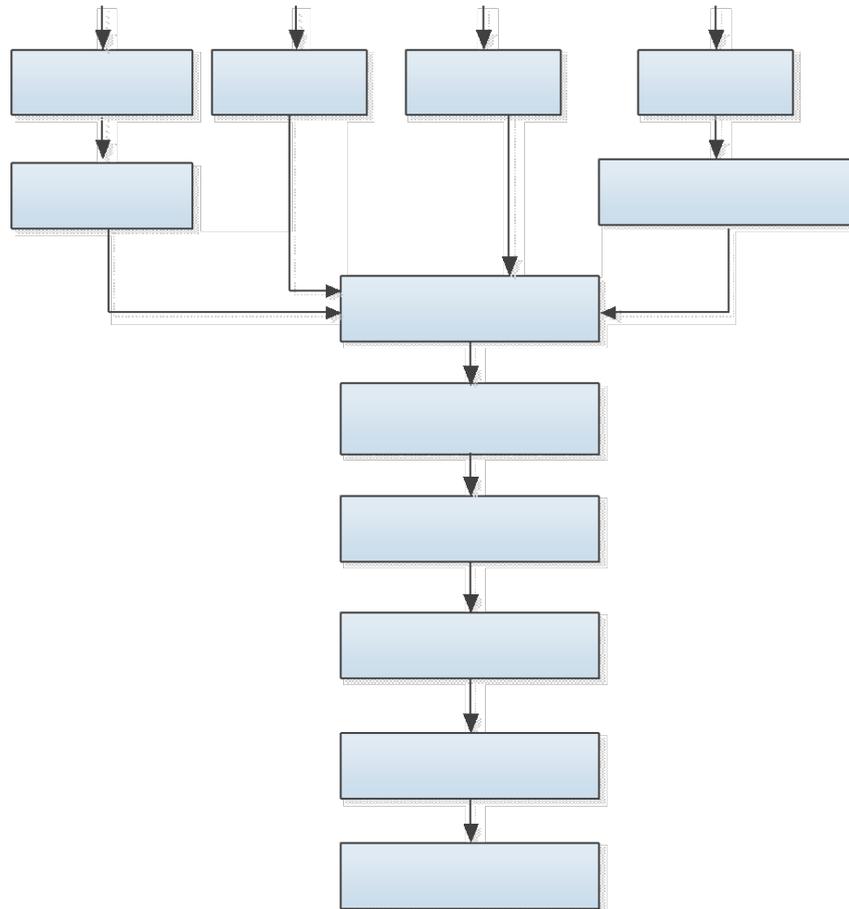


Figura 3.15. Protocollo schematico di preparazione dei biscotti con chiodi di garofano
[<https://www.bbcgoodfood.com/recipes/clove-sugar-cookies>].

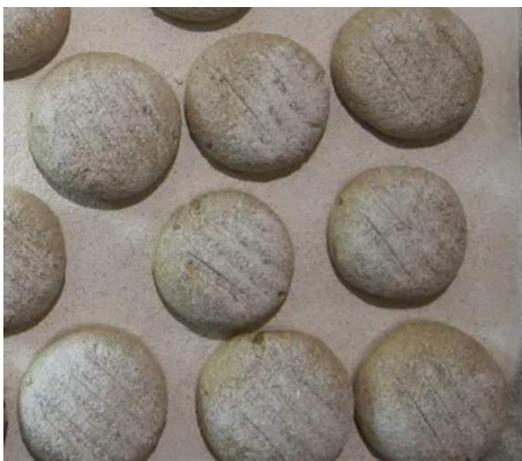


Figura 3.16. Biscotti con chiodi di garofano.



3.4. Piante medicinali come agenti antimicrobici nei prodotti da forno

Le piante officinali sono utilizzate nell'industria della panificazione come spezie, per migliorare le proprietà gustative e aromatiche dei prodotti, ma anche come agenti antimicrobici contro i microrganismi nocivi nei prodotti da forno. Il pane e i prodotti da forno sono soggetti al deterioramento da muffa (dopo pochi giorni di conservazione) e per evitare questo fenomeno sono necessari conservanti alimentari o imballaggi in atmosfera modificata.

Le specie di muffe più frequenti nei prodotti da forno sono: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Neurospora* e *Mucor*, anche se il *Penicillium* è stato identificato come la fonte più comune di deterioramento del pane.

Diversi tipi di oli essenziali, in particolare quelli appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae e delle Umbrellifere, sono indicati come agenti antimicrobici nell'industria dei prodotti da forno, con conseguente prolungamento della durata di conservazione e maggiore sicurezza del prodotto.

La durata di conservazione dei prodotti da forno conservati a temperatura ambiente è limitata a 3-4 giorni ed è influenzata dal deterioramento microbico dovuto a muffe, principalmente *Penicillium* sp. e altri funghi (*Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* o *Rhizopus*). Grazie alla sua composizione chimica, l'*Origanum vulgare* contribuisce a prolungare la durata di conservazione e le qualità nutrizionali di molti prodotti, come pane e prodotti da forno, cereali.

Due elementi antifungini presenti negli oli essenziali, il carvacrolo e l'eugenolo, possono essere considerati potenti agenti antifungini. Gli oli essenziali hanno proprietà antimicotiche. Gli oli di timo, cannella e chiodi di garofano sono noti per inibire i funghi di deterioramento, mentre gli oli di arancio, salvia e rosmarino hanno un effetto trascurabile (Figure 3.17).



Co-funded by
the European Union



Figura 3.17. Timo, cannella e chiodi di garofano utilizzati nei prodotti da forno.

Il rischio per la salute umana è dato dal fatto che la contaminazione con i funghi causa la produzione di micotossine con effetti epatotossici e cancerogeni.

Le micotossine sono metaboliti secondari dei funghi che inducono effetti tossici acuti e cronici nell'uomo e negli animali. La contaminazione concomitante di prodotti a base di cereali da parte di micotossine multiple è stata segnalata sempre più spesso, anche in alimenti comunemente consumati dai bambini.

I gruppi più importanti di micotossine sono:

- Aflatossine (AFLA)
- Ocratossina A (OTA)
- Tricoteceni (deossinivalenolo DON, nivalenolo)
- Zearalenone (ZEA)
- Fumonisine (FUMO)

Le micotossine si trovano nel pane, nei cereali da colazione e nei prodotti di pasticceria.

- La lavorazione può solo ridurre il numero di micotossine, non la loro totale eliminazione.



Co-funded by
the European Union



- È stato dimostrato che alcune piante tradizionalmente utilizzate hanno proprietà fungino-tossiche.
- Piante medicinali come: *Occimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus*, *Xylopia aethiopica*, *Monodera myristica*, *Sizygium aromaticum*, *Cinnamomum verum* e *Piper nigrum* sono efficaci nell'inibire la formazione di acido non-sorbico, un precursore nel processo di sintesi delle aflatossine.
- I preparati naturali di emulsioni a base di oli essenziali sono stati utilizzati come agenti antimicotici in pasticceria.
- Sono necessari ulteriori studi per lo sviluppo di strategie comuni per il controllo e la prevenzione dello sviluppo di funghi e micotossine nei prodotti da forno e di pasticceria.

3.5. L'attività delle piante medicinali contro i batteri patogeni prevalenti nell'industria alimentare

La prevenzione del deterioramento degli alimenti e della comparsa di agenti patogeni che causano intossicazioni alimentari è solitamente ottenuta attraverso l'uso di additivi chimici che hanno una serie di effetti negativi, tra cui: i rischi per la salute umana dei composti chimici, la comparsa di residui chimici nella catena alimentare e dei mangimi e l'acquisizione di resistenza microbica ai prodotti chimici utilizzati.

A causa di queste preoccupazioni, è più importante che mai trovare un'alternativa naturale, sana e sicura ai conservanti. Da tempo gli estratti vegetali vengono utilizzati per prevenire le intossicazioni alimentari e conservare gli alimenti.

Tra le sfide che i produttori di pane devono affrontare vi è quella di prolungare la durata di conservazione riducendo l'irrancidimento e diminuendo il deterioramento microbico, poiché questi cambiamenti portano al deterioramento del pane e di altri prodotti da forno. Per superare queste difficoltà e aumentare la durata di conservazione, vengono utilizzati antiossidanti e conservanti chimici disponibili in commercio, come gli inibitori di muffa.

Una serie di oli essenziali può bloccare lo sviluppo di germi pericolosi nei prodotti da forno, prolungandone la durata di conservazione e migliorandone la sicurezza, come timo, cannella, origano, citronella, ecc.

La maggior parte delle parti commestibili delle piante medicinali contiene tracce di acidi idrossibenzoici e idrossicinnamici, due tipi di acidi fenolici che agiscono come difensori delle piante.



Co-funded by
the European Union



Grazie al loro potenziale come conservanti alimentari naturali, agenti aromatizzanti e decontaminanti, gli oli essenziali delle piante stanno suscitando grande interesse nell'industria alimentare, essendo anche generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) (Figura 3.18).



Figura 3.18. Acidi idrossibenzoici e idrossicinnamici.

Bibliografia

Rivera G, Bocanegra-García V, Monge A. Traditional plants as source of functional foods: a review Plantas tradicionales como fuente de alimentos funcionales: una revisión. *CyTA - J. Food* 2010; 8:159–167.

Carović-Stanko K, Petek M, Grdiša M, Pintar J, Bedeković D, Herak Ćustić M, Satovic Z. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods - a review. *Czech J. Food Sci* 2016; 34(5):377-390.

Sik B, Kovács K, Lakatos E, Kapcsándi V, Székelyhidi R. Increasing the functionality of sponge cakes by mint, and cocoa powder addition. *Heliyon*. 2023; 9(9): e20029.

Calderón Bravo H, Vera Céspedes N, Zura-Bravo L, Muñoz LA. Basil Seeds as a Novel Food, Source of Nutrients and Functional Ingredients with Beneficial Properties: A Review. *Foods* 2021; 10(7):1467

Valková V, Ďúranová H, Galovičová L, Vukovic NL, Vukic M, Kačániová M. In Vitro Antimicrobial Activity of Lavender, Mint, and Rosemary Essential Oils and the Effect of Their Vapours on Growth of *Penicillium* spp. in a Bread Model System. *Molecules* 2021; 26(13):3859.

Sriti J, Bettaieb I, Bachrouch O, Talou T, Marzouk B. Chemical composition and antioxidant activity of the coriander cake obtained by extrusion. *Arabian Journal of Chemistry* 2019; 12(7): 1765-1773.



Co-funded by
the European Union



Bassiouny SS, Hassanien FR, Abd El-Razik Ali F, El-Kayati Sohair M. Efficiency of antioxidants from natural sources in bakery products. *Food Chemistry* 1990; 37 (4): 297-305.

Lim HS, Park SH, Ghafoor K, Hwang SY, Park J, Quality and antioxidant properties of bread containing turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivated in South Korea. *Food Chemistry* 2011; 124(4):1577-1582.

***<https://vituperio.com/roasted-garlic-sage-sourdough-bread/>

***<https://thegreekfoodie.com/greek-bread-with-oregano-and-olive-oil/>

Dhillon G, Kaur Amarjeet. Effect of Oregano Herb on Dough Rheology and Bread Quality. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* 2013; 40-44.

***https://www.sidechef.com/recipes/8333/no_knead_thyme_dinner_rolls/

Skendi A, Katsantonis DN, Chatzopoulou P, Irakli M, Papageorgiou M. Antifungal Activity of Aromatic Plants of the Lamiaceae Family in Bread. *Foods*. 2020; 9(11):1642.

***<https://www.gimmesomeoven.com/one-hour-rosemary-garlic-dinner-rolls/>

***<https://www.milehighmitts.com/mint-chocolate-chip-oat-muffins-naturally-colored-gluten-free-dairy-free-sugar-free-option-vegan-option/>

***<https://www.aliikulalavender.com/lavender-tea-bread/>

***<https://www.bbcgoodfood.com/recipes/clove-sugar-cookies>

***<https://www.swissbake.in/blog/unlocking-the-potential-role-of-herbs-in-professional-baking>



Capitolo 4. Tendenze e metodi attuali per la valutazione in vitro dell'attività biologica (CO - UMFVBT)

4.1. Introduzione

I saggi *in vitro* basati su cellule rappresentano il primo passo della ricerca preclinica e vengono applicati come strumento chiave nello screening dell'attività biologica di nuovi candidati farmaci. Inoltre, gli studi *in vitro* offrono dati rilevanti sul loro potenziale meccanismo d'azione (vie di segnalazione) e sulla loro tossicità. Sono stati indicati altri vantaggi legati all'uso di linee cellulari come modelli *in vitro*, come i seguenti: (i) comportano metodi efficaci in termini di tempo e di costi, (ii) sono modelli "controllabili" (soprattutto nel caso delle colture monostrate) e (iii) in letteratura sono disponibili più tecniche standardizzate. [Capula et al., 2019].

Oltre ai vantaggi dell'utilizzo di modelli *in vitro* e di saggi basati su cellule, sono stati identificati diversi fattori che potrebbero influenzare i risultati, portando a dati inaffidabili, per cui è necessario considerare alcuni principi di base quando si progettano e si eseguono esperimenti *in vitro* [Capula et al., 2019], come:

1) Selezione di un'appropriata linea cellulare

Prima di progettare un esperimento *in vitro*, è obbligatorio selezionare il tipo di linee cellulari considerate modelli idonei per lo scopo della ricerca.

Le linee cellulari possono essere ottenute: (i) internamente (richiedono l'autenticazione, informazioni cliniche dettagliate e la designazione esplicita delle cellule), (ii) tramite l'acquisizione da altri laboratori (richiedono la quarantena, l'autenticazione e la caratterizzazione per confermare le loro caratteristiche specifiche) o (iii) tramite l'acquisto da banche cellulari approvate (includono i dati di autenticazione, i risultati dei test per la contaminazione da microrganismi e le informazioni sul metodo di conservazione e subcultura delle linee cellulari) [Geraghty et al., 2014].

Critico!!! Tutte le linee cellulari utilizzate negli esperimenti devono essere autenticate e prive di contaminanti!!!

Collezioni di colture cellulari/banche di cellule riconosciute: American Type Culture Collection (ATCC) (www.atcc.org); CellBank Australia (www.cellbankaustralia.com); Coriell Cell Repository (<http://ccr.coriell.org>); Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (www.dsmz.de); European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) (www.phe-culturecollections.org.uk); National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) (<https://cellbank.nibiohn.go.jp/english>); NIH Stem Cell Unit (<https://stemcells.nih.gov/NIH->



Co-funded by
the European Union



Stem-Cell-Research); RIKEN Gene Bank (<https://web.brc.riken.jp/en/>), UK Stem Cell Bank (UKSCB) (<https://nibsc.org/ukstemcellbank>); WiCell (www.wicell.org) [Geraghty et al., 2014].

Tipi di colture cellulari e linee cellulari:

Coltura cellulare è un termine utilizzato per descrivere il mantenimento o la coltivazione di cellule in vitro, compresa la coltura di singole cellule. Le colture cellulari possono essere

- *colture primarie* - sono ottenute direttamente da tessuti e colture espantate o come coltura di espanto o dopo la scissione in una sospensione monocellulare tramite digestione enzimatica
- *colture continue* - sono formate da un singolo tipo di cellula che può essere espansa sequenzialmente in coltura per un numero limitato di divisioni cellulari o indefinitamente.

Una linea cellulare ha origine da una coltura primaria ed è il risultato della prima sottocultura riuscita. Le linee cellulari possono essere classificate come:

- *cellule primarie* - sono ottenute direttamente dal tessuto umano e sono dette "finite" poiché la loro proliferazione si arresta dopo un numero limitato di divisioni cellulari
- *cellule trasformate* – possono essere sviluppate naturalmente o mediante manipolazione genetica e sono anche conosciute come linee cellulari immortalizzate
- *cellule autorinnovanti* – hanno la capacità di differenziarsi in una varietà di altri tipi cellulari; esempi di questo tipo di cellule: cellule staminali embrionali, cellule staminali neurali e intestinali, cellule staminali pluripotenti indotte [Segeritz and Vallier, 2017; Coecke et al., 2005].

2) Selezione di un solvente appropriato per i composti in esame:

- un solvente inadeguato potrebbe compromettere la stabilità del farmaco determinando una determinazione errata della concentrazione
- il solvente scelto non deve essere tossico per le cellule alla concentrazione finale utilizzata [Capula et al., 2019]

3) Concentrazione farmacologica dei composti in esame

- quando si esegue uno screening di nuovi composti dovrebbe essere testato un ampio intervallo di concentrazioni, seguito da un intervallo ristretto dopo che è stata identificata la concentrazione che ha innescato una risposta [Capula et al., 2019].

4) Esposizione al farmaco/durata del trattamento



Co-funded by
the European Union



- la durata del trattamento in vitro deve corrispondere alla situazione in vivo
- va inoltre tenuto conto del metabolismo del farmaco testato [Capula et al., 2019]

5) Densità di semina e tempistica del saggio – dipende dalla linea cellulare [Capula et al., 2019].

Prima di iniziare a lavorare con le linee cellulari, si consiglia di conoscere i seguenti aspetti fondamentali:

- ❖ Le linee cellulari comprendono cellule che hanno la capacità di proliferare per lunghi periodi in vitro e possono essere conservate mediante sottocolture seriali (passaggio)
- ❖ *linee cellulari finite* possono essere sotto-coltivate più volte, ma dopo un certo numero di passaggi (60-70 raddoppiamenti della popolazione cellulare) raggiungono lo stato di senescenza e cessano di replicarsi; possono mantenersi ben caratterizzati ma possono verificarsi cambiamenti nella loro morfologia man mano che si avvicinano alla senescenza
- ❖ *le linee cellulari continue* possono essere sottocoltivate indefinitamente; derivano da tumori o tessuti embrionali normali; mostrano un'elevata stabilità nei passaggi a lungo termine in vitro, tuttavia possono subire cambiamenti considerevoli e irreversibili [Coecke et al., 2005].

Note!!! Si raccomanda che tutti i tipi di linee cellulari dispongano di stock crioconservati di cellule a passaggio precoce!!!

- ❖ Le fasi di crescita delle cellule normali sono:
 - **fase di ritardo** – è la fase successiva alla semina in cui le cellule non si dividono ma si adattano solo alle condizioni di coltura; dipende dalla fase di crescita della linea cellulare al momento del passaggio e dalla densità di semina
 - **fase logaritmica (log) o di crescita esponenziale** – è caratterizzato da una crescita esponenziale delle cellule che si mantiene fino a quando l'intera piastra è occupata o la concentrazione di cellule supera la capacità del mezzo di crescita; la popolazione cellulare è considerata la più vitale in questo momento; è la fase appropriata per valutare le funzioni cellulari e determinare il tempo di raddoppio della popolazione; si consiglia inoltre di eseguire la procedura di subcoltura (eseguire il passaggio troppo tardi potrebbe portare a sovraffollamento delle cellule, apoptosi e senescenza)



- **plateau o fase stazionaria** – la popolazione cellulare diventa confluenta e la proliferazione rallenta; è la fase in cui le cellule sono più suscettibili alle lesioni
 - **fase di declino** – è caratterizzato da un aumento della morte cellulare e da una riduzione del numero di cellule vitali dovuta alla naturale progressione del ciclo cellulare.
- ❖ l'età in vitro di una coltura cellulare può essere definita da:
- **numeri di passaggi** – il numero di volte in cui una linea cellulare è stata sottoposta a subcoltura/trasmissione
 - **tempo di raddoppio della popolazione (DT)** – il tempo necessario ad una coltura per raddoppiare il proprio numero

$$DT = T \ln 2 / \ln(X_e / X_b)$$

Dove T è il tempo di incubazione in qualsiasi unità

X_b è il numero di cellule all'inizio del tempo di incubazione

X_e è il numero di cellule alla fine del tempo di incubazione [ATCC - Animal Cell Culture Guide].

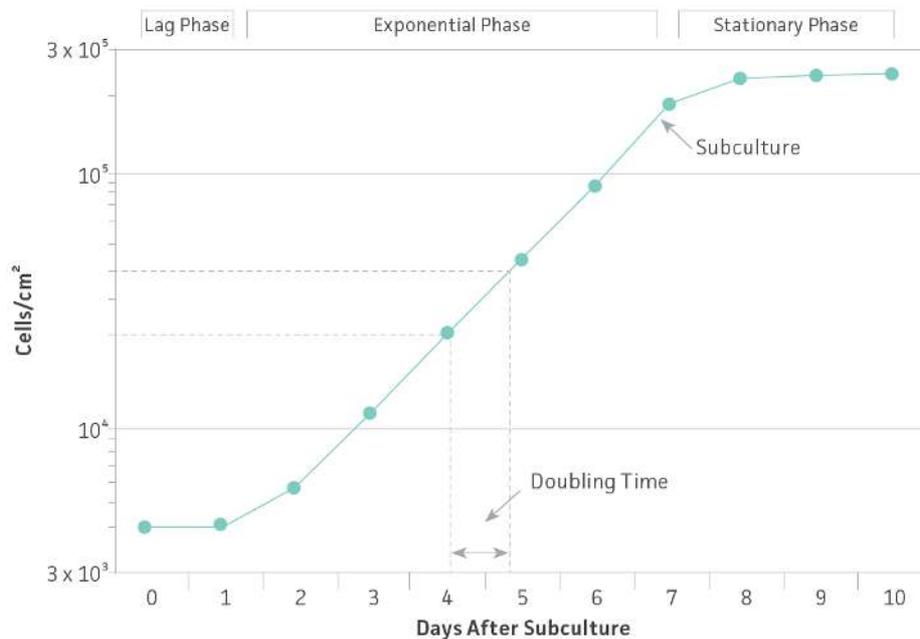


Figura 4.1. Esempio di una curva di crescita per cellule in coltura. Si consiglia di eseguire la procedura di subcoltura quando le cellule sono nella fase logaritmica (esponenziale) di crescita [ATCC - Animal Cell Culture Guide].

Nelle sezioni seguenti verranno fornite diverse linee guida riguardanti le fasi coinvolte nella preparazione di una linea cellulare per saggi cellulari 2D dal momento della ricezione del



criviale dalla banca cellulare fino all'aggiunta dei composti di prova. **Il protocollo si riferisce a cellule aderenti di mammifero coltivate in monostrato.**

4.2. Preparazione di una linea cellulare per saggi cellulari

4.2.1. Regole generali per la sicurezza nei laboratori di colture cellulari

- ❖ *Il lavoro in laboratorio deve essere eseguito solo da personale addestrato*
- ❖ *Il personale deve sempre indossare dispositivi di protezione individuale (camici e camici da laboratorio, berretti, copriscarpe, guanti, occhiali di sicurezza) quando entra nel laboratorio e rimuoverli quando esce*
- ❖ *Si sconsiglia l'esposizione della pelle con scarpe aperte, pantaloni corti e gonne.*
- ❖ *Nel laboratorio di colture cellulari è vietato consumare cibi, bevande, conservare generi alimentari, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto.*
- ❖ *I telefoni cellulari non devono essere utilizzati mentre si lavora nel laboratorio di colture cellulari.*
- ❖ *Gli indumenti larghi (ad esempio scarpe, collane pendenti) devono essere rimossi prima di iniziare il lavoro e i capelli devono essere legati indietro.*
- ❖ *Tutte le superfici di lavoro devono essere decontaminate prima e dopo gli esperimenti e immediatamente dopo qualsiasi fuoriuscita o spruzzo di materiale potenzialmente infetto con un disinfettante appropriato. Le attrezzature di laboratorio devono essere pulite regolarmente, anche se non contaminate*
- ❖ *Tutti gli articoli di laboratorio che sono entrati in contatto con agenti potenzialmente infettivi o pericolosi devono essere decontaminati prima e dopo aver lavorato con essi.*
- ❖ *Le superfici di lavoro devono essere accuratamente disinfettate con etanolo (EtOH) al 70% prima e dopo l'uso.*
- ❖ *Per la manipolazione sterile, le mani e le aree di lavoro devono essere sempre pulite con EtOH al 70% e tutte le beute esterne, i flaconi di terreni, le piastre o altri contenitori devono essere puliti con EtOH al 70% prima di introdurli nella cappa per coltura cellulare.*



- ❖ I terreni di crescita cellulare e altri reagenti non devono essere versati direttamente da bottiglie o fiaschi per evitare la contaminazione; utilizzare pipette sierologiche sterili.
- ❖ Le mani devono essere lavate prima di lasciare il laboratorio di colture cellulari.
- ❖ Il responsabile della sicurezza del laboratorio dovrebbe essere informato in caso di esposizione o fuoriuscita di agenti infettivi o pericolosi per consigliare una strategia adeguata di contenimento e decontaminazione [Segeritz and Vallier, 2017; Gibco Cell Culture Basics; ATCC - Animal Cell Culture Guide; ECACC Handbook].

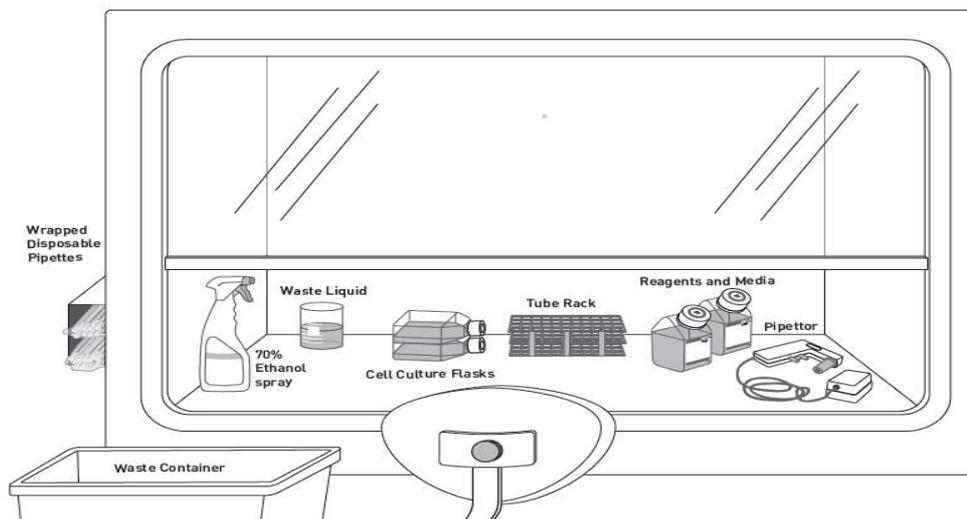


Figura 4.2. Esempio di layout organizzativo di una cappa per coltura cellulare [Gibco Cell Culture Basics].

4.2.2. Tabella delle risorse chiave per scongelare/sottocoltura/crioconservare una linea cellulare

Tabella 1. Materiali e attrezzature necessari per le fasi di scongelamento/sottocoltura e crioconservazione delle colture cellulari

Linea cellulare	Produttore
<ul style="list-style-type: none"> • Linea cellular testata 	<ul style="list-style-type: none"> • American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, US • The European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC), Salisbury, UK • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA



Reagenti/prodotti chimici	Produttore
<ul style="list-style-type: none">Mezzo di crescita della coltura cellulare (specifico per ciascuna linea cellulare)	<ul style="list-style-type: none">American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USThe European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC), Salisbury, UKThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAPAN-Biotech GmbH, Bayern, Germany
<ul style="list-style-type: none">Fetal bovine serum (FBS/FCS)	<ul style="list-style-type: none">ATCC, Manassas, USThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAPAN-Biotech GmbH, Bayern, Germany
<ul style="list-style-type: none">Integratori specifici per la crescita cellulare (a seconda della linea cellulare)	<ul style="list-style-type: none">ATCC, Manassas, USThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAMerck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none">Soluzione antibiotica per coltura cellulare (a seconda della linea cellulare)	<ul style="list-style-type: none">ATCC, Manassas, USThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAMerck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none">Trypsin/EDTA (TE) soluzione	<ul style="list-style-type: none">ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAMerck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none">Trypan blue soluzione 0.4%	<ul style="list-style-type: none">ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAMerck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none">Ethanol 70% (per la disinfezione)	<ul style="list-style-type: none">Chimopar SA, Bucharest, RomaniaThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAMerck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none">Phosphate buffered saline (PBS), pH=7.4 for cell culture	<ul style="list-style-type: none">ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAMerck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none">Dimethyl sulfoxide (DMSO)	<ul style="list-style-type: none">ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USAMerck KGaA, Darmstadt, Germany



Co-funded by
the European Union



<ul style="list-style-type: none"> • H₂O (pyrogen free) 	<ul style="list-style-type: none"> • Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
---	---

*** Note: È possibile utilizzare anche reagenti/prodotti chimici equivalenti di altri fornitori.**

Consumabili	Produttore
<ul style="list-style-type: none"> • Cell culture flask (75 cm²) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Cell culture flask (25 cm²) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • 96-well plates (flat bottom) (Eppendorf, Cyto-one) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany • Starlab Schweiz AG, Switzerland • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuge Falcon tubes (15 mL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuge Falcon tubes (50 mL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf tubes (1.5 mL, 2 mL, 5 mL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Tube racks 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Cryovials (2 mL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Pipettes tips 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Sterile serological pipettes (10 mL, 25 mL) 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg, Germany • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Sterile Pasteur pipettes 	<ul style="list-style-type: none"> • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA • Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Reagent reservoirs for multichannel pipetted 	<ul style="list-style-type: none"> • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA • Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Countess™ Cell Counting Chamber Slides 	<ul style="list-style-type: none"> • ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Glass Neubauer Counting Chamber Slides 	<ul style="list-style-type: none"> • Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Cell counter 	<ul style="list-style-type: none"> • Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Waste containers 	
<ul style="list-style-type: none"> • Permanent marker 	



Co-funded by
the European Union



<ul style="list-style-type: none"> ● Pencil 	
<ul style="list-style-type: none"> ● Guanti sterili in nitrile 	
<ul style="list-style-type: none"> ● Guanti per la manipolazione dell'azoto liquido 	
<ul style="list-style-type: none"> ● Dispositivi di protezione individuale da laboratorio (camice e camici da laboratorio, berretto, copriscarpe, visiere, occhiali o occhiali di sicurezza) 	

*** Note: È possibile utilizzare anche materiali di consumo equivalenti di altri fornitori. Tutti i materiali di consumo devono essere sterili quando vengono utilizzati per la coltura cellulare.**

Attrezzatura/Denominazione	Produttore
<ul style="list-style-type: none"> ● Cabina di sicurezza microbiologica (Microflow ABS Class II Cabinet ABS 1500 CLS2-MK2) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Bioquell UK LTD
<ul style="list-style-type: none"> ● Incubatoer per colture cellular (Binder CB-170) 	<ul style="list-style-type: none"> ● BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
<ul style="list-style-type: none"> ● Microscopio invertito a contrasto di fase con fluorescenza (Olympus IX73 and Cytation 1) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Olympus, Tokyo, Japan ● BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
<ul style="list-style-type: none"> ● Bagnetto (Raypa) 	<ul style="list-style-type: none"> ● R. Espinar, S.L., Spain
<ul style="list-style-type: none"> ● Centrifuga (Boeco S-8) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Boeco, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> ● Centrifuga con modulo di congelamento (Hermle Centrifuge Z 326 K) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany
<ul style="list-style-type: none"> ● Refrigeratore (4°C) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Arctic, Romania
<ul style="list-style-type: none"> ● Freezer (-20°C) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Arctic, Romania
<ul style="list-style-type: none"> ● Freezer (-80°C) (Ultra Low Temperature Freezer MDF-U3386S) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Sanyo, Osaka, Japan
<ul style="list-style-type: none"> ● Nitrogen tank (MVE Cryosystem 750) 	<ul style="list-style-type: none"> ● MVE Biological Solutions, GA 30107
<ul style="list-style-type: none"> ● Cell counting chamber (Neubauer chamber) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Neubauer Hemacytometer
<ul style="list-style-type: none"> ● Automatic cell counter (Countess II FL Automated Cell Counter) 	<ul style="list-style-type: none"> ● ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> ● Pipette with adjustable volume 	<ul style="list-style-type: none"> ● Eppendorf, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> ● Multichannel pipette 	<ul style="list-style-type: none"> ● Eppendorf, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> ● Pipetting aid (Easypet® 3) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Eppendorf, Hamburg, Germany
<ul style="list-style-type: none"> ● Analytical scale (Sartorius CP 324S) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Sartorius, Göttingen, Germany



Co-funded by
the European Union



<ul style="list-style-type: none">• Mr. Frosty freezing container	<ul style="list-style-type: none">• ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none">• Autoclave (Pol-EKO SLW 53)	<ul style="list-style-type: none">• POL-EKO®, Wodzisław Śląski, Poland

* **Note:** È possibile utilizzare anche apparecchiature equivalenti di altri fornitori.

4.2.3. Dettagli metodo Step-by-step

Note generali!!! Per ogni linea cellulare acquisita dovrà essere seguito il protocollo consigliato dal produttore!!! Tutte le soluzioni e le attrezzature che entrano in contatto con le cellule devono essere sterili!!! Salvo diversa indicazione, tutte le procedure devono essere condotte in condizioni di flusso laminare sterile, le cellule devono essere conservate in incubatori umidificati a 37°C, 5% di CO₂ e 95% di umidità e il terreno di crescita completo deve essere preriscaldato nel bagnomaria a 37°C per 30 min!!! Tutti gli oggetti che verranno introdotti nella cappa a flusso laminare devono essere puliti con EtOH al 70%!!! Durante tutte le fasi del protocollo il personale dovrà indossare i dispositivi di protezione individuale!!!

A. Prima guida alla coltura - Procedura di scongelamento delle cellule congelate al ricevimento

🕒 **Durata 30 min – 1 h**

- 1) preparare il terreno di crescita completo specifico per la linea cellulare secondo la scheda tecnica e preriscaldarlo a bagnomaria a 37°C (!!! Il terreno viene preparato in condizioni asettiche sotto cappa a flusso laminare!!!)
- 2) posizionare una provetta da centrifuga sterile (provetta Falcon da 15 mL) nella cappa a flusso laminare e aggiungere 10 mL di mezzo di crescita completo caldo nella provetta (!!! Scrivere sulla provetta con un pennarello indelebile il nome della linea cellulare!!!)
- 3) preparare un'appropriata fiasca sterile per coltura cellulare (25 cm²) aggiungendo 10 mL di terreno di crescita cellulare completo (!!! Se nella scheda tecnica è consigliato un volume diverso di terreno, è necessario seguire le istruzioni del produttore! !!). Il tipo di fiasca per coltura cellulare o la quantità di mezzo di crescita possono dipendere dalla cellula. Sulla piastra va scritto, con pennarello indelebile, quanto segue: data della procedura di scongelamento, il nome/codice della linea cellulare, il numero di passaggio e il nome della persona che ha eseguito la procedura.
- 4) trasferire la criovial contenente le cellule congelate acquistate/ricevute dal contenitore di conservazione (ghiaccio secco o azoto liquido) in un bagno di acqua calda regolata



a 37°C (!!! Utilizzare guanti di sicurezza e una visiera in caso di manipolazione di azoto liquido!!!)

Nota!!! *Le criovials con cellule congelate devono essere maneggiate una per una; non scongelare due o più criovials contemporaneamente!!!*

- 5) mantenere la criovial a bagnomaria per < 1 minuto e scongelare il contenuto agitandola delicatamente finché nella fiala non rimane un po' di ghiaccio
- 6) trasferire la criovial nella cappa a flusso laminare e asciugarla con EtOH al 70% prima dell'apertura
- 7) trasferire goccia a goccia le cellule scongelate dalla crioviale nella provetta da centrifuga precedentemente preparata (step 2). Agitare delicatamente la provetta mentre si aggiungono le gocce per ridurre lo shock osmotico alle cellule!!! Questo è un passaggio cruciale e le cellule devono essere trattate il più delicatamente possibile!!!
- 8) verificare la criovial per assicurarsi che tutto il contenuto sia stato rimosso e, in caso contrario, risciacquare con 1 ml di terreno di crescita completo specifico per la linea cellulare
- 9) centrifugare le cellule a 1700 giri/min per 5-10 minuti (a seconda della linea cellulare – informazioni presenti nella scheda tecnica)
- 10) eliminare delicatamente il surnatante nel contenitore dei rifiuti posto nella cappa a flusso laminare senza disturbare il pellet di cellule
- 11) Risospendere delicatamente il pellet in 1-2 mL di terreno di crescita completo e trasferire la sospensione nel matraccio di coltura cellulare precedentemente preparato (passaggio 3). Oscillare facilmente la piastra, da un lato all'altro e avanti e indietro (!!! il terreno non deve entrare nel tappo!!!) per distribuire uniformemente le cellule sulla piastra e incubare a 37°C e 5 % CO₂.

Nota!!! *Si consiglia di fotografare le cellule immediatamente dopo lo scongelamento, a 24 e 48 ore e quando viene raggiunto il 70-80% di confluenza (Figura 4.3)!!!*



Co-funded by
the European Union

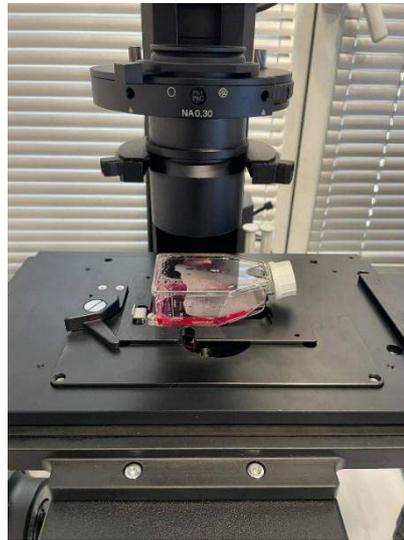


Figura 4.3. Valutazione dell'aspetto delle cellule mediante il microscopio invertito dopo la procedura di scongelamento cellulare.

!!! Suggerimenti per la risoluzione dei problemi!!!



Problem	Reason	Solution
No viable cells after thawing stock	Cells were stored incorrectly	Obtain new stock and store in liquid nitrogen. Keep the cells in liquid nitrogen until thawing.
	Home made freezer stock is not viable	Freeze cells at a density recommended by the supplier.
		Use low-passage cells to make your own freezer stocks.
		Follow procedures for freezing cells exactly as recommended by the supplier. Note that the freezing procedure recommended in this handbook is a general procedure provided as a guideline only.
	Cells were thawed incorrectly	Obtain new stock.
		Follow procedures for thawing cells exactly as recommended by the supplier. Note that the thawing procedure recommended in this handbook is a general procedure provided as a guideline only.
	Thawing medium is not correct	Make sure that you thaw the frozen cells quickly, but dilute them slowly using pre-warmed growth medium before plating.
Cells are too dilute	Use the medium recommended by the supplier. Make sure the medium is pre-warmed.	
Cells grow slowly	Plate thawed cells at high density as recommended by the supplier to optimize recovery.	
	Cells not handled gently	Freezing and thawing procedures are stressful to most cells. Do not vortex, bang the flasks to dislodge the cells (except when culturing insect cells), or centrifuge the cells at high speeds.
	Glycerol used in the freezing medium was stored in light (if applicable)	If stored in light, glycerol is gets converted to acrolein, which toxic to cells. Obtain new stock.
Cells grow slowly	Growth medium is not correct	Use pre-warmed growth medium as recommended by the supplier.
	Serum in the growth medium is of poor quality	Use serum from a different lot.
	Cells have been passaged too many times	Use healthy, low passage-number cells.
	Cells were allowed to grow beyond confluency	Passage mammalian cells when they are in the log-phase before they reach confluence.
	Culture is contaminated with mycoplasma	Discard cells, media, and reagents. Obtain new stock of cells, and use them with fresh media and reagents.

Figura 4.4. Potenziali soluzioni per la risoluzione dei problemi riscontrati durante la procedura di scongelamento di una linea cellulare [Gibco Cell Culture Basics].

A. Sottocolture di linee cellulari di mammiferi aderenti

🕒 **Durata 30 min – 1 h**

Quando le cellule raggiungono una confluenza adeguata (70-80%), deve essere applicato il protocollo di subcoltura, come segue:

- 12) preparare una provetta Falcon sterile – 15 mL e il numero di fiasche di coltura cellulare necessarie per la semina. Sia la provetta Falcon che le fiasche delle colture cellulari devono essere etichettate (data della procedura di subcoltura, nome/codice della linea cellulare, numero di passaggi, nome della persona che ha eseguito la procedura)



- 13) prelevare la beuta con le cellule dall'incubatore e controllare la morfologia delle cellule utilizzando un microscopio invertito

Nota!!! *Si consiglia di fotografare le cellule immediatamente dopo lo scongelamento, a 24 e 48 ore e quando viene raggiunto il 70-80% di confluenza!!!*

- 14) eliminare il vecchio terreno di coltura dal pallone di coltura cellulare utilizzando una pompa a vuoto o una pipetta sierologica sterile collegata al dispositivo di pipettaggio (Easypet® 3, Eppendorf)

- 15) lavare le cellule con tampone fosfato salino (PBS) preriscaldato senza $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 10 mL per fiasche per colture cellulari da 75 cm² (T75) e 5 mL per fiasche per cellule da 25 cm² (T25)!!! La soluzione PBS deve essere aggiunta delicatamente al sito opposto della beuta dove sono attaccate le cellule per impedire il distacco delle cellule ed eseguire il lavaggio facendo oscillare la beuta avanti e indietro più volte!!! **Se è noto che le cellule aderiscono fortemente, si consiglia di ripetere la fase di lavaggio!!!**

Nota!!! *Questa fase di lavaggio è obbligatoria per rimuovere le tracce di siero bovino e altri componenti del terreno (calcio, magnesio) che inattivano l'azione dell'enzima (soluzione Tripsina/EDTA) utilizzato per staccare lo strato cellulare!!!*

- 16) scartare il PBS

- 17) aggiungere 3 mL di soluzione Tripsina/EDTA (TE) (la concentrazione della soluzione TE è menzionata nella scheda tecnica ricevuta dal produttore) per la beuta T75 e 1,5 mL per la beuta T25 e ruotare la beuta per distribuire uniformemente la soluzione TE

- 18) riportare la beuta nell'incubatrice per 2-10 minuti (il tempo di incubazione dipende dalla linea cellulare)

- 19) 19) esaminare le cellule al microscopio invertito per verificare se tutte le cellule sono staccate e galleggianti. Quando meno del 90% delle cellule si staccano, il tempo di incubazione deve essere aumentato di alcuni minuti, con la specificazione che l'esame per il distacco delle cellule deve essere effettuato ogni 30 secondi!!! *il lato laterale del pallone può essere picchiettato delicatamente per staccare le restanti cellule aderenti!!! (Figura 4.5).*

Nota!!! *Un'esposizione prolungata delle cellule alla soluzione Tripsina/EDTA potrebbe danneggiare i recettori della superficie cellulare!!! La neutralizzazione della soluzione di tripsina/EDTA è obbligatoria prima della semina delle cellule, altrimenti le cellule non si attaccheranno!!!*



Figura 4.5. Immagini dei passaggi specifici della procedura di trypsinizzazione.

- 20) dopo il distacco di $\geq 90\%$ di cellule, è necessario aggiungere 10 mL di terreno di crescita completo preriscaldato per la fiaschetta T75 o 5 mL per la fiasca T25 per inattivare l'effetto della soluzione TE (o due volte il volume della soluzione TE aggiunta a seconda della raccomandazione del produttore) e diffondere il mezzo pipettando più volte sullo strato cellulare.
- 21) trasferire la sospensione di cellule nella provetta Falcon – 15 mL precedentemente preparata (step 12) e centrifugare a 1700 giri/min per 5 minuti a temperatura ambiente!!! *La velocità e il tempo della centrifuga dipendono dal tipo di cella!!!*
- 22) scartare il surnatante, risospendere il pellet di cellule in un volume minimo (1 mL) di mezzo di crescita completo preriscaldato e rimuovere una quantità (10 μL) di sospensione di cellule per eseguire la conta delle cellule
- 23) la determinazione del numero totale di cellule e della percentuale di vitalità può essere eseguita utilizzando un emocitometro (camera di Neubauer) in presenza di soluzione Trypan blue o il contatore cellulare automatizzato Countess II FL.

Conta delle cellule mediante emocitometro – camera di Neubauer

- ❖ pulire (utilizzando EtOH 70%) e asciugare accuratamente l'emocitometro e il vetrino coprioggetto prima dell'uso



- ❖ preparare una provetta Eppendorf (1,5 mL) etichettata con il nome della linea cellulare aggiungendo 50 μ L di Trypan Blue e 10 μ L di sospensione cellulare e miscelare pipettando
- ❖ trasferire 10 μ L di miscela nell'apposita camera dell'emocitometro e posizionare delicatamente il vetrino coprioggetto per evitare la formazione di bolle d'aria
- ❖ posizionare l'emocitometro sotto un microscopio invertito e osservare le cellule ad alto ingrandimento (40x o 100x)
- ❖ mettere a fuoco i quadranti etichettati con 1, 2, 3 e 4, come mostrato in Figura 4.6.

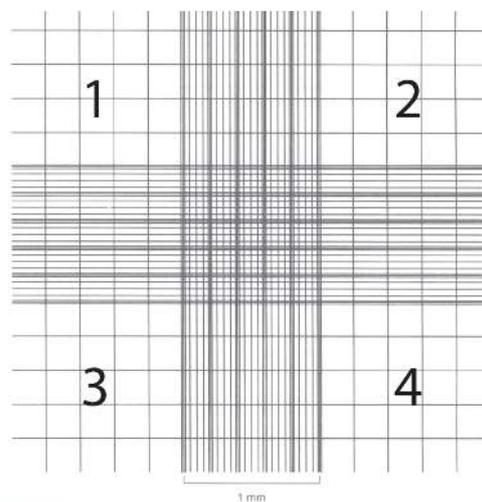


Figura 4.6. Quadranti dell'emocitometro (camera di Neubauer).

- ❖ contare il numero di celle di ciascun quadrante utilizzando un contacelle manuale
- ❖ il numero totale di celle può essere calcolato utilizzando la seguente formula:

Numero di cellule totali/mL = media del numero di cellule ottenute contando i quadranti X 10 000 X fattore di diluizione

Conteggio delle cellule utilizzando il contatore cellulare automatizzato Countess II FL

- ❖ preparare una provetta Eppendorf (1,5 mL) etichettata con il nome della linea cellulare aggiungendo 50 μ L di Trypan Blue e 10 μ L di sospensione cellulare e miscelare pipettando
- ❖ trasferire 10 μ L di miscela nel vetrino specifico per il contatore cellulare automatizzato Countess II FL
- ❖ introdurre il vetrino nel contatore cellulare automatizzato Countess II FL e premere il pulsante di lettura



- ❖ in meno di 1 minuto si otterrà automaticamente il numero totale di cellule/mL e verrà inoltre calcolato il numero di cellule corrispondente all'intero volume di sospensione cellulare mediante moltiplicazione

Esempio:

In 1 mL di sospensione1 400 000 cellule

In 3 mL di sospensioneX cellule

X= 4 200 000 cellule

- 24) trasferire il numero richiesto di cellule (la densità di semina consigliata) in una nuova beuta etichettata preparata in precedenza (fase 12) contenente 10 mL di mezzo di crescita completo (T25) o 18 mL – 20 mL di mezzo (T75) e incubare le cellule secondo le condizioni consigliate
- 25) ripetere i passaggi 12-24 ogni volta che le caratteristiche di crescita della linea cellulare lo richiedono
- 26) esaminare la beuta il giorno successivo per verificare se le cellule si sono riattaccate e stanno crescendo attivamente
- 27) cambiare il terreno di crescita della coltura tutte le volte necessarie; 2-3 volte a settimana è normale per la maggior parte delle cellule in crescita attiva.

Consigli utili!!!

- ❖ *Prima di iniziare la procedura di subcoltura di una linea cellulare, controllare la scheda prodotto del produttore*
- ❖ *La maggior parte dei terreni di crescita completi devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C per un mese ed esaminati periodicamente*
- ❖ *Non è consigliabile congelare il terreno di crescita completo poiché gli integratori aggiunti potrebbero precipitare*
- ❖ *L'esame delle culture dovrebbe includere:*
 - *esame macroscopico del terreno per l'esistenza di contaminazione microbica: cambiamenti di colore del terreno dovuti a variazioni del pH (giallo o viola), torbidità, particelle, piccole colonie fungine che galleggiano*
 - *valutazione microscopica del terreno: piccoli punti neri scintillanti all'interno degli spazi tra le cellule indicano una contaminazione batterica; particelle arrotondate e in erba – contaminazione da lievito; e micelio filamentoso sottile - contaminazione da funghi*



- *valutazione microscopica della morfologia cellulare: le cellule aderenti devono essere saldamente attaccate alla superficie della beuta; alcune cellule sane si riuniscono e si staccano durante la mitosi e sono rifrangenti, ma dopo la mitosi si riattaccano; le cellule morte si arrotondano e galleggiano nel mezzo e sono più piccole e più scure*
- *come riferimento, le immagini di diverse linee cellulari possono essere trovate sul sito web del produttore (ad es. ATCC)*
- ❖ *l'uso regolare di antibiotici per colture cellulari non è raccomandato a meno che non siano specificatamente richiesti a causa della loro capacità di mascherare la contaminazione da micoplasmi e batteri resistenti; se vengono utilizzate, si raccomanda una concentrazione finale compresa tra 50 e 100 UI/ml di penicillina e tra 50 e 100 µg/ml di streptomicina.*
- ❖ *i sieri provenienti da feti e bovini sono comunemente utilizzati per supportare la crescita delle cellule in coltura.!!! Utilizza un siero rigorosamente testato per gli agenti infettivi e proveniente solo dagli Stati Uniti!!!*
- ❖ *non consentire l'accumulo di rifiuti nelle cabine di sicurezza microbiologica o negli incubatori per evitare il rischio di contaminazione*
- ❖ *non è consigliabile avere troppe persone contemporaneamente nel laboratorio*
- ❖ *evitare che le colture cellulari diventino pienamente confluenti; eseguire sempre la subcoltura alla confluenza del 70-80% o come raccomandato dal produttore*
- ❖ *evitare di mantenere le linee cellulari continuamente in coltura senza creare scorte ai primi passaggi e senza ritornare alle scorte congelate*
- ❖ *mantenere pulito il bagnomaria*
- ❖ *mantenere calibrata l'apparecchiatura*
- ❖ *stabilire un programma regolare di test del micoplasma [Geraghty et al., 2014; ATCC - Animal Cell Culture Guide; ECACC Handbook].*

!!! Suggerimenti per la risoluzione dei problemi!!! [ATCC - Animal Cell Culture Guide]

Tabella 2. Potenziali soluzioni ai problemi riscontrati durante la procedura di subcoltura.

Problemi	Potenziali cause	Soluzioni
Difficoltà a staccare le cellule in seguito all'aggiunta della soluzione di tripsina/EDTA (TE).	Il siero o altri integratori presenti nel terreno inattivano il TE La soluzione TE era troppo debole	Lavare le cellule due volte con una soluzione PBS senza Ca ²⁺ /Mg ²⁺ prima di aggiungere la soluzione TE



	<p>Le cellule sono rimaste troppo confluenti per troppo tempo e le giunzioni cellula-cellula sono molto strette</p>	<p>Utilizzare la soluzione TE anziché PBS per il primo lavaggio Utilizzare concentrazioni di enzimi più elevate, concentrazioni di EDTA più elevate o altri enzimi Si consiglia inoltre l'incubazione a 37°C per aumentare l'attività della soluzione TE Sottocoltivare le cellule prima che diventino confluenti</p>
<p>Formazione di grumi di cellule in seguito alla dissociazione con soluzione TE</p>	<p>Il distacco è stato troppo brusco e il DNA genomico è stato rilasciato dalle cellule danneggiate</p> <p>Il pipettaggio era troppo vigoroso</p> <p>La soluzione TE era troppo concentrata o troppo tossica</p> <p>Aggregazione delle cellule prima della diluizione e della risospensione nel terreno</p> <p>Centrifugazione lunga e dura</p>	<p>Aggiungere una soluzione sterile di DNasi (1 mg/mL) alla sospensione cellulare per distruggere i filamenti di DNA formati Eeguire la fase di pipettaggio più delicatamente Utilizzare una soluzione TE meno concentrata; ridurre il periodo di incubazione Mantenere la sospensione cellulare in ghiaccio se si verifica un ritardo tra il momento del distacco delle cellule e la semina in una nuova beuta Centrifugazione delicata</p>
<p>Problemi con il riattacco delle cellule al pallone</p>	<p>La procedura di distacco è stata troppo lunga e ha influito sulle proteine di attacco della membrana cellulare Siero o altri componenti con proprietà di attaccamento insufficienti nel terreno di crescita La soluzione TE non è stata inattivata o scartata mediante centrifugazione</p>	<p>Utilizzare una beuta rivestita di proteine (collagene, poli-L-lisina, fibronectina, gelatina, ecc.).</p> <p>Aggiunta di siero e fattore di attacco al terreno</p> <p>Aggiunta di siero o altri inibitori enzimatici, centrifugare e risospendere le cellule in terreno di crescita completo fresco</p>
<p>Una vitalità ridotta</p>	<p>La procedura di distacco è stata troppo dura Il pH o l'osmolalità della soluzione salina bilanciata contenente la soluzione TE è errato Un lungo periodo in cui si lascia la sospensione delle cellule staccate ad una concentrazione cellulare troppo elevata prima della risemina Il mezzo di crescita era danneggiato</p>	<p>Agire con maggiore delicatezza durante l'esecuzione della procedura Controllare il flacone aperto e/o utilizzarne uno nuovo</p> <p>Mantenere le cellule in ghiaccio</p> <p>Preparare un nuovo flacone di terreno di crescita fresco</p>



B. Protocollo di crioconservazione di una linea cellulare aderente di mammifero

🕒 Durata - 1 h

!!!Per eseguire il protocollo di crioconservazione di una linea cellulare aderente di mammifero è necessario seguire i passaggi 12-23 descritti per la procedura di subcoltura della linea cellulare di mammifero!!!

- 28) preparare una criovial etichettata che contenga le seguenti informazioni: data di crioconservazione, nome/codice della linea cellulare, numero di passaggi, numero di cellule, nome della persona che ha eseguito la procedura (utilizzare una matita per scrivere sulla criovial)
- 29) dopo il conteggio del numero di cellule, centrifugare la sospensione cellulare a 1700 giri/min per 5 minuti.!!! La velocità e il tempo della centrifuga dipendono dal tipo di cellula!!!
- 30) risospendere le cellule in un volume appropriato di mezzo di congelamento (secondo le raccomandazioni del produttore) e aggiungere 1710 µl di sospensione cellulare nella criovial precedentemente preparata (passaggio 28) + 90 µl di DMSO (dimetilsolfossido – un agente crioprotettivo)
- 31) posizionare la criovial nella scatola Nalgene Mr. Frosty riempita con isopropanolo e trasferire Mr. Frosty nel congelatore a -80°C per una notte
- 32) Trasferire le cellule congelate in azoto liquido

Nota!!! È obbligatorio che le cellule siano sane, prive di contaminanti e in fase logaritmica di crescita!!!

Consigli utili!!!

- ❖ *Utilizzare come agente crioprotettivo DMSO – è l'uso più comune? Se il produttore consiglia diversamente, seguire le loro istruzioni*
- ❖ *Per ottenere cellule sane e in fase di crescita logaritmica, si consiglia di utilizzare colture pre-confluenti (cellule che sono al di sotto della loro densità cellulare massima) e cambiando il terreno di coltura 24 ore prima della procedura di crioconservazione*
- ❖ *Un'alternativa al mezzo di congelamento è: 70% mezzo basale+20% FBS+10% DMSO, tuttavia il mezzo di congelamento dipende dal tipo di cellula*
- ❖ *Le cellule congelate mantenute a temperature superiori a -65°C verranno rapidamente danneggiate [ATCC - Animal Cell Culture Guide; ECACC Handbook].*



4.3. SAGGI BASATI SU CELLULE USANDO CELLULE 2D

4.3.1. Test di vitalità cellulare

Lo screening di diverse raccolte di composti, principalmente farmaci, in termini di valutazione del loro impatto sulla proliferazione cellulare o sul potenziale citotossico viene condotto utilizzando test cellulari. È possibile applicare una varietà di metodi per valutare il numero di cellule vitali, come: riduzione del tetrazolio, riduzione della resazurina, rilevamento dell'ATP, nonché citometria a flusso e imaging ad alto contenuto [Riss et al., 2016].

La vitalità cellulare è un parametro che si riferisce al numero di cellule vitali/sane in un campione di prova e la sua quantificazione è spesso determinata in test di tossicità, per lo screening della risposta delle cellule a diversi farmaci o sostanze chimiche o per correlare il comportamento cellulare al numero di cellule [Kamiloglu et al., 2020]. I test di vitalità cellulare monitorano diverse funzioni cellulari, come: permeabilità della membrana cellulare, metabolismo o attività enzimatica, produzione di ATP, adesione cellulare o attività di assorbimento dei nucleotidi [Adan et al., 2016; Kamiloglu et al., 2020]. A seconda del meccanismo d'azione, i test di vitalità cellulare sono classificati come: (i) test di esclusione del colorante (blu trypan, eosina, rosso congo ed eritrosina B); (ii) test colorimetrici (MTT, MTS, WST-1, XTT, WST-8, LDH, sulforhodamine B (SRB), assorbimento del rosso neutro (NRU)); (iii) test luminometrici (test ATP e test di vitalità in tempo reale) e test fluorometrici (Alamar blue and CFDA-AM assay) [Aslanturk, 2017; Adan et al., 2016; Kamiloglu et al., 2020]

Nelle sezioni successive della presente guida verranno presentati in dettaglio diversi test di vitalità cellulare come il Trypan blue, il 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio bromuro (MTT) e i metodi Alamar blue. che vengono frequentemente utilizzati nel nostro laboratorio di colture cellulari.

Metodo del Trypan blue

È una tecnica di esclusione del colorante sviluppata a partire dal 1975 per determinare il conteggio delle cellule vitali ed è ancora applicata per confermare i cambiamenti nel numero di cellule vitali in seguito all'esposizione a un farmaco o a un composto tossico. Questo metodo presenta molteplici vantaggi come semplicità, costi ridotti e dati riguardanti l'integrità delle membrane cellulari [Aslanturk, 2017; Kamiloglu et al., 2020].

Principio del metodo: Il trypan blu è una grande molecola caricata negativamente che non penetra nella membrana cellulare intatta delle cellule vitali, mentre le cellule morte sono permeabili e sono colorate in blu. Le cellule morte con il citoplasma colorato in blu vengono



osservate mediante microscopia ottica e possono essere contate utilizzando un contacellule manuale o automatico [Aslanturk, 2017; Kamiloglu et al., 2020].

Protocollo Step-by-step

🕒 **Durata 2-4 giorni (in funzione del period di trattamento – 24/48/72 h)**

!!! Per determinare la vitalità di una linea cellulare aderente di mammifero utilizzando il test Trypan Blue, seguire i passaggi 12-22 descritti per la procedura di sottocoltura della linea cellulare di mammifero! bisogna seguirlo!!! Per questo test è necessaria la tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare!!!

In breve, dovrebbero essere eseguiti i seguenti passaggi:

(i) pulire (utilizzando EtOH 70%) e asciugare accuratamente l'emocitometro e il vetrino coprioggetto prima dell'uso

(ii) preparare una provetta Eppendorf (1,5 mL) etichettata con il nome della linea cellulare aggiungendo 50 μ L di Trypan Blue e 10 μ L di sospensione cellulare e miscelarla pipettando

(iii) trasferire 10 μ L di miscela nell'apposita camera dell'emocitometro e posizionare delicatamente il vetrino coprioggetto per evitare la formazione di bolle d'aria

(iv) posizionare l'emocitometro sotto un microscopio invertito e osservare le cellule ad alto ingrandimento (40x o 100x)

(v) mettere a fuoco i quadranti etichettati con 1, 2, 3 e 4, come mostrato nella Figura 4.7

(vi) contare tutte le cellule di ciascun quadrante utilizzando un contatore di cellule manuale

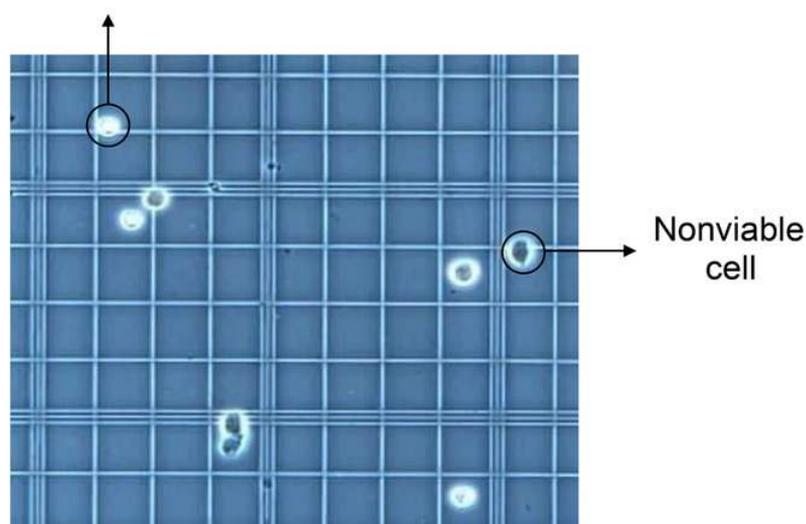


Figura 4.7. Principio del saggio del Trypan blue [Kamiloglu et al., 2020].



Co-funded by
the European Union



La vitalità cellulare (%) dovrebbe essere almeno del 95% nel caso di cellule sane nella fase di crescita logaritmica.

La percentuale di cellule vitali può essere calcolata utilizzando la seguente formula [Kamiloglu et al., 2020]:

$$\begin{aligned} \% \text{ Viable cells} \\ &= \frac{\text{Total number of viable cells per milliliter of aliquot}}{\text{Total number of cells per milliliter of aliquot}} \times 100. \end{aligned}$$

Numero totale di cellule/mL = media del numero di cellule ottenute dal conteggio dei quadranti x 10 000 x fattore di diluizione.

Saggio MTT - 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

Il test MTT rappresenta la prima tecnica di vitalità cellulare sviluppata per il formato a 96 pozzetti, essendo ampiamente applicata negli studi di ricerca come test per la valutazione della vitalità/proliferazione cellulare [Kamiloglu et al., 2020].

Principio del metodo: questo test si basa sulla misurazione dell'attività della succinato deidrogenasi (un enzima unico noto come Complesso II che fa parte del ciclo di Krebs): un sale di tetrazolio giallo subisce una reazione chimica, dando origine a cristalli colorati in viola. Questi cristalli vengono poi sciolti e la soluzione risultante viene analizzata per misurare l'assorbanza [Aslantürk, 2017].

Il reagente MTT o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) è un sale mono-tetrazolio che può passare attraverso la membrana cellulare e la membrana interna mitocondriale delle cellule vitali e viene successivamente ridotto a formazano dalle cellule metabolicamente attive. Il prodotto formazan del tetrazolio MTT si accumula come precipitato insolubile e il formazan deve essere solubilizzato prima della lettura dell'assorbanza. La reazione chimica redox prodotta in questo test fornisce una misurazione colorimetrica della produzione intracellulare di formazan ed è ora utilizzata con ampia utilità [Ghasemi et al., 2021].

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- Kit di proliferazione cellulare I (MTT) Roche (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)



Co-funded by
the European Union



- Controllo positivo per indurre la morte cellulare - SDS (0,05% in acqua priva di pirogeni, concentrazione finale – 0,005%) o Triton-X 100
- Cytation 5 Multimode Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- Controllo negativo: cellule non trattate
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

***Nota: È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.**

Protocollo Step-by-step

🕒 **Durata 2-4 giorni (in funzione del period di trattamento – 24/48/72 h)**

- (i) preparazione dei terreni di crescita completi specifici per ciascuna linea cellulare secondo il protocollo del produttore
- (ii) sottocoltura della linea cellulare in fiasche di coltura cellulare (**fasi 12-22 dal protocollo subcultura**)
- (iii) conteggio del numero di cellule utilizzando l'emocitometro o il contatore cellulare automatizzato Countess II FL (**fase 23 dal protocollo subcultura**)
- (iv) semina di cellule a una densità di semina adeguata (specifica per ciascuna linea cellulare) - 1×10^4 cellule/pozzetto/200 μ l di terreno di crescita completo in piastre da 96 pozzetti
- (v) ispezione microscopica della confluenza delle cellule per avviare la fase di stimolazione/trattamento
- (vi) preparazione delle diluizioni dei composti da testare in provette Eppendorf sterili da 1,5 mL etichettate con il nome/codice del composto e la concentrazione
- (vii) riparazione della soluzione di controllo positivo (SDS o Triton-X 100 – a seconda delle raccomandazioni del produttore)
- (viii) modellare un modello per la piastra corrispondente all'esperimento (la valutazione di diverse concentrazioni di composti di prova) che include: controllo negativo (cellule non trattate), controllo positivo (soluzioni SDS o Triton-X 100), bianco (solo pozzetto di crescita mezzo), serie di diluizioni per i composti in esame e serie di diluizioni per il solvente
- (ix) quando le cellule raggiungono la confluenza appropriata (70-80%), il vecchio terreno viene scartato e sostituito con crescita fresca contenente rispettivamente i composti in esame (triplicati) e le diluizioni del solvente



- (x) incubazione della piastra per 24/48/72 h (a seconda dello scopo della ricerca) a 37°C e 5% CO₂.
- (xi) dopo il periodo di incubazione, il terreno viene rimosso e in tutti i pozzetti vengono aggiunti 100 µl di terreno di crescita completo
- (xii) viene verificata la morfologia delle cellule utilizzando il microscopio invertito e vengono scattate fotografie per rilevare i potenziali cambiamenti a seguito del trattamento applicato
- (xiii) un volume di 10 µl di soluzione MTT (kit 1 MTT) viene aggiunto a ciascun pozzetto e le cellule vengono incubate per 3 ore a 37°C e al 5 % CO₂ (Figura 4.8)



Figura 4.8. Aggiunta del kit-1 MTT in ciascun pozzetto (10 µl/well)

- (xiv) dopo il periodo di incubazione di 3 ore, 100 µl di tampone di solubilizzazione (kit 2) vengono aggiunti a ciascun pozzetto per sciogliere i cristalli di formazano e la piastra viene incubata per altri 30 minuti al riparo dalla luce a temperatura ambiente (Figura 4.9)

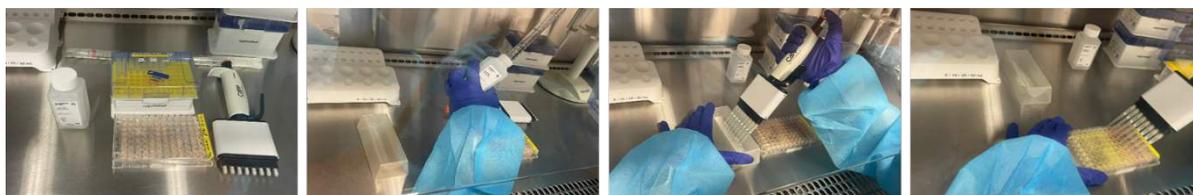


Figura 4.9. Aggiunta del kit-2 MTT in ciascun pozzetto (100 µl/well)

- (xv) l'assorbanza viene letta a 570 nm utilizzando il lettore multimodale Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) (Figure 4.10).



Figura 4.10. Lettura assorbanza a 570 nm.

- (xvi) la percentuale di vitalità cellulare è calcolata utilizzando la seguente formula [Kamiloglu et al., 2020], dove OD è il valore di assorbanza misurato:

$$\begin{aligned} \% \text{ Viability} \\ &= \frac{\text{Mean OD}_{\text{sample}}}{\text{Mean OD}_{\text{blank}}} \times 100. \end{aligned}$$

- (xvii) (xvii) interpretazione dei dati: valori di assorbanza inferiori rispetto alle cellule di controllo indicano una riduzione del tasso di proliferazione cellulare; al contrario, un tasso di assorbanza più elevato indica un aumento della proliferazione cellulare [MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K]

!!! Suggestimenti per la risoluzione dei problemi!!! [MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K]



Problem: MTT Reagent is blue-green.

Cause	Remedy
Contamination with a reducing agent or cell/bacterial contamination.	Discard. Remove aliquots of new MTT Reagent using sterile technique.
Excessive exposure to light.	Store solution in the dark at 4°C.

Problem: Blanks (medium only) give high absorbance readings.

Cause	Remedy
The medium is contaminated with cells/bacteria/yeast (visible under microscope).	Discard. Check medium before plating. Use sterile technique for cell plating in biological hood. Use sterile 96-well plate.
The medium contains ascorbic acid.	Incubate plate in the dark. Find alternative medium if possible.

Problem: Absorbance readings too high.

Cause	Remedy
Cell number per well too high.	Decrease cell density at plating.
Contamination of culture with bacteria or yeast.	Discard. View wells prior to addition of MTT Reagent to check for contamination.

Problem: Absorbance readings are too low.

Cause	Remedy
Cell number per well is too low.	Increase cell density at plating.
Incubation time for reduction of MTT is too short. No purple color visible in cells when viewed under microscope.	Increase incubation time with MTT Reagent until purple color is evident inside cells when viewed under microscope. Longer incubation of up to 24 hours may be required for some cell types.
Incubation time for solubilization of formazan dye too short (intact cells with intracellular dye visible when viewed under the microscope).	Increase incubation time with Detergent Reagent or incubate at 37°C. View under microscope to ensure no crystals remain out of solution.
Cells not proliferating due to improper culture conditions or inadequate time of recovery after plating.	Check that culture conditions (medium, temperature, humidity, CO ₂ , etc.) are appropriate. View cells periodically to check condition. Increase time in culture after plating for cell recovery.

Problem: Replicates have different values.

Cause	Remedy
Inaccurate plating or pipetting.	Increase accuracy of cell plating, check accuracy of pipette.

Figura 4.11. Suggestioni per la risoluzione dei problemi raccomandati per il test MTT.

Metodo Alamar blu

Questa tecnica è nota anche come saggio di riduzione della resazurina. La resazurina è un colorante fenoxazin-3-one e un indicatore redox permeabile alle cellule non tossico. Questo composto può essere utilizzato per determinare il numero di cellule vitali applicando protocolli simili a quelli che utilizzano i composti del tetrazolio [Aslanturk, 2017].

Principio del metodo: dopo essere entrata nelle cellule, la resazurina viene ridotta a resorufina. La resorufina è di colore rosso e un composto altamente fluorescente. Le cellule vitali convertono continuamente la resazurina in resorufina, aumentando la fluorescenza complessiva e il colore del terreno di coltura cellulare. La quantità di resorufina prodotta è correlata al numero di cellule vitali [Aslanturk, 2017].



Protocollo Step-by-step

🕒 **Durata 2-4 giorni (in funzione del period del trattamento – 24/48/72 h)**

- (i) preparazione dei terreni di crescita completi specifici per ciascuna linea cellulare secondo il protocollo del produttore
- (ii) sottocoltura della linea cellulare in fiasche di coltura cellulare (**fasi 12-22 dal protocollo subcultura**)
- (iii) conteggio del numero di cellule utilizzando l'emocitometro o il contatore cellulare automatizzato Countess II FL (**passaggio 23 dal protocollo di subcultura**)
- (iv) semina di cellule a una densità di semina adeguata (specifica per ciascuna linea cellulare) - 1×10^4 cellule/pozzetto/200 μ l di terreno di crescita completo in piastre da 96 pozzetti
- (v) ispezione microscopica della confluenza delle cellule per avviare la fase di stimolazione/trattamento
- (vi) preparazione delle diluizioni dei composti da testare in provette Eppendorf sterili da 1,5 mL etichettate con il nome/codice del composto e la concentrazione
- (vii) preparazione della soluzione di controllo positivo (SDS o Triton-X 100 – a seconda delle raccomandazioni del produttore)
- (viii) modellare un modello per la piastra corrispondente all'esperimento (la valutazione di diverse concentrazioni di composti di prova) che include: controllo negativo (cellule non trattate), controllo positivo (soluzioni SDS o Triton-X 100), bianco (solo pozzetto di crescita mezzo), serie di diluizioni per i composti in esame e serie di diluizioni per il solvente
- (ix) quando le cellule raggiungono la confluenza appropriata (70-80%), il vecchio terreno viene scartato e sostituito con crescita fresca contenente rispettivamente i composti in esame (triplicati) e le diluizioni del solvente
- (x) incubazione della piastra per 24/48/72 h (a seconda dello scopo della ricerca) a 37°C e 5% CO₂.
- (xi) dopo il periodo di incubazione, il terreno viene rimosso e in tutti i pozzetti vengono aggiunti 200 μ l di terreno di crescita completo



- (xii) viene verificata la morfologia delle cellule utilizzando il microscopio invertito e vengono scattate fotografie per rilevare i potenziali cambiamenti a seguito del trattamento applicato
- (xiii) un volume di 10 µl di reagente Alamar blue viene aggiunto a ciascun pozzetto e le cellule vengono incubate per 3 ore a 37°C e al 5% di CO₂
- (xiv) l'assorbanza viene quindi letta a 570 e 600 nm.
[\[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/AlamarBluePIS.pdf\]](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/AlamarBluePIS.pdf)
- (xv) (xv) la percentuale di cellule vitali viene calcolata utilizzando la seguente formula:

Percentuale di cellule vitali (%) = $\{[(\epsilon_{OX})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} \text{ della diluizione dell'agente di prova}] / [(\epsilon_{OX})_{\lambda_2} A^{\circ}_{\lambda_1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda_1} A^{\circ}_{\lambda_2} \text{ di controllo positivo della crescita non trattato}]\} \times 100$,
Dove: ϵ_{OX} = coefficiente di estinzione molare della forma ossidata blu di Alamar (BLUE)

A = assorbanza dei pozzetti di prova

A° = assorbanza del pozzetto di controllo positivo della crescita (cellule senza composti testati)

$\lambda_1 = 570 \text{ nm}$ and $\lambda_2 = 600 \text{ nm}$ [Iftode et al., 2021].

4.3.2. Metodi di colorazione con immunofluorescenza per la valutazione della morfologia cellulare

L'immunofluorescenza è un metodo di colorazione noto fin dagli anni '50, considerato un ottimo strumento negli esperimenti preclinici, nella biologia moderna e nelle aree correlate della ricerca medico-farmaceutica. Può anche essere descritto come una combinazione di tecnologia morfologica e tecniche di immunofluorescenza per lo sviluppo di cellule fluorescenti. Questo metodo consente la visualizzazione di più componenti di un tessuto o di una cellula (nuclei cellulari, proteine, acidi nucleici o altri componenti cellulari). Tra i vantaggi della tecnica di immunofluorescenza si menzionano l'elevata amplificazione del segnale, la specificità mirata, l'alta risoluzione e le capacità analitiche [Im et al., 2019].

In generale, il principio della procedura si basa sull'uso di anticorpi fluorescenti specifici per osservare l'impatto dei campioni da testare sull'espressione dei marcatori cellulari.

Nelle sezioni successive verranno presentati diversi test applicati per la visualizzazione mediante colorazione con immunofluorescenza del nucleo e delle caratteristiche citoscheletriche delle cellule in coltura aderenti in presenza o assenza di un composto/trattamento specifico.

Colorazione nucleare



Co-funded by
the European Union



Hoechst 33342 Colorazione

Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate) è un colorante permeabile alle cellule che si lega alle sequenze di adenina-timina (AT) del DNA a doppio filamento, ampiamente applicato come colorante nucleare con fluorescenza blu a 460-490 nm. È particolarmente noto per distinguere i nuclei condensati nelle cellule apoptotiche. Il colorante Hoechst 33342 viene utilizzato per le cellule viventi ed è permeabile alle cellule [Thermo Fisher Scientific Hoechst 33342 protocol].

Principio del metodo: dopo l'aggiunta alle cellule in coltura, il colorante Hoechst 33342 entra nella cellula e si concentra nel nucleo, consentendone la visualizzazione in blu; è considerato un indicatore dello stato del nucleo e può essere utilizzato anche per valutare lo stato del ciclo cellulare o nei test di apoptosi.

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- • Controllo positivo per indurre l'apoptosi: soluzione di staurosporina (5 µM; Merck KGaA, Darmstadt, Germania) o necrosi Triton-X 100 (0.5%; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Lionheart FX automated microscope (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- Controllo negativo: cellule non trattate
- Composti di prova
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

*** Nota: È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.**

Protocollo Step-by-step

- (i) preparazione dei terreni di crescita completi specifici per ciascuna linea cellulare secondo il protocollo del produttore
- (ii) sottocoltura della linea cellulare in fiasche di coltura cellulare (**passaggi 12-22 dal protocollo di sottocoltura**)
- (iii) conteggio del numero di cellule utilizzando l'emocitometro o il contatore cellulare automatizzato Countess II FL (**passaggio 23 dal protocollo di subcoltura**)



- (iv) semina di cellule a una densità di semina adeguata (specifica per ciascuna linea cellulare) - 1×10^5 cellule/pozzetto/1500 μ l di terreno di crescita completo in piastre da 12 pozzetti
- (v) ispezione microscopica della confluenza delle cellule per avviare la fase di stimolazione/trattamento
- (vi) preparazione delle diluizioni dei composti da testare in provette Eppendorf sterili da 1,5 mL etichettate con il nome/codice del composto e la concentrazione
- (vii) preparazione della soluzione di controllo positivo (staurosporina 5 μ M e Triton-X 100 0,5% – a seconda delle raccomandazioni del produttore)
- (viii) modellazione di un modello per la piastra corrispondente all'esperimento (la valutazione di diverse concentrazioni di composti di prova) che includono: controllo negativo (cellule non trattate), controllo positivo (soluzioni di Staurosporina 5 μ M e Triton-X 100 allo 0,5%), diluizione serie per i composti di prova e serie di diluizioni per il solvente
- (ix) quando le cellule raggiungono la confluenza appropriata (70-80%), il vecchio terreno viene scartato e sostituito con crescita fresca contenente rispettivamente i composti in esame e le diluizioni del solvente
- (x) incubazione della piastra per 24/48/72 h (a seconda dello scopo della ricerca) a 37°C e 5% CO₂.
- (xi) trascorso il tempo desiderato, il terreno di coltura viene scartato da ciascun pozzetto
- (xii) la soluzione colorante preparata (soluzione madre Hoechst 20 mM diluita in PBS 1:2000) viene aggiunta a ciascun pozzetto in un volume adeguato (300 – 500 μ L) per coprire le cellule
- (xiii) la piastra a pozzetti viene incubata per 5-10 minuti in un luogo protetto dalla luce diretta a temperatura ambiente
- (xiv) trascorso il tempo di incubazione, la soluzione colorante viene rimossa
- (xv) ciascun pozzetto viene quindi lavato 2-3 volte con 1500 μ l di soluzione PBS
- (xvi) il passaggio finale consiste nel fotografare le cellule utilizzando il microscopio invertito o dispositivi speciali a questo scopo
[<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/hoechst-33342-imaging-protocol.html>]



Co-funded by
the European Union



Note!!! Il protocollo di colorazione Hoechst 33342 può essere eseguito anche in formati di piastre da 96 o 6 pozzetti con la menzione che il numero di cellule seminate e i volumi dei reagenti devono essere regolati di conseguenza!!!

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DAPI è utilizzato nella biologia moderna, nelle tecniche in vitro, come colorante fluorescente blu per il DNA. Può essere utilizzato per l'analisi dei nuclei cellulari, la quantificazione dell'apoptosi o l'analisi basata sul DNA. È noto che colora le cellule fissate ed è impermeabile alle cellule.

Principio del metodo: La colorazione DAPI passa attraverso la membrana cellulare intatta e si lega ai filamenti di DNA situati nel nucleo ed emette una fluorescenza blu. Può essere utilizzato per colorare sia cellule vive che cellule fissate (richiede fissazione e permeabilizzazione).

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- DAPI Staining solution (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Note!!! La soluzione madre DAPI (5 mg/mL) può essere ottenuta utilizzando acqua deionizzata (dH_2O) o dimetilformammide (DMF) come solvente. DAPI ha una scarsa solubilità in acqua, quindi sonicare quanto necessario per dissolverlo. La soluzione madre di DAPI da 5 mg/ml può essere conservata a 2–6°C per un massimo di 6 mesi o a $\leq -20^\circ C$ per periodi più lunghi!!!

- Controllo positivo per indurre l'apoptosi: soluzione di staurosporina (5 μM ; Merck KGaA, Darmstadt, Germania) o necrosi Triton-X 100 (0.5%; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Lionheart FX automated microscope (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- Controllo negativo: cellule non trattate
- Composti di prova
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

* **Note:** È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.



Protocollo Step-by-step

- (i) preparazione dei terreni di crescita completi specifici per ciascuna linea cellulare secondo il protocollo del produttore
- (ii) sottocoltura della linea cellulare in fiasche di coltura cellulare (**passaggi 12-22 dal protocollo di sottocoltura**)
- (iii) conteggio del numero di cellule utilizzando l'emocitometro o il contatore cellulare automatizzato Countess II FL (**passaggio 23 dal protocollo di subcoltura**)
- (iv) semina di cellule a una densità di semina adeguata (specifica per ciascuna linea cellulare) - 1×10^5 cellule/pozzetto/1500 μ l di terreno di crescita completo in piastre da 12 pozzetti
- (v) ispezione microscopica della confluenza delle cellule per avviare la fase di stimolazione/trattamento
- (vi) preparazione delle diluizioni dei composti da testare in provette Eppendorf sterili da 1,5 mL etichettate con il nome/codice del composto e la concentrazione
- (vii) preparazione della soluzione di controllo positivo (5 μ M di Staurosporina e 0,5% Triton-X 100 – a seconda delle raccomandazioni del produttore)
- (viii) modellazione di un modello per la piastra corrispondente all'esperimento (la valutazione di diverse concentrazioni di composti di prova) che includono: controllo negativo (cellule non trattate), controllo positivo (soluzioni di Staurosporina 5 μ M e Triton-X 100 allo 0,5%), diluizione serie per i composti di prova e serie di diluizioni per il solvente
- (ix) quando le cellule raggiungono la confluenza appropriata (70-80%), il vecchio terreno viene scartato e sostituito con crescita fresca contenente rispettivamente i composti in esame e le diluizioni del solvente
- (x) incubazione della piastra per 24/48/72 h (a seconda dello scopo della ricerca) a 37°C e 5% CO₂.
- (xi) trascorso il tempo desiderato, il terreno di coltura viene scartato da ciascun pozzetto e le cellule vengono lavate 2-3 volte con 1,5 mL di PBS
- (xii) aggiunta di soluzione/pozzetto colorante DAPI 300 nM nella quantità necessaria a coprire tutte le cellule
- (xiii) la piastra viene incubata per un massimo di 5 minuti in un luogo protetto dalla luce diretta
- (xiv) la soluzione colorante viene aspirata
- (xv) le cellule vengono lavate con PBS 2-3 volte



Co-funded by
the European Union



(xvi) le cellule vengono fotografate utilizzando un microscopio a fluorescenza invertito o Cytation 1

[\[https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html\]](https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html)

Nota!!! Il protocollo di colorazione DAPI può essere eseguito anche in formati di piastre da 96 o 6 pozzetti, con la menzione che il numero di cellule seminate e i volumi dei reagenti devono essere regolati di conseguenza!!!

Colorazione citoscheletrica

Il citoscheletro è una matrice che supporta la forma e la funzione delle cellule che svolgono ruoli essenziali nel trasporto, nella divisione, nella motilità e nella segnalazione degli organelli, nonché nella salute cellulare e nei processi patologici.

Colorazione TexasRed™-X Falloidina su cellule fissate

La falloidina Texas Red-X viene utilizzata per la quantificazione della F-actina, la colorazione è compatibile con altri coloranti fluorescenti utilizzati in vitro. Questo metodo viene utilizzato per la discriminazione ad alto contrasto della colorazione dell'actina. In generale, la falloidina rossa del Texas può essere studiata anche in combinazione con altre colorazioni per osservazioni più ampie e analisi con maggiore specificità.

Principio del metodo: La falloidina è un peptide biciclico e si lega alla F-actina con elevata selettività consentendo la visualizzazione delle fibre di actina in fluorescenza rossa. La falloidina non è un reagente permeabile alle cellule, pertanto si consiglia la fissazione e la permeabilizzazione delle cellule prima dell'aggiunta del colorante falloidina Texas Red-X

[\[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf\]](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf).

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- Texas Red™-X Phalloidin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Lionheart FX automated microscope (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- Controllo negativo: cellule non trattate
- Composti di prova
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame



* **Note: È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.**

Protocollo Step-by-step

- (i) preparazione dei terreni di crescita completi specifici per ciascuna linea cellulare secondo il protocollo del produttore
- (ii) sottocoltura della linea cellulare in fiasche di coltura cellulare (**passaggi 12-22 dal protocollo di sottocoltura**)
- (iii) conteggio del numero di cellule utilizzando l'emocitometro o il contatore cellulare automatizzato Countess II FL (**passaggio 23 dal protocollo di subcoltura**)
- (iv) semina delle cellule (1×10^4 cellule/pozzetto/200 μ L) in piastre nere da 96 pozzetti con pozzetti trasparenti con fondo piatto in vetro
- (v) ispezione microscopica della confluenza delle cellule per avviare la fase di stimolazione/trattamento
- (vi) preparazione delle diluizioni dei composti da testare in provette Eppendorf sterili da 1,5 mL etichettate con il nome/codice del composto e la concentrazione
- (vii) modellazione di un modello per la piastra corrispondente all'esperimento (la valutazione di diverse concentrazioni di composti di prova) che include: controllo negativo (cellule non trattate), serie di diluizioni per i composti di prova e serie di diluizioni per il solvente
- (viii) quando le cellule raggiungono la confluenza appropriata (70-80%), il vecchio terreno viene scartato e sostituito con crescita fresca contenente rispettivamente i composti in esame e le diluizioni del solvente
- (ix) incubazione della piastra per 24/48/72 ore (a seconda dello scopo della ricerca) a 37°C e 5% CO₂.
- (x) dopo il periodo di incubazione, il terreno di coltura viene rimosso e le cellule vengono lavate con PBS due volte
- (xi) il campione viene fissato in una soluzione di formaldeide priva di metanolo al 3,7% in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente - 100 μ L/pozzetto
- (xii) lavare 2 volte con PBS
- (xiii) incubare il campione in una soluzione bloccante contenente l'1% di BSA in PBS per circa 45 minuti a temperatura ambiente in un volume di 100 μ L/pozzetto
- (xiv) i campioni vengono incubati nella soluzione colorante per 30-60 minuti a temperatura ambiente;
- (xv) lavare 2 volte con PBS;



Co-funded by
the European Union



(xvi) se necessario, aggiungere un colorante di contrasto per DNA (per l'analisi dei nuclei). Ad esempio è possibile aggiungere la colorazione DAPI (colorazione eseguita secondo i passaggi descritti sopra nella sezione - **Colorazione DAPI**);

(xvii) Immagine delle cellule (conservazione adeguata delle piastre per circa un mese per immagini conclusive)

Nota!!! *Le piastre possono essere conservate a 4°C ed è possibile aggiungere un conservante; le piastre stoccate vengono sigillate con apposito adesivo e successivamente avvolte con un foglio di alluminio!!!*

Protocollo di colorazione della tubulina CellLight™ GFP su cellule vive

Principio del metodo: I reagenti CellLight contengono fusioni di peptidi e proteine fluorescenti mirate a specifiche strutture cellulari, nel presente caso, fibre di tubulina, per applicazioni di imaging di cellule vive. Può essere applicato anche su celle fisse [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf].

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- CellLight™ Tubulin-GFP, BacMam 2.0 reagent (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Lionheart FX automated microscope (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- Controllo negativo: cellule non trattate
- Composti di prova
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

*** Note: È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.**

Protocollo Step-by-step

- (i) seguire i passaggi (i) – (ix) descritti in precedenza per la colorazione TexasRed™-X Phalloidin
- (ii) calcolare il volume di CellLight® per il numero di celle con la formula fornita nel protocollo del produttore [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf]



Co-funded by
the European Union



$$\text{Volume of CellLight}^{\text{®}} \text{ Reagent (mL)} = \frac{\text{number of cells} \times \text{desired PPC}}{1 \times 10^8 \text{ CellLight}^{\text{®}} \text{ particles/mL}}$$

Where the number of cells is the estimated total number of cells at the time of labeling, PPC is the number of particles per cell, and 1×10^8 is the number of particles per mL of the reagent.

For example, to label 40,000 cells with a PPC of 30:

$$\text{Volume of CellLight}^{\text{®}} \text{ Reagent (mL)} = \frac{40,000 \times 30}{1 \times 10^8} = 0.012 \text{ mL (12 } \mu\text{L)}$$

- (iii) il reagente CellLight[®] viene miscelato per inversione per formare una soluzione omogenea;
- (iv) il volume di reagente precedentemente calcolato viene miscelato delicatamente con il mezzo di crescita cellulare completo e aggiunto nei pozzetti con le cellule
- (v) le cellule vengono incubate durante la notte
- (vi) acquisire l'immagine delle cellule utilizzando l'attrezzatura adeguata (microscopio automatizzato Cytation 1/Lionheart FX)

Nota!!! Se necessario, i nuclei delle cellule possono anche essere colorati con Hoechst 33342 (colorazione eseguita secondo i passaggi descritti sopra nella sezione – **Colorazione Hoechst 33342**).

4.3.3. Metodi per valutare la capacità di migrazione cellulare

Scratch Assay

La migrazione cellulare gioca un ruolo centrale in diversi processi biologici fondamentali, come lo sviluppo embrionale, la difesa immunitaria, la formazione di tessuti, la riparazione delle ferite, l'infiammazione e anche nella progressione del cancro. La capacità delle cellule di migrare evidenzia la loro capacità di adattarsi a un dato ambiente in termini di riconquista di una posizione adeguata e di svolgere le proprie funzioni; tuttavia, una migrazione cellulare ridotta si riscontra frequentemente in molteplici patologie (infiammazione, progressione del cancro, invasione e metastasi) o in seguito all'esposizione a diversi composti [Pijuan et al., 2019].

I test di guarigione delle ferite 2D in vitro, come il scratch assay, rappresentano approcci eccellenti e affidabili per studiare/monitorare il comportamento migratorio delle cellule in risposta a diversi stimoli (sostanze di interesse) o in diverse patologie [Pijuan et al., 2019]. Per le cellule sane, la riparazione delle ferite viene spesso utilizzata per osservare il comportamento migratorio delle cellule dopo aver trattato le cellule con i composti di interesse. Per le cellule malate, in particolare le cellule tumorali, il metodo mira a valutare l'impatto del trattamento sulla capacità delle cellule di invadere e sviluppare metastasi.



Principio del metodo: questo metodo viene utilizzato per misurare la capacità delle cellule di migrare in un dato intervallo di tempo (24 ore) in seguito all'esposizione a diversi stimoli (composti analizzati per effetti biologici o nocivi).

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- Lionheart FX automated microscope (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- BioTek AutoScratch wound making tool (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- Composti di prova
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

*** Note: È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.**

Protocollo Step-by-step

- (i) seminare le cellule a seconda della linea cellulare secondo i protocolli del produttore (**vedere i passaggi 12-22 del protocollo di subcoltura**)
- (ii) un numero appropriato di cellule (a seconda della linea cellulare) viene coltivato in piastre da 96 o 24 pozzetti fino alla confluenza desiderata (generalmente 90-95%)
- (iii) modellare un modello per la piastra corrispondente all'esperimento (la valutazione di diverse concentrazioni di composti di prova) che include: controllo negativo (cellule non trattate), serie di diluizioni per i composti di prova e serie di diluizioni per il solvente
- (iv) quando viene raggiunta la confluenza desiderata, il vecchio terreno viene scartato e la linea di graffio viene disegnata manualmente (utilizzando una punta di pipetta sterile) o automaticamente utilizzando lo strumento per la creazione di ferite BioTek AutoScratch al centro di ciascun pozzetto
- (v) rimuovere i detriti e le cellule non attaccate lavando 2 volte con PBS preriscaldato
- (vi) sostituire il PBS con un terreno di crescita completo fresco contenente rispettivamente i composti di interesse e le diluizioni del solvente
- (vii) incubazione della piastra per 24 ore a 37°C e 5% di CO₂.
- (viii) durante l'intera procedura viene seguita l'evoluzione delle cellule e vengono scattate foto in modo che alla fine del tempo assegnato per l'esperimento i risultati possano essere analizzati
- (ix) analisi dei dati utilizzando specifici strumenti bioinformatici.

Note!!!



- ❖ Il metodo mira a valutare l'effetto di diversi composti o sostanze di interesse sulle linee cellulari, questo effetto può essere stimolatorio o inibitorio sul processo di migrazione/invasione delle cellule in coltura.
- ❖ Per una migliore analisi dei dati, i pozzi vengono fotografati in diversi momenti (0h, 3h, 8h e 24h) fino alla fine del periodo di trattamento.
- ❖ Lo scratch può essere effettuato manualmente o automaticamente utilizzando appositi dispositivi (auto-scratchers) (Figura 4.12).



Figura 4.12. Strumento per la creazione di ferite BioTek AutoScratch

4.3.4. Test di biologia molecolare per lo studio dei meccanismi d'azione

Reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa (RT-PCR)

La RT-PCR è una tecnica di laboratorio che prevede la creazione di diverse copie di una sequenza genetica per analizzarla. È anche nota come reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa [<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/rt-pcr>].

Principio del metodo: la procedura determina l'effetto indotto dai campioni da analizzare sull'espressione genica, a livello di RNA messaggero, di marcatori specifici a seconda dell'esperimento proposto. Questa tecnica valuta i cambiamenti che possono verificarsi in un gene, in un cromosoma o per l'attivazione di geni, che spesso porta alla diagnosi di una patologia.

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Tadvanced Biometra Product line (Analytik Jena AG, Göttingen, Germany)
- DS-11 spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA)
- ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- peqGold RNAPure™ Package (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany)



Co-funded by
the European Union



- Maxima[®] First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
- Power SYBR-Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
- Primers pairs of interest (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
- PCR specific 96-well plates or tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
- Composti di prova
 - Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

* **Note: È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.**

Protocollo Step-by-step

- (i) seminare le cellule a seconda della linea cellulare secondo i protocolli del produttore **(vedere i passaggi 12-22 del protocollo di subcoltura)**
- (ii) un numero appropriato di cellule (a seconda della linea cellulare) viene coltivato in piastre da 6 pozzetti fino alla confluenza desiderata
- (iii) modellare un modello per la piastra corrispondente all'esperimento (la valutazione di diverse concentrazioni di composti di prova) che include: controllo negativo (cellule non trattate), serie di diluizioni per i composti di prova e serie di diluizioni per il solvente
- (iv) le cellule vengono stimulate con i composti di interesse e poi incubate in condizioni ottimali per il tempo desiderato: 24, 48 o 72 ore
- (v) Fase di isolamento dell'RNA, questa fase viene eseguita su ghiaccio come segue:
 - a. il vecchio terreno di coltura viene rimosso e le cellule vengono lavate con 2 mL di PBS
 - b. le cellule vengono staccate dalla piastra utilizzando il raschietto cellulare in 1 mL di PBS (Figure 4.13)

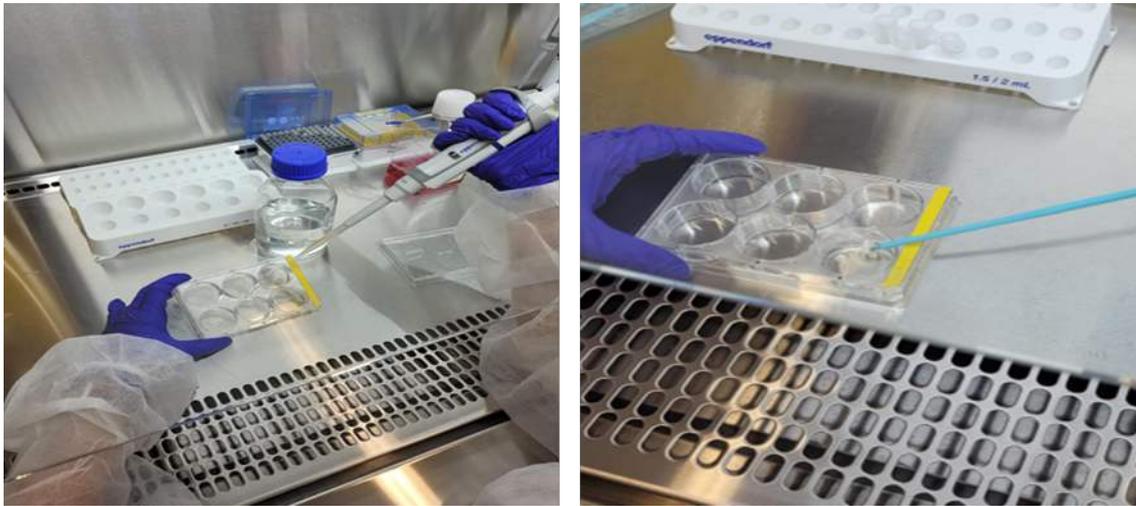


Figura 4.13. Preparazione delle cellule per la fase di isolamento dell'RNA

- c. la sospensione formatasi in ciascun pozzetto viene trasferita in provette Eppendorf da 1,5 mL precedentemente preparate (etichettate con il nome/codice del campione e la data della procedura e avvolte con nastro adesivo) e mantenute in ghiaccio fino all'aggiunta della sospensione (Figura 4.14)



Figura 4.14. Aspirazione della sospensione cellulare

- d. la sospensione viene centrifugata a 12.000xg per 5 minuti a 4°C
e. il surnatante viene rimosso e il sedimento viene mantenuto a -20°C nel caso in cui non avvenga l'isolamento dell'RNA in quel momento



- f. l'isolamento dell'RNA viene eseguito utilizzando il pacchetto peqGold RNAPure™ (o altro kit equivalente) e i protocolli seguono le istruzioni del produttore
 - g. il sedimento ottenuto dopo l'isolamento dell'RNA viene risospeso in 50 µL di acqua DEPC, viene riscaldato per 30 minuti a 55°C (per aumentare la solubilità dell'ARN) e quindi viene misurata la concentrazione di RNA utilizzando lo spettrofotometro DS-11
- (vi) il passo successivo è la sintesi del DNA complementare utilizzando un kit specifico (Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit)
- (vii) la fase RT-PCR prevede le seguenti fasi:
- a. Selezione delle coppie di primer di interesse
 - b. Preparazione della miscela contenente i primer, il cDNA risultante e la SYBR-Green PCR Master Mix
 - c. Pipettare la miscela nella piastra
 - d. Reazione PCR utilizzando il sistema PCR in tempo reale QuantStudio 5
- (viii) Data analysis

4.4. Test cellulare utilizzando modelli 3D (tridimensionali).

I modelli 2D in vitro, che rappresentano colture cellulari aderenti a monostrato, sono i modelli in vitro più utilizzati. Tuttavia, a causa della limitazione della geometria planare, questo tipo di modello prevede scarsamente il comportamento in vivo. Pertanto, i modelli 3D in vitro di nuova formulazione costituiscono un ponte tra i modelli in vitro e quelli in vivo e riproducono le caratteristiche fisiologiche e fisiopatologiche dei tessuti originali, simulando la struttura 3D in vivo. Le strutture 3D, grazie alla configurazione spaziale, possiedono una migliore rappresentazione del contatto cellula-cellula e cellula-matrice nel microambiente nativo in vivo. Questi modelli producono un'impressione realistica del trasporto di gas, nutrienti o molecole di segnalazione. Inoltre, i modelli 3D in vitro possono ricreare la struttura complessa del tumore e mantenere le caratteristiche genotipiche e fenotipiche insieme all'eterogeneità del tumore [Leonard and Godin, 2016; Jubelin et al., 2022; Mu et al., 2023].

I modelli 3D utilizzati nel nostro laboratorio come strumenti per eseguire studi farmacotossicologici erano i tessuti EpiDerm dell'epidermide umana ricostruita 3D (RHE) di MatTek Corporation (Slovacchia). Questi tessuti EpiDerm ricostruiti in 3D sono sistemi pronti all'uso costituiti da cheratinociti epidermici normali di derivazione umana (NHEK) coltivati su inserti di coltura tissutale appositamente preparati [<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>]. I



Co-funded by
the European Union



tessuti 3D EpiDerm presentano la struttura epidermica umana, compreso lo strato basale proliferativo, gli strati spinosi e granulari e anche gli strati epidermici cornificati [<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>]. Questo modello 3D in vitro è stato convalidato dalle linee guida ECVAM (Centro europeo per la validazione di metodi alternativi) e OCSE (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) come sistema modello in vitro per test chimici, farmaceutici e di prodotti per la cura della pelle.

4.4.1. Determinazione del potenziale irritante (EpiDerm Skin Irritation test – OECD TG 439)

Principio del metodo: il test consiste in un'esposizione topica dei composti di prova puri a un modello di epidermide umana ricostruita (RhE) seguita da un test di vitalità cellulare. La riduzione della vitalità dei tessuti esposti alle sostanze chimiche rispetto ai controlli negativi (trattati con acqua) viene utilizzata per prevedere il potenziale di irritazione cutanea [<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf>].

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- EPI-200-SIT Kit Components (MatTek Corporation)
- MTT-100 kit components (MatTek Corporation)
- Composti di prova
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

* **Note: È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.**

Protocollo Step-by-step

🕒 Durata 4 giorni

- al ricevimento, gli inserti contenenti i tessuti vengono rimossi dall'agarosio e trasferiti in una piastra a 6 pozzetti in 900 µl/pozzetto di mezzo di test, per 4 ore, in condizioni specifiche (37 °C e 5% CO₂)
- dopo il periodo di 4 ore, il terreno aggiunto inizialmente viene sostituito con 900 µL/pozzetto di terreno fresco preriscaldato e incubato fino al giorno successivo
al giorno successivo si cambia il terreno e si applicano i campioni di prova sulla parte superiore degli inserti contenenti i tessuti; inizialmente, la superficie del tessuto viene inumidita (25 µl di soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco - DPBS),



dopodiché vengono aggiunti 100 mg di campione/inserto e incubati per 18 ore (Figura 4.15)



Figura 4.15. Manipolazione dei tessuti EpiDerm ricostruiti in 3D al momento della ricezione. (iii) anche il controllo positivo (PC) - Triton X-100 1% e il controllo negativo (NC) - acqua ultrapura vengono aggiunti sulla parte superiore degli inserti con i tessuti e incubati per 18 ore;

(iv) il test MTT viene effettuato come segue:

- a. dopo il periodo di stimolazione di 18 ore, gli inserti vengono lavati con DPBS e trasferiti in una piastra da 24 pozzetti contenente 300 μ L/pozzetto di MTT (1 mg/mL) e incubati per 3 ore
- b. dopo le 3 ore di incubazione, gli inserti vengono rimossi e posti in 2 mL di soluzione estraente in una nuova piastra da 24 pozzetti per 2 ore a temperatura ambiente, al riparo dalla luce
- c. quindi, 200 μ L/pozzetto della soluzione di estrazione vengono aggiunti a una nuova piastra da 96 pozzetti e le assorbanze vengono misurate spettrofotometricamente alle corrispondenti lunghezze d'onda (570 nm e 650 nm).



- d. La vitalità dei campioni viene calcolata utilizzando la formula [Pinzaru et al., 2021]:

$$\text{Vitalità \%} = \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{NC}} \times 100$$

$$\text{Vitalità relativa TS \%} = \text{OD}_{\text{TS}} / \text{Mean of OD}_{\text{NC}} \times 100$$

$$\text{Vitalità relativa NC \%} = \text{OD}_{\text{NC}} / \text{Mean of OD}_{\text{NC}} \times 100$$

$$\text{Vitalità relativa y PC \%} = \text{OD}_{\text{PC}} / \text{Mean of OD}_{\text{NC}} \times 100$$

dove: TS = sostanza, NC = controllo negativo, PC = controllo positivo, OD = densità ottica.

4.4.2. Determinazione della fototossicità (EpiDerm Phototoxicity Assay – OECD TG 498)

Principio del metodo: misura la risposta tossica acuta dopo l'esposizione della pelle a determinate sostanze chimiche e la successiva esposizione alla luce o indotta in modo simile dall'irradiazione cutanea dopo la somministrazione sistemica di una sostanza chimica. [<https://www.mattek.com/application/phototoxicity/>].

Materiali necessari per condurre il test in aggiunta alla tabella delle risorse chiave descritta per lo scongelamento/sottocoltura/crioconservazione di una linea cellulare:

- EPI-200 Kit Components (MatTek Corporation)
- MTT-100 kit components (MatTek Corporation)
- UVA-vis Irradiation equipment - Biospectra
- Composti di prova
- Selezione del solvente appropriato per la solubilizzazione dei composti in esame

* **Note:** È possibile utilizzare anche reagenti, materiali di consumo e apparecchiature equivalenti di altri fornitori.

Protocollo Step-by-step

🕒 Durata 4 giorni

- al ricevimento, gli inserti contenenti i tessuti vengono rimossi dall'agarosio e trasferiti in una piastra a 6 pozzetti in 900 µl/pozzetto di mezzo di test, per 1 ora, in condizioni specifiche (37 °C e 5% CO₂)
- dopo il periodo di 1 ora, il terreno aggiunto inizialmente viene sostituito con 900 µL/pozzetto di terreno fresco preriscaldato e incubato fino al giorno successivo
- il giorno successivo si cambia il terreno e si applicano i campioni di prova sulla parte superiore degli inserti contenenti i tessuti; inizialmente, la superficie del tessuto viene



- inumidita (25 µl di soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco - DPBS), dopodiché vengono aggiunti 100 mg di campione/inserto e incubati per 18 ore
- (iv) Le lastre rivestite vengono esposte ai raggi UVA a 6 J/cm², e parallelamente le lastre non esposte vengono mantenute a temperatura ambiente al buio. Etichettare i coperchi delle piastre per identificare i tessuti esposti ai raggi UVA.
- (v) dopo questa fase, ciascun inserto viene lavato con DPBS e trasferito in nuove piastre contenenti 900 µl di terreno/pozzetto e incubato per 18-24 ore a 37 °C e 5% di CO₂.
- (vi) Il terzo giorno, gli inserti vengono lavati con DPBS e trasferiti in una piastra a 24 pozzetti con 300 µl di MTT/pozzetto, dopodiché vengono analizzati secondo il protocollo di cui sopra.

$$\text{RTV \%} = \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{vehicle control}} \times 100$$

$$\text{RTV control \%} = \text{OD}_{\text{vehicle control}} / \text{OD}_{\text{mean vehicle control}} \times 100,$$

dove: RTV = vitalità relativa del tessuto, OD = densità ottica.

Bibliografia

Capula M, Corno C, El Hassouni B, Li Petri G, Arandjelović S; EORTC PAMM Group. A Brief Guide to Performing Pharmacological Studies In Vitro: Reflections from the EORTC-PAMM Course "Preclinical and Early-phase Clinical Pharmacology". *Anticancer Res* 2019; 39(7): 3413-3418.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* 2014; 111(6): 1021-46.

Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017:151-72.

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*. 2005; 33(3): 261-87.

American Type Culture Collection (ATCC) Animal Cell Culture Guide. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>

ThermoFisher Scientific. Gibco Cell Culture Basics. <https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>

Merck. ECACC Handbook - Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook – 4th Edition. <https://www.sigmaaldrich.com/RO/en/campaigns/ecacc-handbook-download>



Co-funded by
the European Union



Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. Food Frontiers 2020; 1(3) :332-349.

Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Curr Pharm Biotechnol 2016; 17(14): 1213-1221.

Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, Larramendy ML, Soloneski S (Eds). InTechOpen, Rijeka, 2017.

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Int J Mol Sci. 2021; 22(23): 12827.

MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K. <https://www.atcc.org/products/30-1010k>
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/AlamarBluePIS.pdf>

Iftode A, Drăghici GA, Macașoi I, Marcovici I, Coricovac DE, Dragoi R, et al. Exposure to cadmium and copper triggers cytotoxic effects and epigenetic changes in human colorectal carcinoma HT-29 cells. Exp Ther Med. 2021; 21(1): 100.

Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. Methods Mol Biol. 2019; 1897: 299-311.

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011717_Hoechst_33342_UG.pdf
<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf>

Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. Front Cell Dev Biol 2019; 7: 107.

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/rt-pcr>

Leonard F, Godin B. 3D In Vitro Model for Breast Cancer Research Using Magnetic Levitation and Bioprinting Method. Methods Mol Biol. 2016; 1406: 239-51.



Co-funded by
the European Union



Jubelin C, Muñoz-Garcia J, Griscom L, Cochonneau D, Ollivier E, Heymann MF, et al. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell Biosci* 2022; 12(1): 155.

Mu P, Zhou S, Lv T, Xia F, Shen L, Wan J, et al. Newly developed 3D in vitro models to study tumor-immune interaction. *J Exp Clin Cancer Res* 2023; 42(1): 81.

<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>

<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf>

Pinzaru I, Tanase A, Enatescu V, Coricovac D, Bociort F, Marcovici I, et al. Proniosomal Gel for Topical Delivery of Rutin: Preparation, Physicochemical Characterization and In Vitro Toxicological Profile Using 3D Reconstructed Human Epidermis Tissue and 2D Cells. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(1): 85.

<https://www.mattek.com/application/phototoxicity/>



Capitolo 5. L'uso dei metodi *in ovo* per la valutazione dell'attività biologica (CO - UMFVBT)

5.1. Introduzione

L'angiogenesi, la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti, svolge un ruolo cruciale in vari processi fisiologici e patologici, tra cui la crescita del tumore e la metastasi. La valutazione del potenziale antiangiogenico dei composti è essenziale per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. In questo contesto, il test *in ovo* della membrana corioallantoica (CAM) è emerso come uno strumento prezioso per valutare l'attività biologica delle sostanze sull'angiogenesi [Moreno-Jiménez et al., 2016].

Il test CAM prevede l'utilizzo della membrana corioallantoidea degli embrioni di pollo in via di sviluppo, che è altamente vascolarizzata e sensibile agli stimoli angiogenici. Questo modello consente l'osservazione diretta della formazione dei vasi sanguigni e fornisce un'alternativa economica ed eticamente accettabile ai tradizionali test *in vivo*. Il test CAM è stato ampiamente utilizzato nello studio dell'angiogenesi grazie alla sua semplicità, riproducibilità e rilevanza per la fisiologia umana [Moreno-Jiménez et al., 2016].

I ricercatori hanno utilizzato il test CAM per valutare il potenziale antiangiogenico di vari composti. Ad esempio, è stato dimostrato che il bioconiugato del derivato dell'acido B-oleanolico della rodamina esibisce capacità antiangiogeniche, dimostrando effetti inibitori significativi sulla formazione dei vasi sanguigni [Mangır et al., 2019]. Allo stesso modo, composti naturali come quelli isolati dalle parti aeree della *Salvia officinalis* sono stati studiati per la loro attività antiangiogenica utilizzando il test CAM, mostrando risultati promettenti nell'inibizione della formazione di vasi sanguigni necessari per la crescita embrionale [Reichling et al., 2006].

Inoltre, il test CAM è stato determinante nella valutazione delle proprietà antiangiogeniche di diversi composti, inclusi complessi organometallici [Fathalla et al., 2017], dendrimeri [Kluge et al., 2016] e frazioni di veleno [Coelho et al., 2019]. Questi studi evidenziano la versatilità del test CAM nel valutare gli effetti di diverse sostanze sull'angiogenesi, fornendo preziose informazioni su potenziali interventi terapeutici mirati alla formazione aberrante di vasi sanguigni.

Inoltre, il test CAM è stato utilizzato non solo nel campo dell'oncologia, ma anche nell'ingegneria dei tessuti, dimostrando la sua applicabilità nello studio della rigenerazione ossea e della biocompatibilità dei biomateriali [Butt et al., 2018]. La capacità del test di valutare sia la biocompatibilità che la risposta angiogenica ai biomateriali ne sottolinea l'utilità in varie



aree di ricerca oltre agli studi sull'angiogenesi. Il test CAM in ovo costituisce uno strumento prezioso e versatile per valutare il potenziale antiangiogenico dei composti. La sua semplicità, il rapporto costo-efficacia e la rilevanza per la fisiologia umana lo rendono una scelta preferita per i ricercatori che studiano l'angiogenesi e sviluppano nuovi agenti terapeutici mirati alla formazione dei vasi sanguigni.

5.2. Determinazione del potenziale antiangiogenico mediante test CAM

Protocollo Step-by-step

Nota!!! Questa è una versione leggermente modificata del protocollo sui metodi di prova raccomandati dall'ICCVAM!!!

- 1) Preparazione delle uova:
 - l'incubatrice viene preparata alcune ore prima dell'incubazione delle uova. L'intera superficie dell'incubatrice viene disinfettata con salviette ed etanolo al 70%. La temperatura è impostata a 37,5 0C e l'umidità è a 60 %.
 - Per la cova vengono utilizzate uova fresche e fertili, di peso compreso tra 50 e 60 g, provenienti da galline (Figura 5.1.) allevate in condizioni ottimali. Prima di essere messe nell'incubatrice, le uova vengono lavate con acqua tiepida e una spugna, oppure possono essere pulite con fazzoletti ed etanolo al 70% senza agitare.

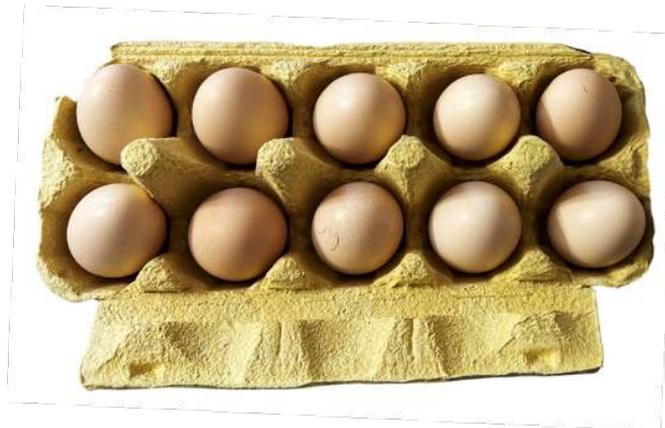


Figura 5.1. Uova di gallina fertili di peso compreso tra 50-60 g.

- Si usa una matita per segnare sulle uova la data in cui vengono messe nell'incubatrice (Figura 5.2).



Figura 5.2. Le uova sono datate e disinfettate.

- Le uova vengono poste nel vassoio dell'incubatrice in posizione orizzontale (Figura 5.3).



Figura 5.3. Uova poste nell'incubatrice (1° giorno).

- Il 4° giorno di incubazione si praticano due fori alle due estremità dell'uovo utilizzando una pinza e si estraggono 5-8 ml di albume (albume) dalla sommità dell'uovo utilizzando una siringa e si travasano in un contenitore di raccolta. I due fori vengono poi coperti con nastro adesivo medicale e rimessi nell'incubatrice (Figure 5.4 e 5.5).

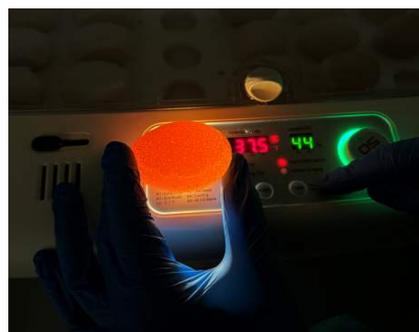




Figura 5.4. Controllare con una fonte di luce se gli embrioni si stanno sviluppando o meno (4° giorno).



Figura 5.5. Uova poste nell'incubatrice dopo l'estrazione dell'albume (4° giorno).

- Il quinto giorno di incubazione, un grande pezzo di nastro adesivo viene incollato all'uovo tenuto orizzontalmente per ritagliare una grande finestra con una pinza per esporre la membrana corioallantoidea e i vasi sanguigni. La finestra delle uova che mostrano embrioni vitali viene quindi coperta con un grande pezzo di nastro adesivo per evitare la disidratazione e vengono reintrodotte nell'incubatrice fino all'esecuzione dei test sperimentali (Figure 5.6 - 5.8).



Figura 5.6. Taglio di una grande finestra con una pinza per esporre la membrana corioallantoidea e i vasi sanguigni (5° giorno).



Figura 5.7. Uova ricoperte con nastro adesivo per evitare la disidratazione (5° giorno).





Figura 5.8. Embrione di pulcino circondato da vasi sanguigni (5° giorno).

- Ogni giorno viene controllato che i parametri di temperatura e umidità siano mantenuti ai valori stabiliti per uno sviluppo ottimale dell'embrione [Comitato di coordinamento interagenzia per la validazione dei metodi alternativi (ICCVAM), ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane. 2010. Available online: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>].
- 2) applicazione di un anello su un'area vascolarizzata il giorno 8 di incubazione dell'uovo, all'interno del quale vengono applicati 10 μ L del campione da testare (Figura 5.9)

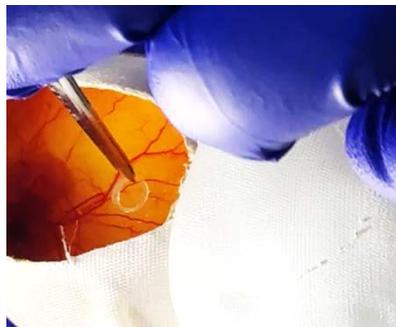


Figura 5.9. Applicazione dell'anello al CAM per applicare i campioni per i test di angiogenesi (8° giorno).

- 3) i campioni vengono applicati per 5 giorni sul ring, scattando foto prima di ogni applicazione e dopo l'applicazione dei campioni
- 4) durante tutto l'esperimento, le uova vengono mantenute nell'incubatrice ai parametri ottimali impostati.

5.3. Determinazione del potenziale irritante e antiirritante

Il test HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) è un metodo ampiamente utilizzato per valutare il potenziale irritante e antiirritante di varie sostanze. Questo test prevede l'osservazione della membrana corioallantoidea delle uova di gallina fecondate per valutare gli effetti delle sostanze in esame. Il test CAM è stato riconosciuto come un modello affidabile per lo studio delle risposte dei tessuti, dell'angiogenesi e della biocompatibilità [Moreno-Jiménez et al., 2016; Mangır et al., 2019].

I ricercatori hanno adattato il test HET-CAM per determinare il potenziale di irritazione di sostanze come gli oli essenziali e i loro componenti, fornendo uno strumento prezioso per valutare le sostanze irritanti non gravi per gli occhi e le mucose [Reichling et al., 2006]. Inoltre, gli studi hanno utilizzato il test HET-CAM per confermare la non irritazione di formulazioni come



i gel in situ, dimostrando la loro capacità di proteggere da sostanze fortemente irritanti [Fathalla et al., 2017].

Il test HET-CAM è stato impiegato anche in vari campi oltre alle valutazioni di biocompatibilità. Ad esempio, è stato utilizzato per valutare la mutagenicità dei trattamenti con getto di plasma e per valutare la citotossicità della nano-idrossiapatite nei cosmetici per l'igiene orale [Kluge et al., 2016; Coelho et al., 2019]. Inoltre, il test è stato determinante nello studio del potenziale di irritazione congiuntivale delle microemulsioni progettate per combattere l'oftalmia neonatorum causata da agenti patogeni come *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus* [Butt et al., 2018].

Inoltre, il test HET-CAM è stato riconosciuto come uno strumento prezioso per prevedere il potenziale di irritazione oftalmica, mostrando una buona correlazione con le situazioni in vivo [McKenzie et al., 2015]. Ciò ne evidenzia l'importanza nell'industria farmaceutica per valutare l'irritabilità di varie formulazioni destinate all'uso oculare.

Protocollo Step-by-step

Nota!!! La preparazione delle uova viene effettuata come descritto nella fase 1 del protocollo per la determinazione del potenziale antiangiogenico!!!

- 1) l'ottavo giorno di incubazione, 600 μ L del campione vengono applicati alla membrana corioallantoidea degli embrioni e si osservano allo stereomicroscopio i cambiamenti nel plesso vascolare per 300 secondi (Figura 5.10).



Figura 5.10. Una finestra aperta che rivela la CAM e i vasi sanguigni dell'embrione di pulcino (8° giorno).

- 2) si osservano segni di lisi, emorragia o coagulazione e il momento in cui si verificano questi processi è annotato in una tabella
- 3) in base ai valori ottenuti viene calcolato un punteggio di irritabilità da cui si stima il potenziale irritante dei campioni in esame.

In conclusione, il test HET-CAM è un metodo versatile e affidabile per valutare il potenziale irritante e antiirritante in varie applicazioni. La sua capacità di fornire informazioni preziose sulle risposte dei tessuti, sulla biocompatibilità e sull'irritazione lo rende uno strumento



Co-funded by
the European Union



prezioso per i ricercatori e le industrie coinvolte nello sviluppo di prodotti che vanno dai cosmetici ai prodotti farmaceutici.

Bibliografia

Moreno-Jiménez I, Hulsart-Billström G, Lanham S, Janeczek A, Kontouli N, Kanczler J et al. The Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay For The Study Of Human Bone Regeneration: A Refinement Animal Model For Tissue Engineering. *Scientific Reports* 2016; 6(1).

Mangır N, Dikici S, Claeysens F, MacNeil S. Using Ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay To Evaluate The Biocompatibility And Angiogenic Response To Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2019; 5(7): 3190-3200.

Reichling J, Suschke U, Schneele J, Geiss H. Antibacterial Activity And Irritation Potential Of Selected Essential Oil Components – Structure-Activity Relationship. *Natural Product Communications* 2006; 1(11): 1934578X0600101.

Fathalla Z, Vangala A, Longman M, Khaled K, Hussein A, El-Garhy O, et al. Poloxamer-Based Thermoresponsive Ketorolac Tromethamine In Situ Gel Preparations: Design, Characterisation, Toxicity, And Transcorneal Permeation Studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2017; 114: 119-134.

Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, et al. Investigating The Mutagenicity Of A Cold Argon-Plasma Jet In An HET-MN Model. *Plos One* 2016; 11(9):

Coelho C, Grenho L, Gomes P, Quadros P, Fernandes M. Nano-Hydroxyapatite In Oral Care Cosmetics: Characterization And Cytotoxicity Assessment. *Scientific Reports* 2019; 9(1).

Butt U, ElShaer A, Snyder L, Al-Kinani A, Gresley A, Alany R. Fatty Acid Based Microemulsions To Combat Ophthalmia Neonatorum Caused By *Neisseria gonorrhoeae* And *Staphylococcus aureus*. *Nanomaterials* 2018; 8(1): 51.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane. 2010. Available online: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

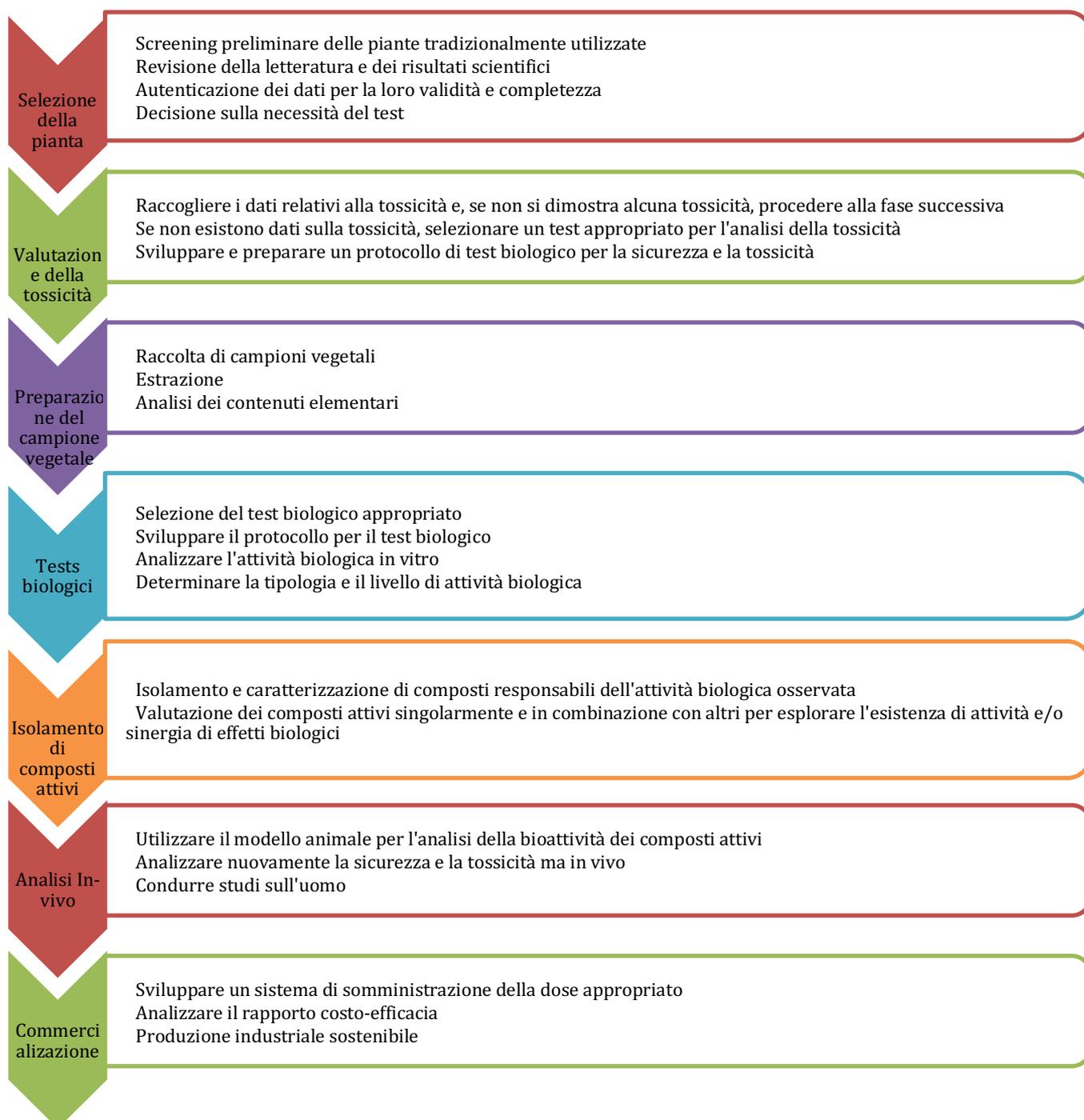
McKenzie B, Kay G, Matthews K, Knott R, Cairns D. The Hen's Egg Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test To Predict The Ophthalmic Irritation Potential Of A Cysteamine-Containing Gel: Quantification Using Photoshop® And ImageJ. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 490(1-2): 1-8.



Capitolo 6. Metodi per ottenere preparati dalle piante (estratto e oli essenziali)

6.1. Introduzione

Le industrie a base vegetale dipendono dalla preparazione di prodotti dalle piante. L'estrazione è il primo passo di qualsiasi studio sulle piante medicinali e svolge un ruolo significativo e cruciale sul risultato finale e sull'esito (Figura 6.1).





Co-funded by
the European Union



Figura 6.1. Il diagramma di flusso dello studio delle piante medicinali e la posizione delle tecniche di estrazione [Azmir et al., 2013].

I composti bioattivi dai materiali vegetali possono essere estratti mediante varie procedure di estrazione (Figura 6.2).

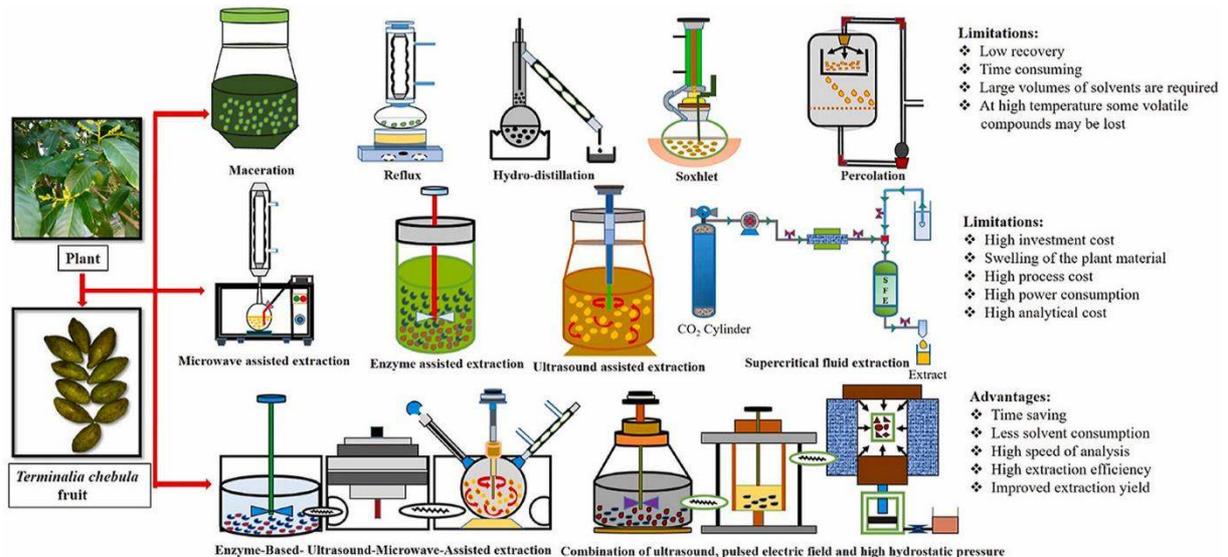


Figura 6.2. Tecniche di estrazione di composti bioattivi [Jha and Sit, 2022].

6.2. Macerazione

La maggior parte di queste tecniche si basano sul potere estrattivo dei diversi solventi utilizzati, come la macerazione (Figura 6.3-6.4).



Figura 6.3. Macerazione di *Pinus nigra* subsp. *laricio* Poiret (Foto originale)



Figura 6.4. Macerazione di *Capsicum baccatum*. (Foto originale)

Per estrazione si intende la separazione di una o più sostanze da una matrice, mediante trattamento con mezzi meccanici, chimici e termici.

La macerazione avviene in contenitori di acciaio che possono avere sia piccole che grandi capacità (1.000–10.000 litri) o altro materiale inerte sia verso la matrice solida che verso il solvente estraente. Il solido da estrarre viene introdotto nel contenitore completamente ricoperto dal solvente, in modo da ottenere l'estrazione più completa possibile. Il processo di estrazione è solitamente piuttosto lungo e richiede giorni o addirittura settimane per raggiungere il completamento. In questo processo di estrazione intervengono sia fenomeni di diffusione che di osmosi, che sono fortemente dipendenti dalla temperatura.

Solitamente l'uso del calore altera la componente termolabile del farmaco; pertanto, nella maggior parte dei casi è richiesto l'utilizzo di reagenti chimici, generalmente solventi organici che rendono permeabile la struttura chimica della membrana cellulare.

La macerazione, condotta a temperatura ambiente, riduce il rischio di degradazione termica del campione.

Protocollo Step-by-step

- 1) La pianta viene inizialmente separata da corpi estranei come terriccio e parti non idonee all'estrazione. Per aumentare il contatto tra il campione da estrarre ed il solvente la pianta è stata opportunamente tritata. Le particelle non devono essere troppo grandi altrimenti il solvente non riuscirebbe a penetrare nelle cellule più interne, ma non devono essere ridotte al minimo o allo stato di polvere; ciò comporterebbe la perdita dei principi attivi volatili contenuti all'interno della pianta e la difficile separazione per filtrazione del materiale vegetale dal liquido utilizzato, una volta terminato il tempo di macerazione.
- 2) Successivamente, ciascun campione viene immerso in solvente organico per 48 ore, all'interno di un contenitore ermetico, ripetendo la procedura 3 volte. I solventi indicati



dalla Farmacopea per l'estrazione dei principi attivi dalle droghe vegetali sono: acqua, alcool etilico ed etere etilico. Industrialmente se ne possono utilizzare altri, come l'alcool isopropilico e il toluene, che possono avere caratteristiche vantaggiose dal punto di vista commerciale o per il loro potere estrattivo. Il solvente deve essere scelto in base alla natura chimica dei composti contenuti nel campione. L'alcol è generalmente il solvente più utilizzato poiché è in grado di estrarre la maggior parte delle molecole contenute all'interno della pianta (principi attivi), siano esse idrofile, cioè solubili in acqua, oppure lipofile e quindi solubili in olio o altri solventi organici.

- 3) Successivamente il campione viene filtrato ed essiccato utilizzando l'evaporatore rotante con bagnomaria a 37 °C, la cui peculiarità è l'evaporazione a bassa pressione con una pompa a vuoto che consente punti di ebollizione molto inferiori a quelli a pressione ambiente in modo da abbassare la temperatura di ebollizione del solvente e favorirne l'evaporazione. La combinazione della temperatura del bagno e della pressione del vuoto consente una distillazione precisa delle frazioni solventi (Figura 6.5).



Figura 6.5. Estratto secco (Foto originale)

La tecnica di macerazione riguardante l'estrazione in fase acquosa presenta alcune varianti: l'infusione, che può essere rappresentata come una macerazione per tempi brevissimi in acqua bollente. In questo caso l'estrazione è sicuramente più veloce ma diventa più rapido anche il fenomeno di degradazione che interessa le sostanze termicamente labili. Un'altra variante della macerazione classica è il decotto. Si effettua ponendo la matrice a contatto con il solvente, operando alla temperatura di ebollizione, per un tempo variabile fino a 30 minuti o più.



Questa tecnica è quindi riservata a materiali compatti che presentano principi attivi resistenti al calore, la cui estrazione richiede l'intervento del calore. I decotti, come gli infusi, si alterano facilmente e hanno una validità limitata.

6.3. Estrazione con Soxhlet

L'estrattore Soxhlet (Figura 6.6) è un dispositivo in grado di separare in continuo cioè da una miscela solida i componenti scarsamente solubili da quelli insolubili utilizzando un solvente volatile.

L'apparecchio prende il nome da Franz von Soxhlet (1848-1926), che lo inventò nel 1879 per l'estrazione dei lipidi da un materiale solido, utilizzando l'etere etilico come solvente; il complesso dei componenti chimici separati prese il nome di estratto etero.



Figura 6.6. Estrattore Soxhlet (Foto originale)

L'estrattore Soxhlet è composto essenzialmente da 3 parti: a) pallone contenente il solvente; b) l'estrattore vero e proprio; c) condensatore a riflusso, raffreddato ad acqua. Inoltre, nell'estrattore un braccio laterale (1) consente il passaggio dei vapori di solvente al condensatore, mentre il sifone (2) consente lo svuotamento periodico dell'estrattore. Il materiale solido, contenente il composto da estrarre, viene posto in un ditale, spesso di cellulosa porosa (3), che viene inserito nella camera principale dell'estrattore.



Co-funded by
the European Union



I principali vantaggi dell'estrazione Soxhlet sono: i) la sua semplicità, ii) l'applicabilità ad alte temperature, che aumenta la cinetica del processo, iii) bassi costi di avvio, iv) non è richiesto alcun filtraggio, v) la presenza costante di solvente e campione durante tutto il processo l'estrazione.

Uno dei maggiori problemi associati a questo metodo di estrazione è che sono limitati a causa della loro scarsa efficienza di estrazione, della procedura lunga e del coinvolgimento di molti solventi.

I preparati che si possono ottenere dalle piante sono numerosi. Gli estratti sono preparati che possono avere consistenza liquida, semisolida o solida, in funzione della tecnica di estrazione [Azwanida, 2015]. Utilizzando processi di macerazione o percolazione, gli estratti ottenuti possono essere classificati come segue: (i) estratti fluidi: tali estratti contengono la stessa quantità di principio attivo presente nella droga vegetale di partenza; (ii) estratti molli: durante il processo di concentrazione si ottiene una consistenza simile al miele e sono da 2 a 6 volte più concentrati rispetto agli estratti fluidi; (iii) estratti secchi: sono polveri solide ottenute per completa evaporazione del solvente utilizzato per l'estrazione [Abubakar and Haque, 2020].

Altra preparazione ottenuta mediante macerazione o percolazione sono le tinture. Si tratta di soluzioni liquide ottenute dalla lavorazione delle droghe vegetali con un solvente appropriato. Comunemente si utilizza una soluzione idroalcolica (una miscela di acqua e alcool), il cui contenuto alcolico viene scelto in base alla solubilità dei principi attivi da estrarre. La principale distinzione tra estratti e tinture sta nel fatto che, nei primi, viene effettuato un processo di evaporazione per aumentare la concentrazione dei principi attivi nel preparato. Le tinture si possono invece ottenere anche semplicemente diluendo il corrispondente estratto fluido. Un'altra sostanza estratta dai materiali vegetali è l'oleoresina, che contiene una miscela di oli essenziali (componenti aromatici volatili) e resine (componenti non volatili). Questa estrazione viene solitamente eseguita mediante processi di estrazione con solvente o ad alta pressione [Hudz et al., 2020].

6.4. Tecniche di estrazione innovative

L'applicazione di metodi di estrazione innovativi nelle industrie alimentari è stata ampiamente studiata, a causa dell'aumento delle aspettative dei consumatori verso opzioni più ecologiche. Questi metodi sono più rispettosi dell'ambiente grazie alla diminuzione dell'uso di sostanze chimiche sintetiche e organiche, alla riduzione dei tempi operativi e alla migliore resa e qualità dell'estratto.



Alcune delle tecniche più promettenti sono l'estrazione assistita da ultrasuoni, l'estrazione assistita da enzimi, l'estrazione assistita da microonde, l'estrazione assistita da campi elettrici pulsati, l'estrazione con fluidi supercritici e l'estrazione con liquidi pressurizzati. L'uso di nuove tecnologie e di tecnologie combinate aumenta l'estraibilità, con conseguenti rese con tassi di estrazione più elevati.

6.4.1. Estrazione assistita con ultrasuoni

L'estrazione assistita da ultrasuoni utilizza l'energia degli ultrasuoni e i solventi per estrarre i composti target da varie matrici vegetali [Kumar et al., 2021]. È un processo che permette di estrarre i composti bioattivi contenuti nella pianta sfruttando l'azione meccanica degli ultrasuoni sulle pareti vegetali.

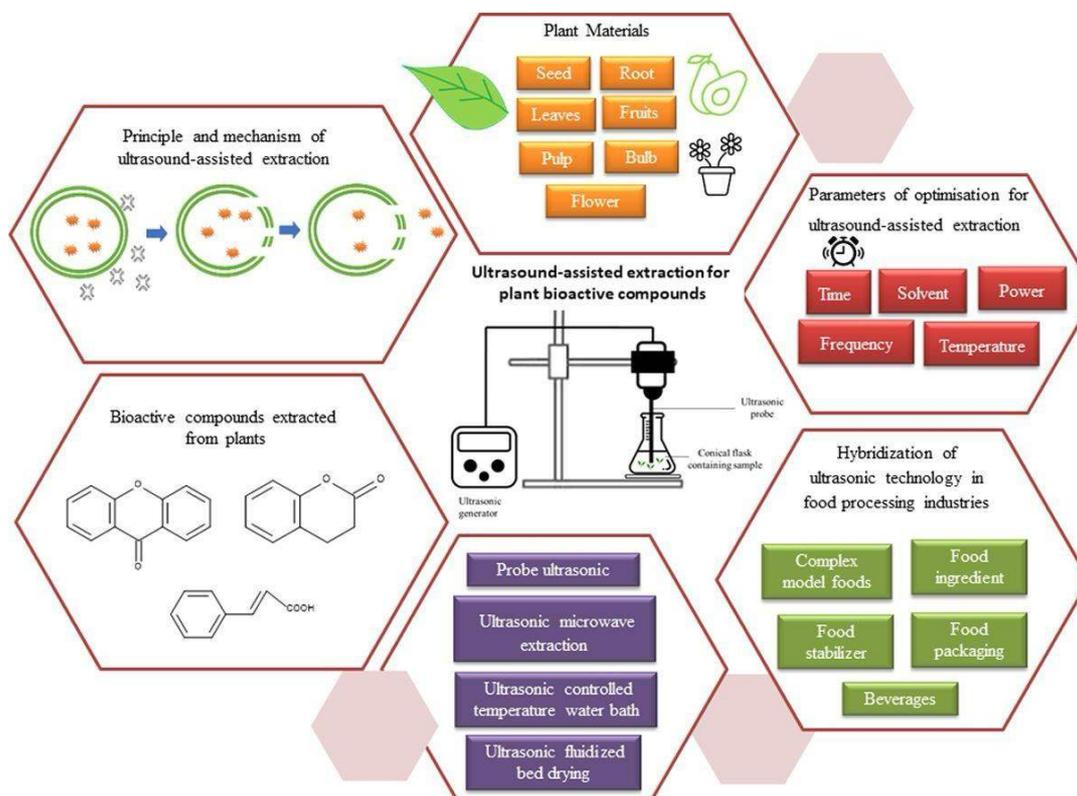


Figura 6.7. Estrazione assistita con ultrasuoni [Yusoff et al., 2022].

L'estrazione a ultrasuoni utilizza generalmente una gamma di frequenze ridotta (16 KHz - 100 KHz), poiché frequenze più elevate sarebbero troppo energiche e potrebbero degradare i principi attivi delle matrici vegetali. Queste onde consistono in una serie di cicli di compressione e rarefazione che possono essere propagati attraverso un mezzo solido, liquido o gassoso, inducendo lo spostamento e il dislocamento delle molecole dalla loro posizione originale. La tecnologia a ultrasuoni consente l'estrazione completa del materiale vegetale, preservando



l'integrità di tutte le molecole contenute nella pianta, siano esse termolabili (proteine, aminoacidi, vitamine, enzimi, ecc.), termostabili, idrosolubili o liposolubili.

Ciò è possibile grazie all'onda d'urto prodotta dagli ultrasuoni che provoca la rottura meccanica delle pareti cellulari.

Tabella 1. Vantaggi e svantaggi dell'estrazione a ultrasuoni rispetto alla macerazione convenzionale.

Principali vantaggi dell'estrazione a ultrasuoni rispetto alla macerazione convenzionale	Svantaggi dell'estrazione a ultrasuoni
Riduzione significativa dei tempi di produzione poiché gli ultrasuoni rompono le pareti cellulari e riducono i tempi di trasferimento dei principi attivi dal materiale vegetale al solvente.	Con l'estrazione a ultrasuoni non è possibile effettuare un'estrazione selettiva, poiché si verifica una fuga totale di tutte le molecole contenute nel materiale vegetale, indipendentemente dall'affinità con il solvente utilizzato.
È possibile ottenere un litro di macerato in soli 15 minuti.	Se si desidera ottenere la separazione dei principi attivi contenuti nella massa vegetale, è necessario eseguire metodi successivi.
Si tratta di una tecnica di estrazione che ha ottenuto il riconoscimento Bio in quanto si tratta di un processo puramente fisico in cui non vengono utilizzati o aggiunti prodotti chimici. Vengono infatti utilizzati solventi naturali (olio, acqua e alcol), indipendentemente dalla solubilità dei principi attivi.	
Si ottengono rese molto soddisfacenti in termini di principi attivi, poiché l'esaurimento del vegetale è quasi totale.	

Protocollo Step-by-step

- 1) il materiale vegetale viene macinato o sminuzzato in piccoli pezzi per aumentare la superficie di estrazione
- 2) il materiale vegetale viene poi mescolato con un solvente (come etanolo o acqua)
- 3) gli ultrasuoni vengono utilizzati per favorire il processo di estrazione applicando alla miscela onde ultrasonore ad alta intensità e bassa frequenza a circa 20 kHz. Ciò provoca una cavitazione acustica e una rapida vibrazione del solvente, che favorisce la disintegrazione e la rottura delle cellule vegetali e il rilascio di sostanze bioattive come polifenoli, flavonoidi e vitamine
- 4) la miscela viene poi filtrata per separare il materiale vegetale solido dal liquido contenente i composti bioattivi estratti
- 5) il liquido viene poi evaporato o sottoposto a ulteriori trattamenti per rimuovere il solvente e concentrare le molecole bioattive



Co-funded by
the European Union



6) il prodotto finale è un estratto ricco di bioattivi che può essere utilizzato in varie applicazioni, come integratori alimentari, alimenti funzionali e cosmetici.

6.4.2. Estrazione assistita da enzimi

Le sostanze fitochimiche, presenti in matrici specifiche che contengono polisaccaridi lignina stabilizzati da legami idrogeno e interazioni idrofobiche, rimangono disperse nel citoplasma cellulare e sono inaccessibili con il processo di estrazione con solvente. Le sostanze fitochimiche legate in questi campioni vengono rilasciate in modo efficace e ad alta resa mediante un pretrattamento del materiale vegetale con enzimi specifici (cellulosa, pectinasi e amilasi) aggiunti durante l'estrazione per aumentare la resa fitochimica attraverso la rottura delle pareti cellulari. Inoltre, questi enzimi idrolizzano i carboidrati come la cellulosa e i corpi lipidici [Bitwell et al., 2023].

Protocollo Step-by-step

- 1) polverizzazione della droga vegetale
- 2) sospensione in acqua
- 3) utilizzo di specifici enzimi idrolitici che hanno il compito di liberare tutte le molecole presenti nel fitocomplesso
- 4) aggiunta di glicerina
- 5) filtrazione
- 6) aggiunta di acido citrico per stabilizzare e rendere stabile il prodotto nel tempo
- 7) confezionamento.

I vantaggi dell'utilizzo degli estratti idro-enzimatici rispetto ai classici rimedi fitoterapici come le tinture madri o i macerati glicerici sono innanzitutto l'efficacia, l'elevata biodisponibilità grazie all'utilizzo di enzimi idrolitici, la tempestività d'azione e la sicurezza del prodotto in quanto non contiene né alcool né zucchero.

6.4.3. Estrazione assistita da microonde

Le microonde sono onde non ionizzanti di natura elettromagnetica con frequenza compresa tra 300 MHz e 300 GHz. Queste onde si posizionano nello spettro delle onde elettromagnetiche tra i raggi infrarossi e i raggi X. L'azione diretta di queste onde sulla sostanza consiste nel trasformare l'energia elettromagnetica in energia termica. Le microonde sono costituite da due campi oscillanti perpendicolari: quello magnetico e quello elettrico, responsabili del riscaldamento. L'estrazione con microonde (MAE) (Figura 6.8) dipende dal



processo di riscaldamento del solvente e del campione. Inoltre, è governata da due fenomeni: la rotazione dei dipoli e la conduzione ionica. Per rotazione dei dipoli si intende il riallineamento dei dipoli della molecola con la rapida variazione del campo elettrico; questo fa sì che sia i materiali dielettrici sia i solventi con dipoli persistenti vengano riscaldati dall'azione delle microonde. Per conduzione ionica invece si intende il trasferimento di ioni causato dalla variazione del campo elettrico. Di conseguenza, la migrazione genera un attrito (dovuto alla resistenza offerta dalla soluzione) responsabile del riscaldamento della soluzione stessa.

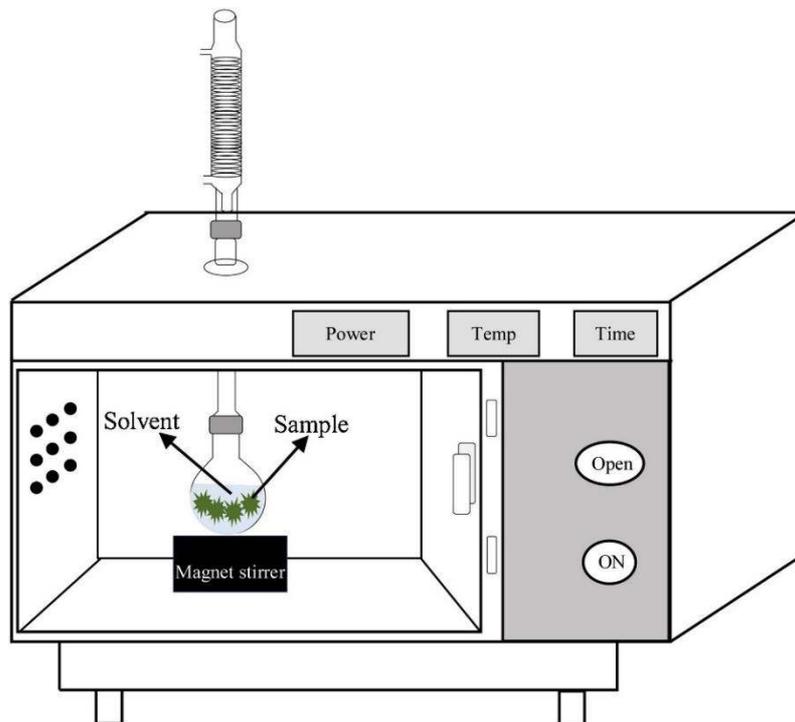


Figura 6.8. Rappresentazione schematica del sistema di estrazione assistito da microonde [Mirzadeh et al., 2020].

L'estrazione può essere effettuata su matrici sia umide che secche, sfruttando le tracce di umidità presenti nel campione che viene riscaldato (ad esempio l'acqua contenuta nelle cellule vegetali della biomassa). L'evaporazione che ne consegue crea pressioni estremamente elevate all'interno delle cellule che alla fine provocano la rottura della parete cellulare, aumentando le rese di recupero dei fitocondensati nel mezzo.

Alvarez et al. (2017) hanno dimostrato come l'uso delle microonde come pretrattamento per la sansa aumenti sia le rese di estrazione che i polifenoli totali estratti. Caldas et al. (2018) osservano invece come le rese in polifenoli siano maggiori con metodi che prevedono l'uso delle microonde come mezzo di estrazione rispetto ai metodi di estrazione convenzionali.



6.4.4. Estrazione con fluido supercritico

L'estrazione con fluidi supercritici è un'importante tecnica di separazione utilizzata nei settori alimentare, nutraceutico e farmaceutico attraverso la quale alcuni principi attivi vengono isolati sottoponendo il materiale ad alta pressione in presenza di un gas, principalmente CO₂.

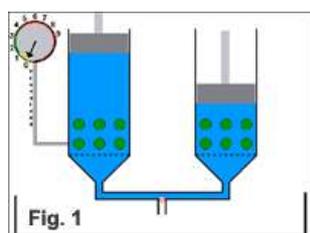
L'estrazione con fluidi supercritici è una tecnologia verde che garantisce la sostenibilità ambientale del processo e un elevato grado di qualità e purezza del prodotto estratto. È una tecnologia pulita e selettiva, non richiede alte temperature e rappresenta un'alternativa alla comune estrazione con solventi organici.

Questa tecnica permette di estrarre composti sensibili al calore e all'ossidazione come acidi grassi polinsaturi (ω 3, ω 6), vitamine, cannabinoidi, flavonoidi, steroli, tocoferoli e altri composti ad alto valore aggiunto con la certezza di non danneggiarli. Il risultato è un estratto di estrema purezza e dalle caratteristiche organolettiche molto raffinate.

6.4.5. Naviglio estrattore ®

L'estrattore solido-liquido dinamico rapido (Naviglio estrattore ®) (Figura 6.9) rappresenta una tecnologia innovativa di estrazione solido-liquido che permette di esaurire in breve tempo le matrici solide contenenti sostanze estraibili in un solvente organico o inorganico e nelle loro miscele, rispetto alle altre tecniche di estrazione attualmente esistenti. La novità dell'estrattore sta nel fatto che la filosofia di estrazione cambia, in quanto si inverte la tendenza dei metodi attuali che mirano a riscaldare il sistema di estrazione per aumentare la resa e accelerare i tempi di estrazione; il Naviglio Estrattore® effettua l'estrazione a temperatura ambiente o sub-ambiente e sfrutta un aumento di pressione del liquido di estrazione sulla matrice solida da estrarre. L'importanza di estrarre a basse temperature sta nel fatto che in questo modo si evita lo stress termico sulle sostanze termolabili.

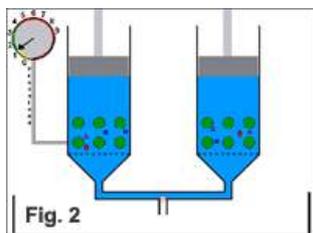
Rappresentazione schematica del funzionamento dell'estrattore Naviglio ®



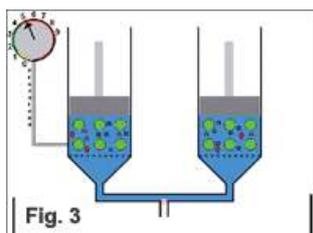
Fase 1. Le camere di estrazione vengono riempite con la matrice solida da estrarre e il solvente di estrazione, a pressione atmosferica. Sul fondo delle due camere di estrazione cilindriche sono presenti due divisori porosi che consentono il passaggio del liquido e bloccano la matrice solida.



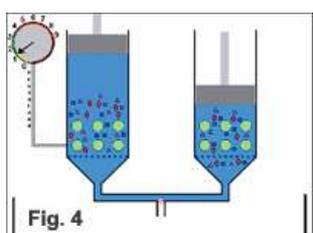
Co-funded by
the European Union



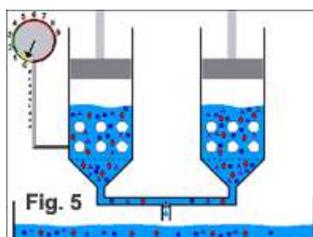
Fase 2. Dopo il riempimento, il sistema viene chiuso e messo in pressione (generalmente tra 7 e 9 bar). La pressione esercitata dai pistoni viene trasferita al liquido, poiché le due camere di estrazione sono collegate tramite un condotto.



Fase 3. Una volta raggiunta la pressione impostata, il sistema rimane fermo per il tempo necessario a stabilire un equilibrio tra l'interno e l'esterno della matrice solida. Questa è la fase statica.



Fase 4. Dopo questo periodo, i pistoni vengono messi in movimento, generando un immediato abbassamento della pressione del sistema. Inizia così la fase dinamica in cui si realizza il principio estrattivo; le sostanze estraibili vengono trasferite nel solvente di estrazione grazie a un effetto di aspirazione dovuto al gradiente di pressione negativo creato tra l'interno e l'esterno della matrice solida.

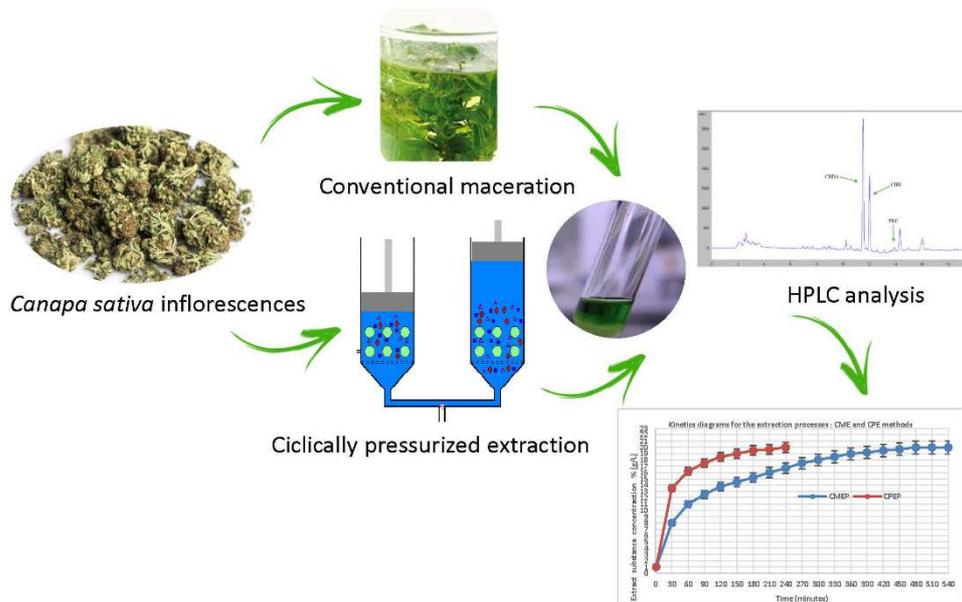


Fase 5. La fase dinamica ha tra le sue funzioni quella di mescolare il liquido di estrazione, evitando la formazione di gradienti di concentrazione nelle immediate vicinanze della superficie esposta del solido. L'alternanza di una fase statica con una dinamica costituisce un ciclo di estrazione; la ripetizione di più cicli porta al completo esaurimento della matrice solida. Al termine dell'estrazione, il solvente di estrazione viene espulso attraverso un'elettrovalvola e raccolto in un apposito contenitore.



Figura 6.9. Naviglio estrattore ®

Gallo et al. (2020) hanno valutato la cinetica del processo di estrazione da infiorescenze femminili di *Canapa sativa* subsp. *sativa* var. *sativa*, sulla base della determinazione del contenuto di cannabinoidi: acido cannabidiolico (CBDA), acido Δ 9-tetraidrocannabinolico (THCA), cannabidiolo (CBD) e Δ 9-tetraidrocannabinolo (THC), prima e dopo la decarbossilazione in forno, al fine di valutare il possibile utilizzo dell'estratto di canapa ottenuto nel settore alimentare. La resa di estrazione è stata la stessa nei due casi esaminati e le qualità finali erano quasi identiche. Tuttavia, i tempi di estrazione sono stati significativamente diversi: la macerazione è stata completata in non meno di 24 ore, mentre con l'estrattore Naviglio l'estrazione è stata completata in sole 4 ore (Figura 6.10).



Kinetics diagrams for the extraction processes

Figura 6.10. Processo di estrazione per la produzione di estratti di infiorescenze di canapa mediante macerazione convenzionale ed estrazione dinamica rapida solido-liquido (estrattore Naviglio) [Gallo et al., 2020].

6.5. Estrazione dell'olio essenziale

Oli essenziali, che possono essere ottenuti da materiale vegetale sottoposto a distillazione in corrente di vapore, idrodistillazione o spremitura a freddo, a seconda della pianta e del tipo di olio da ottenere. Il contenuto di olio essenziale nel materiale vegetale è basso, di solito dall'1 al 3% del peso della pianta. Sono costituiti da una complessa miscela di composti chimici, tra cui terpeni, aldeidi, chetoni, alcoli e altri, che conferiscono loro sia l'aroma caratteristico che le potenziali proprietà terapeutiche [Aziz et al., 2018].

Gli oli essenziali sono una complessa miscela di sostanze organiche volatili e profumate di varia natura chimica.

Alcuni componenti degli oli essenziali:

MONOTERPENI proprietà antimicotiche, antimicrobiche, antiflogistiche e cicatrizzanti (es. lavanda, timo, cipresso, salvia, limone...);

proprietà calmanti, antimicotiche e disinfettanti dei SESQUITERPENI (ad es. melissa, ylang-ylang, cedro, ginepro...);



Co-funded by
the European Union



FENOLI proprietà antimicotiche e antimicrobiche (ad es. timo, origano, santoreggia, chiodi, garofano...); FENOLI proprietà antifungine e antimicrobiche (ad es. garofano...);

ALDEHYDES proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e principalmente responsabili del profumo (es. limone, melissa, cannella, eucalipto...);

CHETONI con proprietà balsamiche e colagoghe-coleretiche (possono anche essere costituenti tossici) (ad es. artemisia, assenzio, rosmarino, tuia, menta piperita, salvia officinale...);

ESTERI con proprietà riequilibranti, decongestionanti, antispasmodiche e calmanti (ad es. alloro, lavanda, camomilla, geranio rosa...).

Caratteristiche degli oli essenziali

1. sono costituiti da una miscela complessa di idrocarburi mono- e sesquiterpenici e ossigenati, propanoidi di derivazione fenilica, composti del metabolismo acido, grassi e aminoacidi, composti azotati e solforati;
2. possono essere mono-, bi- o trimolecolari, ma per la maggior parte sono polimolecolari (>250);
3. forti, piacevoli, per lo più incolori o leggermente inodori;
4. sono costituiti da molecole estremamente volatili;
5. sono insolubili o poco solubili in acqua;
6. molto solubili in alcol, grassi, acido acetico, etere, cloroformio...;
7. peso specifico dell'acqua inferiore (ECCEZIONI: olio essenziale di Cannella, Garofano, Senape...).

Il metodo più utilizzato per l'estrazione degli oli essenziali è la distillazione in corrente di vapore (Figura 6.11). Viene utilizzato da diversi settori per fornire materie prime per la cosmetica, la farmaceutica, l'aromaterapia, gli aromi alimentari, la conservazione e la cura della casa [Machado et al., 2022].

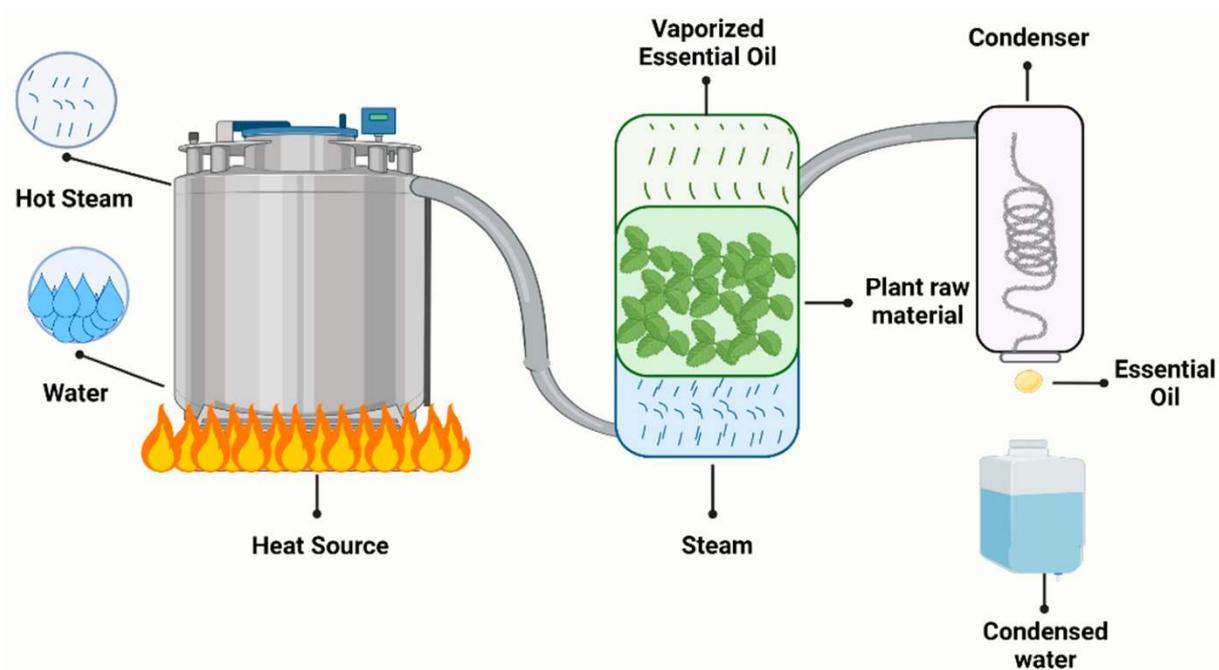


Figura 6.11. Panoramica delle fasi del processo di distillazione a vapore [Machado et al., 2022].

Questo metodo sfrutta alcune delle proprietà fisiche degli oli essenziali precedentemente riportate. Più precisamente quelle relative a: volatilità, solubilità in acqua e densità. La distillazione è, infatti, un processo attraverso il quale gli Oli Essenziali vengono separati dai tessuti della pianta che li contiene, attraverso il loro “trasporto” da parte del vapore acqueo. Una proprietà fisica degli Oli Essenziali è la volatilità, cioè la capacità di essere facilmente trasportati (vaporizzati) dal vapore acqueo, nonostante il loro elevato punto di ebollizione. Una volta vaporizzati, gli oli essenziali vengono facilmente trasportati dal flusso del vapore acqueo. Il vegetale, opportunamente preparato, viene posto in una “camera di distillazione”, nella quale viene introdotto il vapore acqueo. Questo trascina con sé gli oli essenziali, formando una miscela di Olio essenziale + Vapore acqueo che, passando attraverso una colonna refrigerante, condensa e separa rapidamente l'acqua dall'Olio essenziale. La separazione avviene perché l'acqua e gli oli essenziali sono immiscibili tra loro e hanno densità diverse. Si separano per semplice decantazione. Questo tipo di estrazione è il metodo più utilizzato per estrarre gli Oli Essenziali in quanto offre una serie di vantaggi:

- A. La temperatura di ebollizione della miscela vapore/olio essenziale è prossima ai 100 °C, ancora lontana dalla temperatura di ebollizione degli oli essenziali. Non aumenta per tutta la durata della lavorazione e questo evita i rischi di deterioramento degli Oli Essenziali e garantisce una buona volatilità degli stessi.



- B. Il vapore acqueo gonfia i tessuti vegetali, dilata i pori, rompe le cellule essenziali, facilitando la fuoriuscita degli Oli Essenziali.
- C. L'Olio Essenziale così ottenuto è facilmente separabile dall'acqua condensata per decantazione grazie al fatto che i due composti sono immiscibili tra loro e di densità diversa.
- D. La perdita di Olio Essenziale è minima a causa della sua bassissima solubilità in acqua. Questa perdita può essere ulteriormente contenuta utilizzando l'acqua aromatica, appena separata dagli Oli Essenziali, per rigenerare il vapore.
- E. Il processo ha un costo molto basso (si utilizza acqua potabile di rubinetto) e non crea particolari problemi di sicurezza sul lavoro.
- F. Il flusso di vapore acqueo non contiene ossigeno; pertanto, gli Oli Essenziali non sono soggetti a ossidazione. L'unico svantaggio è il rischio di subire possibili degradazioni termiche e processi idrolitici.

Bibliografia

Azmir J, Zaidul, ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 2013; 117(4): 426-436.

Jha AK and Sit N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology* 2022; 119: 579-591.

Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*. 2015; 4(196): 2167-0412.

Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioapplied Sciences* 2020;12(1):1.

Hudz N, Makowicz E, Shanida M, et al. Phytochemical Evaluation of Tinctures and Essential Oil Obtained from *Satureja montana* Herb. *Molecules*. 2020; 25(20): 4763.

Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 2021; 70: 105325.

Yusoff IM, Taher ZM, Rahmat Z, Chua LS. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International* 2022; 157: 111268.



Co-funded by
the European Union



Bitwell C, Indra SS, Luke C, Kakoma MK. A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African* 2023; 19: e01585.

Mirzadeh M, Arianejad MR, Khedmat L. Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate Polymers* 2020; 229: 115421.

Álvarez A, Poejo J, Matias AA, Duarte CM, Cocero MJ, Mato RB. Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing* 2017; 106: 162-170.

Caldas TW, Mazza KE, Teles AS, Mattos GN, Brígida AIS, Conte-Junior CA, et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* 2018; 111: 86-91.

Gallo M, Formato A, Ciaravolo M, Formato G, Naviglio D. Study of the kinetics of extraction process for the production of hemp inflorescences extracts by means of conventional maceration (CM) and rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE). *Separations* 2020; 7(2): 20.

Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review *Curr Drug Metab.* 2018; 19(13): 1100-1110.

Machado CA, Oliveira FO, de Andrade MA, Hodel KVS, Lepikson H, Machado BAS. Steam distillation for essential oil extraction: An evaluation of technological advances based on an analysis of patent documents. *Sustainability* 2022; 14(12): 7119.