

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**



FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

**BIOLOGIA MOLECOLARE E SANITARIA**

TESI DI LAUREA

**Valutazione del potenziale antiossidante e antinfiammatorio**

**di estratti della macroalga bruna *Cystoseira amentacea var. stricta***

**RELATORE:** PROF.SSA SONIA SCARFÌ

**CORRELATORE:** PROF.SSA ANNA MARIA BASSI

CANDIDATO: FONTANA MARCO

ANNO ACCADEMICO 2018-2019



## INDICE

INTRODUZIONE	1
1. LE MACROALGHE	1
1.1. IL GENERE <i>CYSTOSEIRA</i>	3
1.2. NUTRACEUTICA, COSMETOLOGIA ED ALTRI POSSIBILI UTILIZZI	6
1.3. GLI ALGINATI	16
1.4. L' INFIAMMAZIONE	19
2. SCOPO DELLA TESI	22
MATERIALI E METODI	23
1. RACCOLTA DELLE ALGHE	23
2. PRODUZIONE DI ESTRATTI DI <i>CYSTOSEIRA AMENTACEA</i>	23
3. CONTENUTO FENOLICO TOTALE	23
4. CONTENUTO TOTALE DI FLAVONOIDI	24
5. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DEL RADICALE DPPH	24
6. TEST DI RIDUZIONE DEL FE (III)	25
7. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DEL RADICALE OH•	26
8. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DI NO	26
9. COLTURE CELLULARI	27
9.1. VITALITÀ CELLULARE	27
9.2. RIDUZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ CAUSATA DA H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	27
9.3. RIDUZIONE DELLA PRODUZIONE DI NO NEI MACROFAGI RAW 264.7 TRATTATI CON LPS	28
9.4. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI MACROFAGI RAW 264.7 ATTIVATI DA LPS	28
9.5. WOUND HEALING ASSAY	30
10. ANALISI STATISTICA	31
RISULTATI E DISCUSSIONE	32
1. RESA DI ESTRAZIONE, CONTENUTO FENOLICO E FLAVONOIDE TOTALE DI ESTRATTI DI <i>C. AMENTACEA</i>	32
2. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEGLI ESTRATTI DI <i>C. AMENTACEA</i>	34
2.1. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DEL RADICALE DPPH	35
2.2. TEST DI RIDUZIONE DEL Fe (III)	37
2.3. VALUTAZIONE DELLA ATTIVITÀ DI SCAVENGING DI RADICALI OH• E NO	39

3	TEST DI CITOTOSSICITÀ DEGLI ESTRATTI DI <i>C. AMENTACEA</i>	42
4	POTENZIALE ANTINFIAMMATORIO DEGLI ESTRATTI DI <i>C. AMENTACEA</i>	2
5	WOUND HEALING TEST	14
	CONCLUSIONI	18
	BIBLOGRAFIA	I

## INTRODUZIONE

### 1. LE MACROALGHE

La presenza di sostanze terapeutiche in prodotti naturali marini è sempre stata una consapevolezza presente in molte culture nel corso della storia. Tra questi prodotti i più presenti nelle diverse culture sono le alghe marine; sono state infatti a lungo utilizzate come cibo e farmaco in paesi asiatici come Giappone, Cina e Corea, dove rappresentano uno dei principali rimedi della medicina tradizionale per il trattamento di alcuni tipi di tumori e per fornire molti benefici per la salute; si ritiene infatti che il consumo delle alghe marine brune migliori alcuni disturbi infiammatori e riduca un livello elevato di colesterolo. Oggi, lo studio di questi organismi ha permesso di trovare una vasta varietà di metaboliti secondari che possiedono nuove strutture chimiche e interessanti attività farmacologiche come attività anti-HIV, anticoagulanti, anticonvulsivanti, antinfiammatorie, batteriostatiche, antineoplastiche e citotossiche. L'ampia gamma di bioattività dei prodotti naturali marini è stata esaminata in molti articoli per metterne in luce i diversi possibili utilizzi, facendo così partire studi clinici e preclinici. (Stanojkovic TP. et al. 2014)

Negli ecosistemi acquatici le alghe costituiscono la fonte primaria di materia organica per tutti gli altri organismi e grazie alla fissazione di anidride carbonica contribuiscono a contenere l'innalzamento dei livelli di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera. Finora sono state descritte circa 40.000 specie di alghe, ma la stima è che non rappresentino più del 20% di quelle totali presenti sul pianeta. Il termine "Alghe" di per sé non ha alcun significato tassonomico, ma indica un insieme di vegetali, alquanto primitivi, che, pur accomunati da alcune caratteristiche, si presentano molto diversi tra loro dal punto di vista morfologico, fisiologico, ecologico e biochimico. Tra le alghe ci sono infatti individui unicellulari dalle

dimensioni di pochissimi micrometri ed altri che possono misurare oltre 50 metri. La maggior parte delle alghe è autotrofa, altre possono essere eterotrofe, altre ancora sono fagotrofe. È quindi difficile dare una definizione di ciò che si intende con il termine “Alga”. Tipicamente però, nel linguaggio più colloquiale, con il termine alghe si fa riferimento al gruppo delle macroalghe, alghe pluricellulari tipicamente classificate insieme alle piante. In effetti, esse rappresentano l’anello di congiunzione tra i protisti e le piante vere e proprie ma, a differenza di queste ultime, pur essendo pluricellulari, le cellule delle alghe non si organizzano a formare tessuti e organi specializzati quali radici, fusto e foglie; la struttura delle alghe pluricellulari è più semplice (il corpo delle alghe viene detto tallo: da cui il termine tallofite) e ciò permette di distinguere le alghe dalle piante acquatiche più evolute. Le alghe pluricellulari, oltre alla clorofilla, contengono anche altri pigmenti, per cui possono assumere colorazioni diverse (Zavanella et.al 2015). Nel Mar Mediterraneo le specie bentoniche di alghe più importanti appartengono al genere diffuso *Cystoseira* (ordine *Fucales*) che presenta caratteristiche molto promettenti in termini di produzione di metaboliti secondari (de Sousa et al., 2017). In effetti, molte molecole interessanti come terpenoidi, alcaloidi e steroidi sono state isolate da diverse specie del genere (de Sousa et al, 2017) sebbene siano stati pubblicati pochi studi sulle proprietà farmacologiche di questi composti (Mhadhebi et al, 2014).

Nel grande gruppo delle macroalghe, le Phaeophyceae, più comunemente definite alghe brune, sono proprio tra quelle più ricche di questi metaboliti secondari. Organismi unicamente pluricellulari, ne sono state riconosciute fino a 2000 specie, suddivise in 250 generi, in grado di vivere a diverse profondità e condizioni di luce e ossigeno. Sono tipiche dei mari più freddi e alcune specie possono arrivare anche a delle dimensioni notevoli, raggiungendo la lunghezza di diverse decine di metri. Meno dell'1% del totale si trova in

habitat di acqua dolce. Anche le alghe brune, come quelle verdi e rosse, contengono clorofilla che si trova accompagnata da altri pigmenti accessori, come la fucoxantina e i caroteni, che donano la colorazione scura assorbendo i raggi blu-verdi necessari per effettuare la fotosintesi anche nelle profondità oceaniche dove lo spettro solare non arriva. Sono il gruppo maggiormente allevato, costituendo più della metà della produzione totale. La specie *Saccharina japonica*, detta anche "kombu", è la più famosa, utilizzata essiccata come cibo oppure come fonte di alginati, mannitolo e iodio, seguita dalla *Undaria pinnatifida*, detta "wakame". La Cina è ad oggi il maggior produttore di alghe brune, seguita dalla Corea e dal Giappone ma la coltivazione sta iniziando ad avvenire anche in Europa, dove ne viene prodotta una piccola quantità in Francia, Russia e Spagna. (Zavanella et al. 2015)

### 1.1. IL GENERE *CYSTOSEIRA*

*Cystoseira* (*Cystoseiraceae*) è un genere ampiamente distribuito di alghe brune ecologicamente rilevante perché va ad agire come "ingegnere ecosistemico" (Jones CG et al., 1994) e svolge un ruolo funzionale chiave nel controllo dell'eterogeneità dell'habitat, della produttività e del ciclo dei nutrienti nelle scogliere rocciose temperate. In particolare, le foreste di *Cystoseira* forniscono rifugio e cibo per molti invertebrati e pesci e modulano la struttura della comunità bentonica associata (Mineur et al., 2015). Attualmente alcune popolazioni stanno diminuendo in tutto il Mediterraneo, in gran parte a causa di molteplici impatti umani come l'urbanizzazione, la pesca eccessiva e il cambiamento climatico (Thibaut et al., 2015); di conseguenza, molti sistemi sono passati da assemblaggi complessi e produttivi ad habitat più semplici e meno produttivi come barrens, incidendo in tal modo sulla fornitura di servizi ecosistemici (Falace et al., 2010). Le specie di *Cystoseira* sono

elencate come "di interesse comunitario" secondo la Direttiva Habitat (92/43/CEE) e sono indicatori di qualità ambientale nelle acque costiere del Mediterraneo secondo la Direttiva quadro sulle acque (2000/60/CE) [EC, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal L 327, 22/12/2000]. Diverse specie sono protette dalla Convenzione di Berna, riconosciuta come prioritaria dalla Convenzione di Barcellona, e il genere *Cystoseira* viene considerato vulnerabile da numerose organizzazioni internazionali (es. IUCN, RAC/SPA, MedPan). Proprio per questo sono stati effettuati diversi studi circa le migliori condizioni di incubazione per accelerare lo sviluppo di un numero elevato di embrioni sani e di grandi dimensioni ex-situ (Falace et al., 2018).

*Cystoseira spp.* possiede, tra i suoi composti più significativi, diversi tipi di terpeni. I terpeni contenenti gruppi arilici hanno attirato sempre più attenzione perché presentano ampi spettri di attività farmacologiche e combinano preziose proprietà curative con praticamente nessun effetto collaterale dannoso. Numerosi diterpeni e steroli sono stati isolati dalle alghe brune appartenenti al genere *Cystoseira*.

*Cystoseira amentacea* è una specie mediterranea che in Italia si trova lungo tutte le coste



mostrando tre principali varietà. La varietà Amentacea è diffusa nel mar Egeo e Mediterraneo orientale, la varietà stricta è caratteristica del Mediterraneo occidentale, mentre nel Mare Adriatico



si trova la varietà spicata. Nello specifico la specie è diffusa con la varietà stricta in tutti i mari italiani tranne che nell'estremo Adriatico Settentrionale. Nel Mar Mediterraneo la sottospecie è diffusa anche in Spagna e alle Isole Baleari, in Francia e Corsica, in Turchia, a Malta, in Grecia e in Algeria, Libia, Marocco e Tunisia.

*C. amentacea* cresce tra i 0,20 m e il metro nella frangia infralitorale, su substrato roccioso, e può originare appena sotto la superficie un continuum orizzontale di talli algali cespitosi, con una struttura che ricorda i rizomi, di dimensioni medie comprese tra i 20 e 35 centimetri, che possono formare in condizioni favorevoli cinture algali notevolmente sviluppate. L'alga può sviluppare ramificazioni primarie, che possono raggiungere il mezzo metro di lunghezza, mentre quelle secondarie, inserite sulle zone apicali delle primarie, mostrano una lunghezza decrescente, e assumono un aspetto piuttosto semplice. Processi a forma di spina detti fillodi spinosi si trovano sulle ramificazioni di diverso grado e terminano singoli o biforcuti. I talli presentano una iridescenza verde bruno dovuta alla presenza nei tessuti di pigmenti quali fucoxantina o altre xantofille, che coprono il verde delle clorofille e i colori di altri carotenoidi. La riproduzione sessuale, che avviene nel periodo primaverile, è possibile dalla produzione di gameti, i maschili provvisti di flagello ed i femminili incapaci di muoversi, che si formano a partire da oogoni e anteridi prodotti nelle aree fertili apicali chiamate ricettacoli; essendo una specie monoica, *C. amentacea* presenta gameti femminili e maschili prodotti nello stesso ricettacolo. (Giaccone et al., 2009)

## 1.2. NUTRACEUTICA, COSMETOLOGIA ED ALTRI POSSIBILI UTILIZZI

Da un punto di vista del contenuto dei macronutrienti, le alghe raggiungono livelli piuttosto deludenti. Per quel che riguarda il contenuto proteico, nelle alghe brune generalmente siamo intorno a valori piuttosto bassi (6–13% del peso secco) (Dawczynski et al., 2007; Hernández-Carmona et al., 2009; McDermid et al., 2003; Sánchez-Machado et al., 2004) i quali variano notevolmente a seconda della specie, della stagione e dai nutrienti sfruttati dall'alga per crescere (Stengel et al., 2011). La maggior parte di queste poche proteine però ha un alto valore nutrizionale, essendo una ricca fonte di acido aspartico, acido glutammico e leucina, mentre treonina, lisina, triptofano, aminoacidi solforati e istidina sono presenti in quantità limitate, ma comunque a livelli più alti rispetto a quelli trovati nelle piante terrestri. Anche per quel che riguarda il contenuto lipidico nelle alghe brune marine siamo in range piuttosto bassi 0,57-3,5% del peso secco, ma questi lipidi algali hanno però una percentuale maggiore di acidi grassi polinsaturi (PUFA) rispetto alle piante terrestri. Questi PUFA sono componenti dei lipidi strutturali di membrana e sono essenziali per l'alimentazione animale e umana. Le due classi principali e note di PUFA ( $\Omega 3$  e  $\Omega 6$ ) hanno funzioni fisiologiche importanti, e il loro equilibrio è necessario per la normale crescita e sviluppo. Le alghe brune hanno un rapporto  $\Omega 6/\Omega 3$  bilanciato (0,6–5,1: 1), considerando che in una dieta umana sana il rapporto non deve superare 10: 1. Sono state segnalate differenze nella composizione degli acidi grassi tra le specie e le variazioni delle variazioni con fattori ambientali e geografici (Li et al., 2002; Narayan et al., 2004), stagioni (Terasaki et al., 2009) e parti algali (Khotimchenko et al., 2000). Alcuni PUFA di alghe possono avere azioni antinfiammatorie (Khan et al., 2007) e antivegetative e prevenire l'accumulo indesiderato di microrganismi, piante e invertebrati su superfici artificiali immerse

nell'acqua di mare (Plouguerné et al., 2010; Sidharthan et al., 2007), mentre alcuni  $\Omega 3$  possono agire da scavenger del radicale superossido

Grazie alla grande quantità di molecole bioattive, le alghe sono spesso utilizzate nella formulazione di integratori alimentari. Le fluorotannine, ad esempio, prodotte dal metabolismo secondario in molte Phaeophyceae, non si trovano nelle piante superiori e sono state segnalate attività antimicrobiche contro batteri di origine alimentare (Nagayama et al. 2002), proprietà antinfiammatorie (Kim et al., 2010; Kim et al., 2010; Lopes et al., 2012) e anche effetti antifotocancerogeni (Hwang et al., 2006). Sono oligomeri o polimeri di cloroglucinolo (1,3,5-triidrossibenzene), collegati da legami aril-arilici (fucoli), eteri (cloretoli, idrossifloretoli, fuhaloli) o entrambi (fucofloretoli) o con un legame di dibenzodioxina (eckols e carmalols) (Koivikko et al., 2007; Singh et al., 2006). I fluorotannini espongono altre attività oltre a quelle già citate, ad esempio, sembrano essere utilizzabili nel trattamento dell'artrite (Kang et al., 2004; Shin et al., 2006) e sono stati segnalati come efficaci inibitori della tirosinasi (Ahn et al. 2004) con una totale assenza di effetti citotossici (Kim et al., 2010; Kim et al., 2009; Zou et al., 2008).

Un altro metabolita secondario estremamente interessante è la fucoxantina, un carotenoide marino che è presente in molte alghe brune commestibili come *Eisenia bicyclis* (Arame), *Undaria pinnatifida* (Wakame) e *Hijikia fusiformis* (Hijiki), e di cui recentemente si è studiato il potenziale antidiabetico. La fucoxantina, uno dei carotenoidi più abbondanti, rappresenta oltre il 10% della produzione naturale totale stimata di carotenoidi dell'alga, e ha una struttura unica con un insolito legame allenico e un 5,6-monoepossido. Simile nella funzionalità ai carotenoidi, la fucoxantina svolge un ruolo importante nella raccolta della luce e nella fotoprotezione per un efficace utilizzo della luce e un aumento dell'attività fotosintetica. Questo potenziale antidiabetico della fucoxantina sembra agire attraverso

l'inibizione di alcuni enzimi associati al danno nei pazienti diabetici; agisce ad esempio su aldoso reduttasi del cristallino di ratto (RLAR), aldoso reduttasi ricombinante umana (HRAR), sulla formazione di prodotti di glicazione avanzata (AGE), sulla proteina tirosin-fosfatasi 1B (PTP1B) e sulla  $\alpha$ -glucosidasi, che risultano infatti inibiti, anche se non tutti in maniera competitiva e con lo stesso grado di inibizione. I risultati di questo studio dimostrano chiaramente il potenziale della fucoxantina come intervento terapeutico per la gestione del diabete e delle complicanze ad esso associate (Ah Jung et al., 2012). L'importanza di questo studio è evidente guardando i dati epidemiologici associati al diabete; la malattia infatti è sempre più comune a causa di uno stile di vita sempre più sedentario, e si presenta con un trend in forte crescita: basti pensare che nel mondo si è passati da 108 milioni nel 1980 a 422 milioni nel 2014 (fonte OMS).

Nonostante l'evidente possibile utilizzo della fucoxantina in campo alimentare e nutraceutico, sembra che la fucoxantina stessa venga metabolizzata a fucoxantinolo, il suo prodotto deacetilato. Questa evidenza è stata studiata con colture di cellule intestinali umane Caco-2 differenziate, un modello utile per studiare l'assorbimento dei composti alimentari da parte delle cellule intestinali. La fucoxantina veniva infatti assorbita dalle cellule Caco-2 incubate con fucoxantina micellare composta da 1  $\mu\text{mol/L}$  di fucoxantina, 2 mmol/L di taurocolato di sodio, 100  $\mu\text{mol/L}$  di monoacilglicerolo, 33,3  $\mu\text{mol/L}$  di acidi grassi e 50  $\mu\text{mol/L}$  di lisofosfatidilcolina. Nello studio sugli animali, il fucoxantinolo (10,4 $\pm$ 5,3 nmol/L plasma), insieme ad un altro metabolita sconosciuto, è stato rilevato nel plasma di topi un'ora dopo intubazione di 40 nmol fucoxantina. La fucoxantina nella dieta è incorporata come fucoxantinolo, la forma deacetilata, dal tratto digestivo nel sistema di circolazione del sangue nei mammiferi. Questi risultati indicano che la fucoxantina nella dieta è incorporata come fucoxantinolo dal tratto digestivo, ed è perciò il fucoxantinolo

stesso, piuttosto che la fucoxantina, che dovrebbe essere considerato in studi meccanicistici sulle azioni biologiche degli estratti delle alghe brune. Fortunatamente sembra che lo spettro d'attività dei due sia molto simile, mantenendo quindi validi i risultati ottenuti utilizzando la fucoxantina purificata (Sugawara et al., 2002)

Recentemente sono stati segnalati diversi casi in cui la fucoxantina aveva effetti benefici sulla chemio prevenzione del cancro, ed è stato anche riportato sulla base di esperimenti su animali che la somministrazione di polvere di alghe o di estratto sopprime la cancerogenesi. L'alga *wakame* (nome comune che prendono le fronde dell'alga *U. pinnatifida*) ha mostrato un effetto soppressivo sulla proliferazione di tumori mammari di ratto indotti da DMBA probabilmente attraverso l'induzione dell'apoptosi. Lo stesso studio è stato fatto successivamente utilizzando *mekabu* in polvere (*mekabu* è il nome comunemente usato della parte riproduttiva di *U. pinnatifida*, localizzata alla base dell'alga) mostrando un effetto soppressivo estremamente forte sulla cancerogenesi mammaria di ratto se usato nell'acqua potabile quotidiana, senza presentare alcuna tossicità. In vitro, la soluzione di *mekabu* ha indotto fortemente l'apoptosi in 3 tipi di cellule di carcinoma mammario umano. Questi effetti erano più forti di quelli di un agente chemioterapico ampiamente usato per trattare il cancro al seno umano, il 5-fluorouracile. Inoltre, non è stata osservata alcuna induzione di apoptosi nelle normali cellule mammarie umane. In Giappone, il *mekabu* è ampiamente consumato come alimento sicuro ed economico ed i risultati suggeriscono che il *mekabu* possieda il potenziale per la chemioprevenzione del carcinoma mammario umano, dando una possibile spiegazione ad alcuni studi epidemiologici che hanno indicato come il consumo onnipresente di alghe in Giappone è un fattore protettivo contro alcuni tipi di tumori. (Funahashi et al., 2001)

Ulteriore interessante possibile utilizzo è quello di sfruttare estratti di alghe brune come antibatterici. È stato visto infatti che estratti di laminaria (un polisaccaride scoperto nelle alghe brune) ottenuta da *C. barbata*, inibiscono la crescita di tutti i patogeni Gram-negativi ottenendo valori di MIC tra i 20 e i 40 mg/ml; nello specifico, si è scoperto che la crescita di *E. coli* e *K. pneumoniae* veniva inibita a valori di MIC di 20 mg/ml. Questa informazione può venire sfruttata nella prevenzione della contaminazione delle ferite, in quanto questi due batteri gram-negativi sono tra i più comunemente isolati nelle infezioni primarie da ferite (Shinagawa et al., 2004). Il meccanismo antibatterico dei polisaccaridi algali potrebbe essere dovuto al loro elevato potenziale di legame con recettori di alcune glicoproteine presenti sulla superficie cellulare della parete cellulare e della membrana citoplasmatica batteriche, aumentando così la permeabilità della membrana citoplasmatica con conseguente perdita di proteine e destabilizzazione di DNA batterico. I polisaccaridi algali marini con proprietà antibatteriche sono altamente richiesti per applicazioni biomediche come la medicazione delle ferite e l'ingegneria dei tessuti. La loro biocompatibilità, biodegradabilità e mancanza di tossicità li rendono promettenti leader nel campo biomedico (Shannon et al., 2016). In particolare, i polisaccaridi dotati di proprietà antibatteriche potrebbero fornire una guarigione migliore e rapida formando una barriera contro la contaminazione microbica.

Infine è necessario approfondire il forte potenziale antiossidante delle alghe brune. Queste ultime presentano infatti un potenziale antiossidante più elevato rispetto alle famiglie di alghe rosse e verdi, e contengono composti non presenti nelle fonti terrestri. I metodi chimici in vitro per valutare le attività antiossidanti, usati come primo approccio per valutare i potenziali agenti protettivi dall'attività delle specie chimiche reattive, hanno confermato che estratti grezzi di alghe brune, frazioni e componenti puri sono

comparativamente simili o superiori agli antiossidanti sintetici. Questa attività risulta estremamente importante quando si vanno ad analizzare gli effetti dei radicali sulle cellule e sull'organismo in toto. I radicali, o più in generale le specie chimiche reattive, radicaliche o meno che siano, è noto che partecipino in maniera attiva alla patogenesi di diverse malattie degenerative umane, inclusi disturbi cardiovascolari e neurodegenerativi e cancro (Aruoma et al., 1994; Kehrer et al., 1993) ed inducono un danno caratteristico dell'invecchiamento. Questi sono prodotti normalmente dalle cellule in condizioni fisiologiche durante la respirazione cellulare, e sono anche utilizzati e prodotti dall'organismo per distruggere i patogeni ed i tessuti danneggiati durante la fagocitosi infiammatoria, oltre che ad essere addirittura implicati nella segnalazione cellulare di riparazione del danno. I radicali liberi sono specie chimiche reattive, molecole o atomi, dotate di un singolo elettrone spaiato sull'orbitale esterno; proprio a causa di questa caratteristica chimica sono altamente instabili e reattivi, cercando di tornare all'equilibrio rubando all'atomo vicino l'elettrone necessario per pareggiare la propria carica elettromagnetica; i radicali liberi innescano quindi reazioni autocatalitiche reagendo in maniera incontrollata con altre molecole, come proteine, DNA e lipidi (Klaunig et al, 1997) inducendo danni ossidativi alle biomolecole che a loro volta vengono trasformate in radicali propagando la catena del danno. Esiste un equilibrio tra generazione e inattivazione dei ROS come perossido di idrogeno, anione superossido, radicale ossidrile e ossido di azoto (NO), le specie radicaliche più comuni nell'organismo, e per ridurre al minimo il danno molecolare, cellulare e tissutale le cellule hanno sviluppato meccanismi di difesa, tra cui chelanti metallici, antiossidanti a basso peso molecolare e sistemi enzimatici, e sono anche protette da composti chimici e prodotti naturali. In condizioni patologiche lo squilibrio tra i livelli di ROS e le difese antiossidanti viene perso con conseguente stress ossidativo che è

sempre una concausa dell'avvio e della promozione di malattie degenerative. La necessità di introdurre sostanze dall'esterno attraverso l'alimentazione in grado di andare a bloccare queste reazioni autocatalitiche, come ad esempio le vitamine, risulta quindi evidente per mantenere un buono stato di salute, e le alghe brune possono essere una fonte di nuove molecole con questa capacità. La protezione contro l'ossidazione è inoltre fondamentale non solo nel nostro organismo ma anche negli alimenti, per poterne mantenere le proprietà nutritive e organolettiche. In questi sistemi la perossidazione lipidica è tra i meccanismi più importanti, che coinvolge tre distinte fasi: iniziazione, con cause chimiche, termiche, elettromagnetiche ed enzimatiche, portando ad un aumento del numero di radicali liberi; propagazione del radicale mediante una reazione a catena, e terminazione producendo composti non radicali. I prodotti primari sono gli idroperossidi lipidici, che sono molto instabili e si degradano a prodotti di ossidazione secondari (aldeidi, chetoni, alcoli, idrocarburi) che influiscono sulla qualità degli alimenti. Gli antiossidanti possono agire eliminando le specie responsabili dell'iniziazione, interrompendo la reazione a catena, bloccando l'ossigeno singoletto, tramite chelazione dei metalli o inibendo specifici enzimi ossidativi. Spesso agiscono attraverso meccanismi misti e cooperativi (Choe et al. 2009; Craft et al., 2012). Le crescenti preoccupazioni per la salute hanno aumentato l'interesse di trovare antiossidanti naturali sicuri ed efficaci per sostituire quelli sintetici, che potrebbero avere alcuni effetti dannosi (Kahl et al., 1993). Di solito gli antiossidanti sintetici sono più efficienti a dosi più basse, mentre gli estratti naturali possono essere aggiunti in quantità maggiori poiché in molti casi sono generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS).

Anche nell'ambito della cosmesi i radicali liberi rappresentano uno dei principali obiettivi di cui si vuole ridurre l'attività. Le reazioni dei radicali liberi nella pelle, infatti, sono uno dei soggetti più interessanti della ricerca cosmetica, perché sono coinvolti in varie malattie



della pelle, inclusi tumori della pelle, rughe della pelle e invecchiamento della pelle (Darr et al., 1994). Inoltre bisogna anche sottolineare la presenza dei raggi UV ed il loro effetto sulla pelle. Le radiazioni ultraviolette solari sono infatti implicate in molti tipi di danni alla pelle. In seguito all'esposizione ai raggi UV, i radicali liberi e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) svolgono un ruolo importante nella produzione di radicali lipidici ( $L \bullet$ ) che sembrano essere responsabili della distruzione della membrana cellulare e infine della cellula. Sebbene siano meno implicati nei danni acuti della pelle (come l'eritema solare indotto dai raggi UVB), i raggi UVA penetrano più a fondo nella matrice cutanea dei tessuti della pelle rispetto ai raggi UVB, e sono quindi i raggi UVA alla fonte di effetti cutanei cronici deleteri come ad esempio un invecchiamento precoce della pelle. Fortunatamente sono molteplici le linee di difesa che si sono evolute per proteggere la pelle dallo stress ossidativo. Nonostante questo, è stato scoperto che l'irradiazione ultravioletta porta a una difesa antiossidante compromessa, con conseguente riduzione dell'attività di superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi e diminuzione di antiossidanti liposolubili e di vitamina C (Shindo et al., 1993). L'integrazione della pelle con antiossidanti esogeni è un approccio che risulta perciò estremamente valido nella limitazione del danno cutaneo indotto da specie reattive dell'ossigeno causato dalla radiazione UV. Questi antiossidanti esogeni possono essere sia di sintesi che naturali, ed in questo secondo caso l'ambiente marino può essere, con la sua grande biodiversità, una fonte di raccolta di queste sostanze da tenere in forte considerazione per sostituire gli antiossidanti sintetici, alcuni dei quali limitati a causa della loro cancerogenicità (Yan et al., 1998; Hirose et al., 1997). Tra tutti gli organismi marini, le macroalghe brune sono una inesauribile fonte di queste sostanze, e sono infatti già utilizzate nel campo della cosmesi in prodotti di cura della pelle, di protezione solare, cura dei capelli, emollienti, rigeneranti e creme anti-invecchiamento

(Maíra et al., 2017). L'estratto dell'alga bruna *Fucus vesiculosus*, ad esempio, viene utilizzato per ridurre la comparsa di occhiaie nell'area della pelle sotto l'occhio stimolando l'espressione dell'eme ossigenasi-1, che agisce rimuovendo i cataboliti eme. L'attività antiinfiammatoria e le proprietà antiossidanti dell'estratto nelle formulazioni topiche potrebbero migliorare l'aspetto delle "borse sotto gli occhi" e stimolare la produzione di collagene che potrebbe ridurre le rughe. Inoltre, potrebbe ridurre o addirittura evitare l'invecchiamento cutaneo a causa del trucco e dei filtri solari. (Sun et al., 2014.)

L'unico svantaggio nella produzione omogenea e su larga scala di alghe, poiché la corretta definizione delle migliori condizioni colturali durante la crescita è essenziale, è che la variazione di alcuni parametri può influenzare il profilo di composizione finale della biomassa. Tali parametri includono intensità della luce, controllo del pH, quantità di CO<sub>2</sub>, sostanze nutritive, perdita di acqua o persino contaminazione (Kiuru et al, 2014). Considerando le macroalghe, sono necessari studi sulle colture per stabilire lo sviluppo dalle cellule unicellulari al tallo multicellulare e persino agli aspetti morfologici, nutrizionali e fisiologici delle singole specie.

Infine, un ultimo possibile utilizzo delle alghe del genere *Cystoseira* è quello di bioaccumulatori di metalli pesanti. L'inquinamento da ioni metallici è infatti diventato un problema importante in molti paesi poiché il loro contenuto nelle acque potabili e nelle acque reflue spesso supera gli standard sanitari ammissibili.

Gli effluenti dei processi industriali rappresentano una delle fonti più importanti di inquinamento da metalli pesanti. Il cadmio, il piombo e il mercurio, nello specifico, sono i metalli pesanti con il maggior rischio potenziale a causa della loro elevata tossicità (Lodeiro et al., 2006).

Va da sé quindi che uno dei principali obiettivi della rimozione di metalli pesanti dalle acque reflue consiste nella riduzione di questi inquinanti a livelli molto bassi. Tecniche convenzionali come la precipitazione o lo scambio ionico non sono utili in questo caso o quando i metalli sono presenti a concentrazioni comprese tra 1 e 100 mg/L, troppo basse perché queste tecniche possano essere efficientemente utilizzate, ma comunque considerabili come elevate. Il bioassorbimento come processo di trattamento delle acque reflue è risultato un'alternativa economicamente fattibile per la rimozione dei metalli. Tra i diversi substrati biologici studiati, la biomassa algale ha ricevuto molta attenzione a causa del risparmio sui costi, della bassa sensibilità ai fattori ambientali e di impurità, del possibile recupero dei contaminanti dal biomateriale e della sua elevata capacità di adsorbimento, superiore al carbone attivo e paragonabile a quelli delle resine sintetiche a scambio ionico (Lacher et al., 2002). Uno studio su *Cystoseira baccata*, un'alga bruna appartenente all'ordine *Fucales*, si è concentrato proprio sul possibile utilizzo di questa alga in questo campo. Sembra infatti che la parete cellulare delle alghe svolga un ruolo importante nel legame con protoni e metalli grazie al suo alto contenuto di polisaccaridi con gruppi funzionali acidi (Crist et al., 1988; Schiewer et al., 1997). Le principali sostanze di questo tipo nelle alghe brune sono gli alginati, che di solito costituiscono circa il 20-40% del peso secco totale (Percival et al., 1967). Il lavoro si è concentrato sullo studio del piombo (II) e del cadmio (II) che si legano alla biomassa grezza di *C. baccata* ed è stata analizzata l'influenza della concentrazione iniziale di metallo, del pH, della salinità della soluzione e della sua temperatura. Di questi, il pH della soluzione è risultato essere il parametro che più influenza il bioassorbimento, e che la presenza di sali di calcio in soluzione lo influenza positivamente (Lodeiro et al., 2006).

### 1.3 GLI ALGINATI

È noto che le alghe, soprattutto le alghe brune, sono ricche di alginato. L'acido alginico e i suoi sali, gli alginati per l'appunto, sono ampiamente utilizzati in diversi settori a causa della loro capacità di addensare, gelificare, emulsionare e stabilizzare molteplici prodotti alimentari e industriali. La Food and Drug Administration ha concesso agli alginati lo status di GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro). Il comitato congiunto per gli additivi alimentari della FAO e degli esperti dell'OMS ha concluso che la dose giornaliera consentita di alginato di sodio è 0-50 mg per 1 kg di peso corporeo umano, ma nel 1990, visto l'enorme utilizzo e la completa assenza di effetti tossici, hanno rimosso i limiti del consumo giornaliero di alginati da parte dell'uomo. Per verificare la completa assenza di effetti tossici nel West Edinburgh Central Hospital, sono stati condotti studi speciali sugli effetti dietetici dell'alginato di sodio e dell'alginato di glicole propilenico. Nella prima fase, il 5% della razione giornaliera di alginati veniva introdotto nei ratti una volta al giorno per via intestinale per 30 giorni. Sia lo sviluppo degli animali che il funzionamento di tutti i sistemi non differivano significativamente da quelli del controllo e anche la struttura istologica degli organi risultava nella norma. Nella seconda fase, sono state fatte osservazioni cliniche su volontari che assumevano 175-200 mg di alginati per chilogrammo di peso corporeo al giorno; questa dose ha superato il consumo medio giornaliero di alginati di 30 volte. Dopo 7 giorni di una dieta abituale e 23 giorni della dieta di alginato seguita da 7 giorni di una dieta priva di alginato, sono stati registrati numerosi parametri ematologici, biochimici e coprologici. I diversi alginati testati non hanno mostrato effetti collaterali e tutti i parametri registrati noti come indicatori sensibili di effetti tossici sono rimasti invariati. Né reazioni allergiche né sensazioni spiacevoli soggettive sono state rivelate durante il periodo in cui sono stati assunti gli alginati (Anderson et al., 1991a; Anderson et al., 1991b). Inoltre negli

ultimi due decenni, sono apparsi numerosi articoli riguardanti gli effetti fisiologici degli alginati sugli organismi umani e animali e l'uso di farmaci a base di alginato in dietetica e medicina. Aggiungere alginato di sodio a farmaci antimicrobici promuove stimola i processi riparativi e promuove la cicatrizzazione della ferita. Una valutazione dell'efficienza delle miscele bioattive con varie basi ha mostrato che la base della miscela alginica è una delle più efficaci per il trattamento delle ferite settiche (Samoilova et al., 1990).

In chirurgia gli alginati sono usati principalmente come emostatici, in stomatologia l'alginato di calcio viene utilizzato come agente emostatico assorbente e, nella pratica gastroenterologica, miscele di acido alginico e alginati con antiacidi vengono utilizzate per prevenire il reflusso gastroesofageo e per curare la combustione epigastrica; alcuni esempi di farmaci famosi a base di alginato con questa attività sono "Gaviscon" e "Algitec". Importante sottolineare anche l'utilizzo dei farmaci a base di alginato nel trattamento dell'ulcera duodenale e quella gastrica. "Gastralgin", un farmaco composto da acido alginico, alginato di sodio, idrossido di alluminio, idrossido di magnesio e carbonato di calcio, è raccomandato per il trattamento dell'ulcera duodenale; negli studi clinici ha mostrato effetti curativi nel 50-80% dei pazienti, infatti l'epitelizzazione dell'ulcera e una diminuzione della frequenza di recidiva sono state registrate rispettivamente nel 40 e 25% dei pazienti (Brailski et al., 1987). Studi clinici comparativi sugli effetti di "Reflux forte", un farmaco alginato-antiacido, e "Syloxogen", un antiacido privo di alginato, sulle ulcere duodenali hanno dimostrato che, se usati insieme agli antagonisti dei recettori istaminici H<sub>2</sub>, questi farmaci forniscono entrambi un miglioramento della sindrome duodenale in tutto il periodo di osservazione (8 settimane), ma i pazienti che assumevano "Reflux forte" hanno dimostrato un recupero più rapido e efficace durante il periodo di ricovero (Chandra et al., 1989). Per quel che riguarda l'ulcera gastrica, questo effetto deriva dal fatto che

quando miscelato con l'acido cloridrico dei succhi gastrici, l'alginato di sodio forma la struttura a gel dell'acido alginico, che copre quindi la mucosa costituendo una "medicazione gastrica", e inibendo quindi la diffusione degli ioni idrogeno dal lume dello stomaco verso gli epitelio-citi. (Podkorytova et al., 1998). Sono stati studiati anche effetti dietetici in pazienti con ileostomia che assumevano giornalmente 7,5 g di alginato di sodio. L'additivo di alginato ha aumentato l'escrezione di steroli e acidi grassi del 140% e diminuito l'escrezione di acidi biliari del 12%. L'escrezione di sodio e potassio è aumentata in modo significativo, mentre quella di amido e azoto è rimasta invariata. Anche l'assorbimento di ferro, manganese, magnesio, calcio e zinco è rimasto invariato. Si ritiene che la maggiore escrezione di acidi grassi sia spiegata dal gel di alginato, che li lega e li cattura, riducendone l'assorbimento. (Sandberg et al., 1994) Nei casi di topi con obesità indotta sperimentalmente, gli alginati hanno normalizzato in modo significativo il contenuto lipidico, ed è stato visto che alginato di sodio con un peso molecolare relativo di 2700 kDa estratto da *Laminaria angustata var. longissima* aumenta l'escrezione fecale di colesterolo e inibisce l'aumento dei livelli di glucosio e insulina 30 minuti dopo un carico di glucosio. Queste proprietà sono però da attribuire solo ad alginati con pesi molecolari alti, alginati con un peso molecolare di 10 kDa non hanno mostrato alcun effetto sull'escrezione di colesterolo e sulla tolleranza del glucosio.

Di particolare interesse sono gli studi sugli effetti antitumorali degli alginati. L'alginato di sodio estratto da *Sargassum fulvellum* ha mostrato una significativa attività antitumorale su Sarcoma-180 solido e ascitico, carcinoma ascitico Ehrlich e carcinoma JMC nei topi. L'alginato ha aumentato sia l'attività citostatica che citolitica dei macrofagi e ciò ha suggerito una forte connessione tra l'attività antitumorale dell'alginato e l'attivazione dei macrofagi. (Fujihara et al., 1984)

#### 1.4 L' INFIAMMAZIONE

L'infiammazione, o flogosi, è una parte importante della complessa risposta biologica dei tessuti del corpo a stimoli dannosi, quali agenti patogeni, materiale particolato, cellule danneggiate, lesioni o composti tossici. In particolare, è una risposta aspecifica che coinvolge le cellule del sistema immunitario e diversi mediatori molecolari rilasciati sia dalle cellule immunitarie che dai tessuti danneggiati. La zona infiammata tipicamente è arrossata e più calda del normale, presenta un gonfiore, e comunemente si percepisce una sensazione di dolore spesso accompagnata da una perdita di funzione del tessuto interessato. Tutti questi eventi sono ricollegabili alle diverse fasi della infiammazione. La primissima fase, di brevissima durata, è una vasocostrizione locale causata dall'adrenalina e dall'endotelina 1 rilasciata dagli endotelioцитi in loco; questa vasocostrizione viene seguita immediatamente da una vasodilatazione con conseguente aumento del flusso ematico locale. La vasodilatazione locale, causata da sostanze come istamina ed NO, spiega l'arrossamento e il calore tipici della zona infiammata. A questo punto avviene la terza fase del processo infiammatorio: l'essudazione. Questa, causata da un aumento della permeabilità vascolare, porta alla fuoriuscita dai vasi di un essudato infiammatorio contenente proteine del complemento, immunoglobuline e altre sostanze che, non solo andranno ad agire esse stesse contro l'agente lesivo quando possibile, ma fungeranno da chemiotattici nei confronti delle cellule del sistema immunitario che si andranno ad accumulare nella zona lesa e ad eliminare la causa stimolante l'infiammazione, con successiva stimolazione della guarigione. La funzione dell'infiammazione è quindi risolvere la causa iniziale della lesione cellulare, eliminare le cellule necrotiche nei tessuti compromessi e stabilire le giuste condizioni per la riparazione dei tessuti. In alcuni disturbi può però svilupparsi un'infiammazione prolungata o cronica, detta istoflogosi, nella quale

coesistono fenomeni di infiammazione attiva, distruzione dei tessuti e tentativi di riparazione di quest'ultimi. Questa condizione di infiammazione cronica, causata dall'interruzione dei segnali molecolari necessari per controllare il processo, è oggi una caratteristica ampiamente riconosciuta dell'invecchiamento e delle malattie legate all'età come diabete, ipertensione, aterosclerosi e cancro (Sanada et al., 2018). In particolare, l'invecchiamento mostra un'infiammazione cronica di basso grado a livello sistemico sebbene in assenza di una causa infettiva specifica e riconosciuta. Questo fenomeno, definito "inflammaging", rappresenta un fattore di rischio significativo per la morbilità e la mortalità negli anziani.

Una delle cellule protagoniste dello stato infiammatorio sia acuto che cronico è rappresentata dai macrofagi; essi agiscono a numerosi livelli durante la risposta, ad esempio inghiottendo agenti estranei o eliminando detriti di tessuto nell'area danneggiata, ma soprattutto la loro azione è esplicitata tramite il rilascio di mediatori dell'infiammazione che regolano le varie fasi del processo e la successiva guarigione del tessuto. Oltre alle molecole già citate come prostaglandine E2 (PGE2) e ossido di azoto (NO), prodotti da una sovraespressione di cicloossigenasi 2 (COX-2) e di NO sintasi inducibile (iNOS), rispettivamente, sono rilasciate anche chemochine, citochine, fattori di crescita, diversi secondi messaggeri ed enzimi (Nathan C, 1992; Knöferl MW. et al., 2001).

Tra le citochine rilasciate dai macrofagi attivati, vanno citate per il loro ruolo centrale nella propagazione e nello sviluppo dell'infiammazione il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), l'interleuchina-1 (IL-1) e l'interleuchina-6 (IL-6) che insieme ad NO e PGE2 reclutano cellule infiammatorie e aumentando la permeabilità vascolare (Arango Duque et al., 2014). La risposta infiammatoria è vantaggiosa fintanto che le citochine sopra menzionate sono prodotte in quantità appropriate, ma diventa dannosa quando vengono prodotte in



maniera incontrollata. Ad esempio, la sovrapproduzione di IL-1 $\beta$  e TNF promuove una risposta infiammatoria sistemica acuta tipica dell'insufficienza multiorgano e dello shock settico (Beutler et al., 1999). Pertanto, l'inibizione di questi mediatori dell'infiammazione è considerata un approccio indispensabile per il trattamento delle malattie infiammatorie in generale.

L'infiammazione può anche essere innescata e propagata dallo stress ossidativo che si verifica quando il sistema di difesa antiossidante del corpo non riesce a contenere la produzione e il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Ames et al., 1993).

## 2 SCOPO DELLA TESI

L'infiammazione e lo stress ossidativo fanno parte della complessa risposta biologica dei tessuti del corpo agli stimoli dannosi. Negli ultimi anni, a causa delle numerose malattie in cui è implicato lo stress ossidativo, le industrie farmaceutiche hanno investito nella ricerca e nello sviluppo di nuovi composti antiossidanti. In effetti, molte molecole interessanti come terpenoidi, alcaloidi e steroidi sono state isolate da diverse specie di alghe brune, nonostante siano stati pubblicati pochi studi sulle proprietà farmacologiche di questi composti.

In questo studio, estratti etanolici al 50% e in DMSO della specie *C. amentacea* var. *stricta* sono stati ottenuti per la prima volta da alghe raccolte nel Mar Ligure (Mediterraneo nord-occidentale) e ne sono state studiate le proprietà bioattive in termini di quantificazione di specifiche attività antiossidanti tramite opportuni test spettrofotometrici di scavenging delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), e test per valutare le proprietà antinfiammatorie su macrofagi stimolati con LPS mediante quantificazione di citochine pro-infiammatorie. Lo scopo ultimo è quindi quello di poter introdurre l'utilizzo di *C. amentacea* ed i suoi metaboliti in diversi campi: nella cosmeceutica sotto forma per esempio di lozioni cosmetiche lenitive per pelli infiammate e/o danneggiate, in nutraceutica come additivi alimentari antiossidanti in formulazioni antiaging o integratori, nonché in campo farmaceutico per sfruttare le sue attività antiinfiammatorie.

## MATERIALI E METODI

### 1. RACCOLTA DELLE ALGHE

Le fronde di *C. amentacea* sono state raccolte nella zona centrale, su coste rocciose esposte, a Bogliasco, Genova (NW Italia, 44° 22'40.37 "N — 9° 4'35.14" E) nell'estate 2017. Dopo la raccolta, sono state conservate a freddo in buste di plastica e immediatamente trasportate al laboratorio dell'Università di Genova.

### 2. PRODUZIONE DI ESTRATTI DI *CYSTOSEIRA AMENTACEA*

Le fronde di *C. amentacea* sono state lavate con acqua deionizzata, essiccate all'aria e tagliate a pezzetti, quindi essiccate in un liofilizzatore. Gli estratti sono stati ottenuti mediante incubazione in condizioni lievi per 48 ore al buio in uno shaker rotativo a 30 ° C di 2 g di fronde liofilizzate in 20 ml di due diversi solventi:

- DMSO
- 50% ETANOLO

Alla fine dell'estrazione le sospensioni sono state filtrate e un'aliquota è stata liofilizzata e utilizzata per determinare la quantità di sostanze estratte con i due solventi. Infine sono state diluite a una concentrazione iniziale di 5 mg/ml. Lo stoccaggio è stato effettuato a -20°C.

### 3. CONTENUTO FENOLICO TOTALE

Il contenuto fenolico totale (TPC) è stato determinato secondo il dosaggio Folin-Ciocalteu riportato da Biju et al. (2014). La miscela di reazione conteneva 100 µl di estratti di *C. amentacea* (5 mg/ml concentrazione iniziale), 800 µl di acqua deionizzata e 100 µl del reagente Folin-Ciocalteu. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, alla

miscela sono stati aggiunti 1 ml di soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10%. Dopo incubazione per 60 minuti al buio a R.T, l'assorbanza a 550 nm è stata letta con uno spettrofotometro Beckman (DU 640). La concentrazione fenolica è stata ottenuta confrontando i valori con una curva di calibrazione basata su diverse concentrazioni di acido gallico (da 0,05 a 20 µg/ml) e il contenuto fenolico totale è stato espresso in mg di acido gallico equivalente (GAE).

#### 4. CONTENUTO TOTALE DI FLAVONOIDI

Il contenuto totale di flavonoidi (TFC) è stato misurato dal test colorimetrico AlCl<sub>3</sub> riportato da Biju et al. (2014). La miscela di reazione è stata preparata con 100 µl di estratti di *C. amentacea* (5 mg/ml concentrazione iniziale), 400 µl di acqua distillata e 30 µl di NaNO<sub>2</sub> al 5%. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 30 µl di AlCl<sub>3</sub> al 10% e dopo altri 5 minuti sono stati aggiunti anche 200 µl di NaOH 1 M. Infine, il volume è stato portato a 1 ml con acqua deionizzata e l'assorbanza è stata misurata a 510 nm usando uno spettrofotometro Beckman (DU 640). La concentrazione di flavonoidi è stata ottenuta confrontando i valori con una curva di calibrazione basata su diverse concentrazioni di quercetina (da 15 a 300 µg/ml) e il contenuto totale di fenolo è stato espresso in mg di quercetina equivalente (QE).

#### 5. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DEL RADICALE DPPH

L'attività di scavenging dei radicali è stata valutata con il metodo DPPH (Pozzolini et al., 2018). La miscela di reazione è stata preparata con diluizioni di estratto di *C. amentacea* a diverse concentrazioni (1,25; 0,5 e 0,25 mg/ml finale) in 250 µl di acqua deionizzata, 500 µl di metanolo, 250 µl di DPPH 0,2 mM (2, 2-difenil-1-picrylhydrazyl, Calbiochem®, Millipore SpA, Milano, Italia) disciolto in metanolo, con un volume finale di 1 ml per campione. Il "bianco" è stato preparato con 750 µl di metanolo e 250 µl di acqua. Il controllo negativo

è stato effettuato con 250 µl di acqua deionizzata, 500 µl di metanolo, 250 µl di DPPH 0,2 mM disciolto in metanolo, mentre il controllo positivo con acido ascorbico (0,5 mg/ml, concentrazione finale) disciolto in 250 µl di acqua, 500 µl di metanolo, 250 µl di DPPH 0,2 mM in metanolo. Tutti i campioni sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente al buio e successivamente letti a 517 nm usando uno spettrofotometro Beckman (DU 640). A causa del colore naturale degli estratti, è stata prodotta anche una soluzione contenente solo gli estratti in acqua e metanolo con un rapporto rispettivamente di 1:3 senza DPPH, al fine di sottrarre l'assorbanza naturale degli estratti a 517 nm e correggere i valori di scavenging antiossidanti ottenuti. La procedura è stata eseguita tre volte in duplice copia.

#### 6. TEST DI RIDUZIONE DEL FE (III)

La capacità degli estratti di *C. amentacea* di ridurre il ferro (III) è stata determinata usando il metodo riportato da Sampath Kumar et. al (2010). Le diluizioni di *C. amentacea* (1,25; 0,5 e 0,25 mg/ml finale) di entrambi i tipi di estratto sono state miscelate a 250 µl di tampone fosfato 200 mM (pH 6,6) e 250 µl di ferricianuro di potassio all'1%. La miscela è stata incubata a 50°C per 30 minuti, quindi sono stati aggiunti 250 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 10%. La miscela è stata quindi centrifugata a 10000 rpm per 10 minuti. 500 µl del surnatante sono stati miscelati con 500 µl di acqua distillata e 100 µl di 0,1% di AlCl<sub>3</sub>. Dopo 10 minuti l'assorbanza della soluzione risultante è stata misurata a 700 nm usando uno spettrofotometro Beckman (DU 640). La procedura è stata eseguita in doppio.

Il controllo negativo è stato prodotto sostituendo gli estratti con acqua, mentre nel controllo positivo gli estratti sono stati sostituiti con una soluzione di acido ascorbico (20 µg/ml concentrazione finale). Il potere riducente è stato calcolato in percentuale rispetto all'attività massima del controllo positivo

## 7. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DEL RADICALE OH•

L'attività di scavenging dei radicali ossidrilici degli estratti è stata determinata utilizzando il metodo del sale di Mohr riportato da Pavithra et al. (2015). La miscela di reazione conteneva un'aliquota di 100 µl di estratto (concentrazione iniziale 5 mg/ml), 100 µl di soluzione di ferro-EDTA (0,13% di solfato di ammonio ferroso e 0,26% di EDTA), 50 µl di soluzione di EDTA allo 0,018%, 100 µl di DMSO soluzione (0,85% in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4) e 50 µl di acido ascorbico 0,22%. Dopo un'incubazione a 80–90°C per 15 minuti, la reazione è stata fermata aggiungendo 100 µl di TCA ghiacciato (17,5%). Infine, sono stati aggiunti 300 µl di reagente di Nash (75,0 g di acetato di ammonio, 3 mL di acido acetico glaciale e 2 mL di acetil acetone in 1 L di acqua distillata) e letti a 412 nm in uno spettrofotometro Beckman (DU640) dopo 15 minuti. L'intensità del colore giallo è stata misurata a 412 nm rispetto a un reagente in bianco realizzato con 300 µl di reagente Nash, 100 µl di TCA ghiacciato (17,5%) e 600 µl di acqua deionizzata. Il controllo negativo è stato effettuato sostituendo gli estratti con acqua, mentre nel controllo positivo è stata utilizzata la quercetina.

## 8. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DI NO

L'attività di scavenging di NO è stata valutata utilizzando il saggio riportato da Xu et al. (2011). Sono state aggiunte varie diluizioni di estratti di *C. amentacea* (concentrazione iniziale 5 mg/ml) in 250 µl di tampone fosfato (0,1 M, pH 7,4) a 500 µl di nitroprussiato di sodio 5 mM e 250 µl di tampone fosfato (pH 7,4). I campioni sono stati incubati alla luce di una lampada a T.A. per 30 minuti, per produrre NO. Successivamente, è stato aggiunto alla miscela un volume uguale di reagente Griess (1% sulphanilamide, 0,1% naftil-etilenediammina in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5%). Dopo l'incubazione in T.A. per 10 minuti al buio, l'assorbanza è

stata misurata a 546 nm attraverso uno spettrofotometro Beckman. Per la curva di calibrazione sono state utilizzate diluizioni scalari di NaNO<sub>2</sub> (1-5-10-50 µM).

## 9. COLTURE CELLULARI

La linea cellulare di macrofagi murini RAW 264.7 e la linea cellulare di fibroblasti murini L929 sono state ottenute dalla American Type Culture Collection (LGC Standards srl, Milano, Italia). Le cellule sono state coltivate a 37 ° C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> in glucosio alto Il terreno dell'aquila modificato di Dulbecco (D-MEM) con glutammina (Microtech srl, Napoli, Italia), integrato con siero bovino fetale al 10% (Microtech) con penicillina/streptomina come antibiotici.

### 9.1. VITALITÀ CELLULARE

La citotossicità degli estratti è stata valutata su macrofagi murini RAW 264.7 e fibroblasti murini L929. Macrofagi RAW 264.7 sono stati seminati a 25000 cellule/pozzetto, mentre i fibroblasti L929 sono stati seminati a 10000/pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Dopo un giorno, gli estratti sono stati aggiunti ai pozzetti e le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C. Sono stati aggiunti estratti di *C. amentacea* a 5, 10, 50 e 100 µg/ml di concentrazioni finali. Sono stati testati anche i soli solventi (diluizioni finali dell'1%). Alla fine del tempo di incubazione, la vitalità cellulare è stata valutata dal test MTT (Pozzolini et al. 2016).

Sono stati condotti esperimenti in quadruplicato.

### 9.2. RIDUZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ CAUSATA DA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La capacità di tamponare gli effetti citotossici della H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degli estratti di *C. amentacea* è stata valutata su colture di macrofagi RAW 264.7 e fibroblasti L929. Sono stati condotti esperimenti in quadruplicato su piastre da 96 pozzetti nei quali sono stati seminati 25000 macrofagi RAW 264.7/pozzetto, mentre di fibroblasti L929 ne sono stati seminati

10000/pozzetto. Dopo un giorno, le cellule sono state trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM in presenza o in assenza di varie concentrazioni di estratti (da 1 a 100 µg/ml) e tutte le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C. Alla fine del tempo di incubazione, la vitalità cellulare è stata valutata mediante test MTT.

### 9.3. RIDUZIONE DELLA PRODUZIONE DI NO NEI MACROFAGI RAW 264.7 TRATTATI CON LPS

Macrofagi RAW 264.7 sono stati seminati 1x10<sup>6</sup>/pozzetto in piastre da 6 pozzetti, in duplicato. Il giorno dopo le cellule sono state trattate con lipopolisaccaride batterico (da 100 ng/ml a 1 µg/ml) in presenza o assenza di estratti di *C. amentacea* (50 e 100 µg/ml). Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, il contenuto di nitriti del terreno è stato quantificato usando il dosaggio Griess già descritto precedentemente, mentre le cellule sono state lisate con 400 µl di tampone di lisi (DTT 100 mM, SDS al 2% , Glicerolo al 10% e TRIS-HCl 50 mM, portato a pH 6,8). I lisati sono stati riscaldati a 100°C per 10 minuti e la concentrazione proteica è stata determinata dal dosaggio Bradford (Bradford, 1976). La produzione di nitriti in ciascun campione è stata quindi normalizzata sul contenuto proteico dei pozzetti. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

### 9.4. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI MACROFAGI RAW 264.7 ATTIVATI DA LPS

Sono stati seminati 1x10<sup>6</sup> macrofagi RAW 264.7 /pozzetto in piastre da 6 pozzetti, in duplicato. Il giorno dopo le cellule sono state trattate con lipopolisaccaride batterico (da 100 ng/ml a 500 ng/ml) in presenza o assenza di estratti di *C. amentacea* (50 e 100 µg/ml) per 8 ore. L' espressione genica dei mediatori dell'infiammazione quali: fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α, a.n. NM\_001278601.1), interleuchina-1beta (IL-1β a.n. NM\_008361.4), interleuchina-6 (IL-6, NM\_031168. 2), NO sintasi inducibile (iNOS,



NM\_010927.4) e cicloossigenasi-2 (COX-2, a.n. NM\_011198.4) normalizzati sul gene GAPDH usato come housekeeping (a.n. NM\_001289726.1) sono stati valutati attraverso una qPCR. L'RNA cellulare è stato estratto utilizzando il kit RNeasyMini (Qiagen, Milano, Italia), secondo le istruzioni del produttore. La qualità e la quantità di RNA sono state analizzate utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Il cDNA è stato sintetizzato da 1 µg di RNA utilizzando il kit di sintesi cDNA iScript (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia). Ogni reazione di PCR è stata eseguita in 10 µl contenenti: 1 × Master Mix iQ SYBR<sup>®</sup>Green (Bio-Rad), 0,2 µM di ciascun primer e 5 ng di cDNA sintetizzato. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato. Sono state utilizzate le seguenti condizioni termiche: denaturazione iniziale a 95°C per 3 minuti seguita da 45 cicli con denaturazione a 95°C per 15 s, annealing e allungamento a 60°C per 60 s. La fluorescenza è stata misurata alla fine di ogni fase di allungamento. I valori sono stati normalizzati all'espressione di mRNA di GAPDH (gene di riferimento). Tutti i primer sono stati progettati utilizzando il software Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto CA, USA) e ottenuti da TibMolBiol (Genova, Italia). Le analisi dei dati sono state ottenute utilizzando il programma software DNA Engine Opticon 3 Real-Time Detection System (versione 3.03) e, al fine di calcolare l'espressione genica relativa rispetto a un campione di calibratore non trattato (controllo), è stato utilizzato il metodo comparativo della soglia Ct all'interno di Gene Expression Analysis per il software iCycler iQ Real Time Detection System (Bio-Rad, Milano, Italia).

GENE	GenBank (a.n.)	Forward	Reverse	Size (bp)
COX-2	NM_011198.4	CCAgCAAAGCCTAgAgCAAC	AgCACAAAACCAggATCAgg	126
IL-1 $\beta$	NM_008361.4	gCAgCACATCAACAAGAg	CAgCAggTTATCATCATCAT C	184
TNF- $\alpha$	NM_00127860 1.1	CCACCATCAAaggACTCAA	ATCTTATCCAgCCTCATTCT	120
IL-6	NM_031168.2	ACCTgTCTATACCACTTC	gCATCATCgTTgTTCATA	117
iNOS	NM_010927.4	CCgCCgCTCTAATACTTA	TTCATCAAggAATTATACAg gAA	121
GAPDH	NM_00128972 6.1	TCTCCCTCACAATTTCCATCCCA g	gggTgCAGCgAACTT TATTgATgg	99

Copie di primer utilizzate nella quantificazione dell'espressione genica mediante analisi qPCR nei macrofagi murini RAW 264.7

## 9.5 WOUND HEALING ASSAY

Per valutare l'effetto degli estratti di *C. amentacea* sulla crescita e sulla migrazione cellulare, è stato eseguito sui cheratinociti HaCaT e sui fibroblasti L929 il wound healing assay, o "Scratch test". Le cellule sono state piastrate ad una concentrazione di 400000 cellule/pozzetto in terreno completo su piastre da 12 pozzetti e sono state incubate per 24 ore. Il monostrato cellulare in ciascun pozzetto è stato quindi inciso con la punta di una pipetta p100, in modo da creare uno "scratch". Dopo che le cellule sono state lavate con PBS per rimuovere le cellule staccate e i detriti, si è aggiunto nuovo terreno in presenza o in assenza degli estratti; l'estratto di DMSO presentava una concentrazione finale di 150  $\mu\text{g/ml}$ , mentre l'attività dell'estratto 50% etanolo è stata testata a due concentrazioni

diverse: 150 µg/ml e 300 µg/ml. In seguito, lo scratch presente in ciascun pozzetto è stato fotografato al microscopio ottico con un obiettivo 4x in quattro punti fissi, a diversi intervalli di tempo; nello specifico dopo 0 ore, 6 ore, 24 ore e 30 ore. Per determinare il grado di guarigione della ferita nei cheratinociti HaCaT, in ogni fotografia è stata misurata due volte la distanza tra i margini dello scratch, usando il programma gratuito ImageJ. I risultati sono stati poi espressi come la percentuale della distanza tra i margini dello scratch di ciascun campione rispetto al medesimo campione al tempo iniziale, pertanto una diminuzione di tale percentuale indicava un incremento nella crescita e nella migrazione delle cellule. Invece, nei fibroblasti L929 il grado di guarigione della ferita è stato determinato con un metodo visivo qualitativo, che indicava per ciascun campione l'aumento della densità cellulare nell'area dello scratch durante l'esperimento.

## 10 ANALISI STATISTICA

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il one-way ANOVA seguito dal Tukey test (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati significativi

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### 1. RESA DI ESTRAZIONE, CONTENUTO FENOLICO E FLAVONOIDE TOTALE DI ESTRATTI DI *C. AMENTACEA*

Le estrazioni con etanolo al 50% e DMSO, per recuperare una frazione più idrofila e una più idrofoba, sono state eseguite agitando a 30°C per 48 ore al buio, con una resa rispettivamente di  $310 \pm 50$  mg e  $171 \pm 32$  di estratto grezzo per grammo di alghe secche. Queste condizioni delicate sono state scelte con l'obiettivo di recuperare i prodotti molecolari con la massima stabilità poiché è stato riportato (Volf et al., 2014) che un certo grado di instabilità termica (15-30% a seconda delle specie molecolari) si osserva per i polifenoli a temperature superiori a 60°C, nonché per un certo grado di foto-ossidazione per esposizione alla luce UV (10-50%). Queste rese erano paragonabili alle rese ottenute da vari solventi di estrazione utilizzati per valutare il potenziale bioattivo di *C. barbata* di Trifan et al. (2019), e significativamente superiore a quelli ottenuti da Ruberto et al. (2001) usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, facendo una estrazione organica di varie specie dal genere *Cystoseira* (dal 2,1% al 6,7% a seconda della specie). In particolare, l'estratto etanolicò di questo studio (resa del 31%) era molto simile all'estratto di acetone al 70% per *C. barbata* di Volf et al. (Resa del 24%), sebbene in questo caso sia stato ottenuto utilizzando un solvente più economico e meno tossico.

Un grande contributo all'attività antiossidante e antinfiammatoria di numerosi estratti vegetali è dovuto al loro contenuto in polifenoli. Pertanto, si è inizialmente misurato il contenuto fenolico totale (TPC) e il contenuto flavonoide totale (TFC) dei due estratti mediante appropriati dosaggi colorimetrici. Entrambi gli estratti contenevano quantità misurabili di TPC e TFC, sebbene in proporzioni diverse. L'estratto etanolicò conteneva

infatti 20,3  $\mu\text{g}$  TPC/mg, corrispondente a 6,3 mg/g di alghe secche, di cui il 15,3% (0,96 mg/g) era costituito da flavonoidi, mentre nell'estratto di DMSO il contenuto di TPC era di 65,9  $\mu\text{g}$ /mg, corrispondente a 11,2 mg/g di alghe secche, di cui il 24% (2,69 mg/g) era rappresentato da flavonoidi. Entrambe le quantificazioni, sia quella con il saggio di Folin-Ciocalteu che quella con test colorimetrico  $\text{AlCl}_3$ , hanno quindi sottolineato un contenuto più elevato di polifenoli e flavonoidi nell'estratto di DMSO rispetto all'estratto di etanolo al 50%; nello specifico, i contenuti di TPC e TFC dell'estratto di DMSO erano rispettivamente 3,2 e 5,1 volte più alti dell'estratto etanolic. Questi risultati sono molto simili al TPC osservato nell'unico altro studio sulla *C. amentacea* raccolta nell'area costiera siciliana mediterranea che valutava la fluttuazione stagionale del TPC in questa alga (Mannino et al., 2014). In quel caso l'estrazione dei polifenoli era stata ottenuta con etanolo al 95% e il TPC aveva una fluttuazione stagionale che andava da un contenuto minimo di TPC in inverno (meno di 1 mg/g di alghe secche) ad un contenuto massimo in estate (6 mg/g di alghe secche). Poiché le alghe utilizzate in questo studio sono state raccolte nella stagione estiva nel Mediterraneo dalle coste liguri, i dati ottenuti confermano i dati dello studio siciliano. Inoltre, i risultati dei due studi indicano che non vi è alcuna differenza in termini di resa TPC tra i due metodi di estrazione (50% etanolo o 95% etanolo), sebbene le condizioni utilizzate in questo studio siano più interessanti sia per la loro sicurezza, vista la minore infiammabilità del solvente, sia da un punto di vista economico. Altri studi riportano rese TPC da estratti di varie specie del genere *Cystoseira*, con una grande variabilità che va da 50-61 mg/g negli estratti acquosi di *C. compressa*, *crinita* e *sedoides* raccolte in zone costiere tunisine mediterranee in Mhadhebi et al. (2014), 126-236 mg/g negli estratti di acetone, metanolo e acqua di *C. barbata* proveniente da zone costiere del Mar Nero nel lavoro di Trifan et al. (2019), 4,7-32 mg/g da *C. humilis*, 45-165 mg/g da *C. tamariscifolia* e

17-127 mg/g da *C. usneoides* dei litorali portoghesi in estratti sequenziali organici, nel lavoro di Vizetto-Duarte et al. (2016). Confrontando il contenuto di TPC di *C. amentacea* con le altre specie del genere *Cystoseira* analizzate in letteratura, possiamo dedurre che questa specie sembra in generale avere un contenuto di TPC inferiore rispetto alle altre (1 ordine di grandezza), con rese simili ottenute solo in *C. humilis* dalle coste portoghesi, probabilmente dovuto non solo alle diverse condizioni di estrazione nei vari studi, ma anche alla variabilità ambientale, spaziale e temporale della raccolta delle alghe.

Tipo di estratto	TPC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ estratto grezzo)	TFC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ estratto grezzo)
50%-ethanol	20.3 $\pm$ 0.74	3.1 $\pm$ 0.48
DMSO	65.9 $\pm$ 1.74	15.8 $\pm$ 0.51

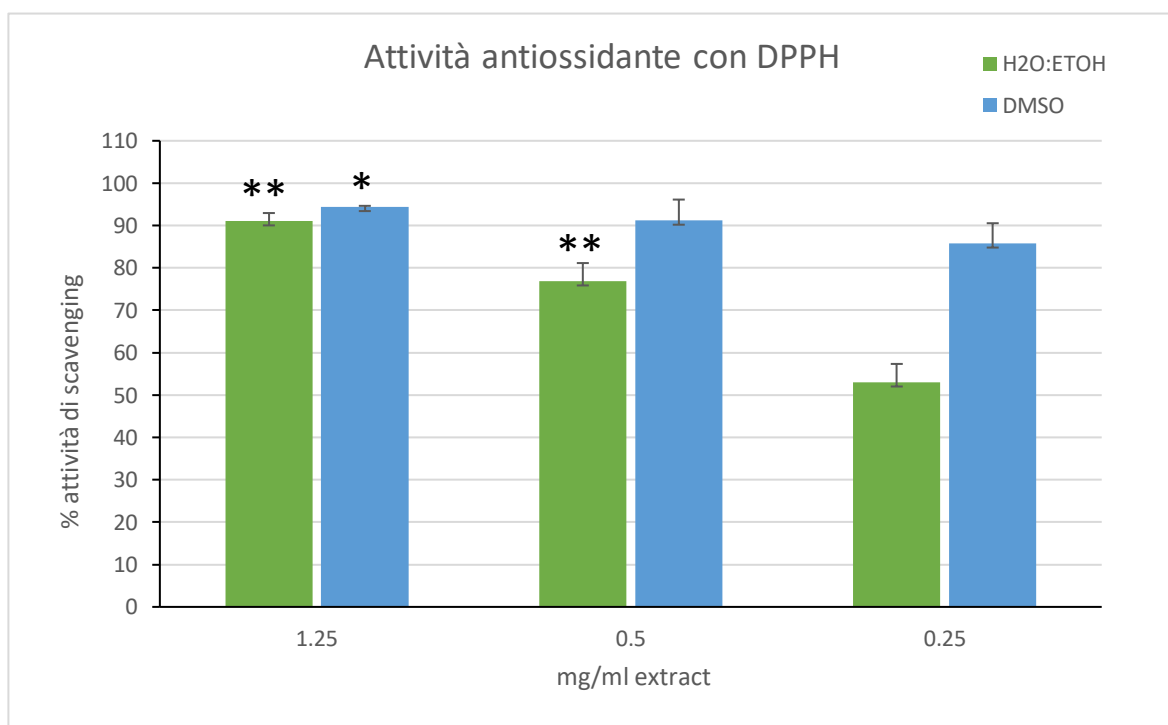
**Quantificazione del contenuto fenolico totale (TPC) e del contenuto flavonoide totale (TFC) due estratti ottenuti da *C. amentacea*. I valori sono espressi come media  $\pm$  S.D.**

## 2. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEGLI ESTRATTI DI *C. AMENTACEA*

L'attività antiossidante dei due estratti è stata valutata con diversi metodi che mirano a determinare l'attività di eliminazione dei radicali e il potere riducente nei confronti del Fe dei metaboliti di *C. amentacea*, nonché la capacità di eliminazione di radicali biologicamente pericolosi come l'ossido di azoto altamente reattivo (NO) e i radicali ossidrilici (OH).

## 2.1. ATTIVITÀ DI SCAVENGING DEL RADICALE DPPH

L'attività complessiva di eliminazione dei radicali misurata tramite il dosaggio DPPH ha rivelato un potenziale elevato per entrambi gli estratti (Fig 1). Alla massima concentrazione testata, infatti, entrambi gli estratti hanno mostrato una potenza di scavenging estremamente alta, superiore al 90%, mentre alla minima concentrazione l'estratto etanologico ha mantenuto un'attività di scavenging leggermente superiore al 50% (barre verdi), con un EC50 calcolato di 205,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mentre alla stessa concentrazione l'estratto di DMSO (barre celesti) mostrava un'attività di scavenging ancora superiore all'80%, con un EC50 calcolato di 0,34  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



**Figura 1: attività di scavenging dei radicali ottenuta dal dosaggio DPPH.**

I dati sono la media  $\pm$  S.D. di tre esperimenti eseguiti in doppio e sono espressi come percentuale di attività antiossidante rispetto all'assorbanza del controllo negativo. Barre verdi: estratto di etanolo al 50%, barre celesti: estratto di DMSO. Gli asterischi indicano significatività del test Tukey accoppiato tra le varie concentrazioni utilizzate (ANOVA  $p < 0.0005$ , barre verdi: Tukey tra 1,25 e 0,5, tra 1,25 e 0,25 e tra 0,5 e 0,25 \*\*  $p < 0,001$ ; barre celesti: Tukey tra 1,25 e 0,5 e tra 1,25 e 0,25, \*  $p < 0,005$

Similmente ai dati ottenuti in questo lavoro, anche gli estratti di acetone di *C. amentacea* var. *spicata* (Adriatico, litorali montenegrini) di Stanojkovic et al. (2014) hanno mostrato un'attività antiossidante vicina agli estratti etanolici ottenuti in questo studio, indicando che l'abbondanza di metaboliti antiossidanti prodotti dalla stessa specie, sebbene di una diversa varietà, non cambia considerevolmente tra i due ambienti marini (Mediterraneo e Adriatico). Viceversa, rispetto ad altre specie dello stesso genere riportate in letteratura, *C. amentacea* var. *stricta* è, a seconda della procedura di estrazione, significativamente più ricca di composti antiossidanti o con quantità comparabili, e ciò nonostante il contenuto di TPC sia di solito molto più basso rispetto alle altre specie dello stesso genere. Ad esempio, Trifan et al (2019) hanno riportato un EC50 di estratti di *C. barbata* strettamente paragonabile al quello di questo studio (da 88 a 211 µg/ml a seconda del solvente di estrazione), Mhadhebi et al (2014) hanno documentato rispettivamente valori di EC50 di 20, 75 e 12 µg/ml per estratti di *C. crinita*, *sedoides* e *compressa*, mentre Vizetto-Duarte et al. (2016) hanno ottenuto potenziali antiossidanti significativamente più bassi dai loro estratti organici di *C. humilis* e *C. usneoides* (EC50 > 1 mg/ml) rispetto a quello di *C. tamarscifolia* (EC50 tra 170 e 1080 µg/ml) nello stesso studio. Quest'ultima specie in particolare è l'unica simile agli estratti di *C. amentacea* var. *stricta* trattati in questa tesi. Valori comparabili ai risultati qui ottenuti sono quelli pubblicati da Andrade et al. (2013) che hanno usato degli estratti etanolici di *C. tamarscifolia* e *usneoides*, mentre nello stesso studio sono stati trovati valori molto bassi di potenziale antiossidanti in *C. nodicaulis* e *C. spongiosus* (EC50 > 1 mg/ml).

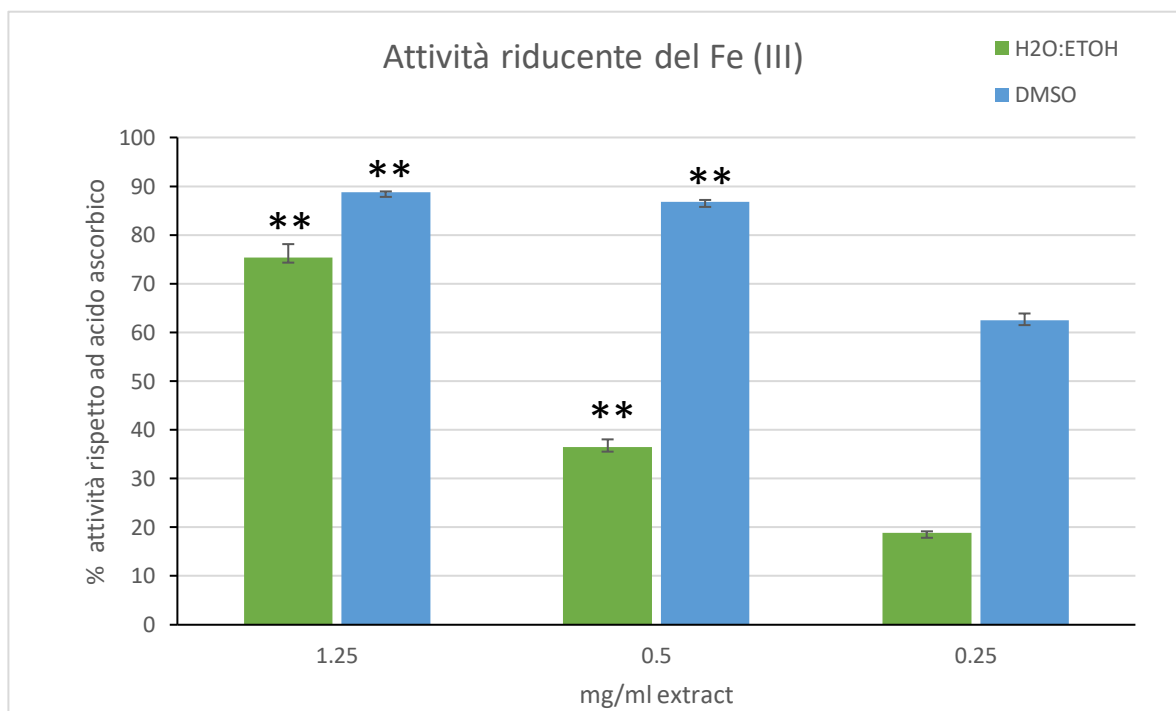


## 2.2 TEST DI RIDUZIONE DEL Fe (III)

Dopo aver valutato l'attività antiossidante complessiva degli estratti, sono state analizzate le specifiche proprietà di scavenging delle specie reattive dell'ossigeno solitamente prodotte sotto stress ossidativo e di conseguenza, anche durante l'infiammazione acuta e cronica, cercando di capire quali ROS sarebbero maggiormente colpiti a livello intracellulare dall'uso farmacologico di estratti di *C. amentacea*.

Per osservare la capacità riducente sul Fe (III) è stato utilizzato il metodo del ferricianuro di potassio. Questa è una misura del potere antiossidante dell'estratto estremamente importante, in quanto il Fe (III) è il responsabile della reazione di Fenton che porta alla produzione di anione superossido, e rimane perciò un target utile per limitare il danno ossidativo (Winterbourn et al., 1995). Dal risultato del test, i metaboliti contenuti in entrambi gli estratti di *C. amentacea* (Fig. 2) hanno una capacità riducente nei confronti del Fe (III), sebbene questa sia significativamente più elevata nell'estratto di DMSO (barre celesti) rispetto all'estratto etanolic (barre verdi). In particolare, i risultati sono espressi come percentuale di attività riducente dei due estratti a diverse concentrazioni rispetto all'attività riducente di una concentrazione di acido ascorbico (20 µg/ml, nelle condizioni sperimentali qui usate) che consente una riduzione completa del Fe (III) a Fe (II). L'estratto di DMSO ha mostrato un'attività riducente vicina al 90% alla massima concentrazione e comunque superiore al 60% alla minima concentrazione, con un EC50 calcolato di 113,9 µg/ml. Al contrario, l'estratto etanolic alla massima concentrazione ha esercitato un'attività riducente del 75%, mentre alla minima concentrazione l'attività era inferiore al 20%, con un EC50 calcolato di 643,5 µg/ml. Lo studio di Mhadhebi et al. (2014) è l'unico a riportare questo test sugli estratti di *C. compressa*, *crinita* e *sedoides* con valori espressi in mg di equivalenti di acido gallico (GAE/g) di alga essiccata che variano rispettivamente tra

2,6; 0,9 e 0,7. Esprimendo i risultati ottenuti sugli estratti di *C. amentacea* come mg di equivalenti di acido ascorbico (AAE/g) di alghe secche si ottengono valori di 2,5 e 3,7 mg di AAE/g di alghe secche. Poiché è stato riportato che l'acido gallico e l'acido ascorbico mostrano attività antiossidanti molto simili (Dar et al., 2017), allora possiamo dedurre che le prestazioni degli estratti di *C. amentacea* nell'attività di riduzione del Fe sono paragonabili alle attività riportate nella letteratura per *C. compressa*, *crinita* e *sedoides*, ottenendo risultati molto promettenti.



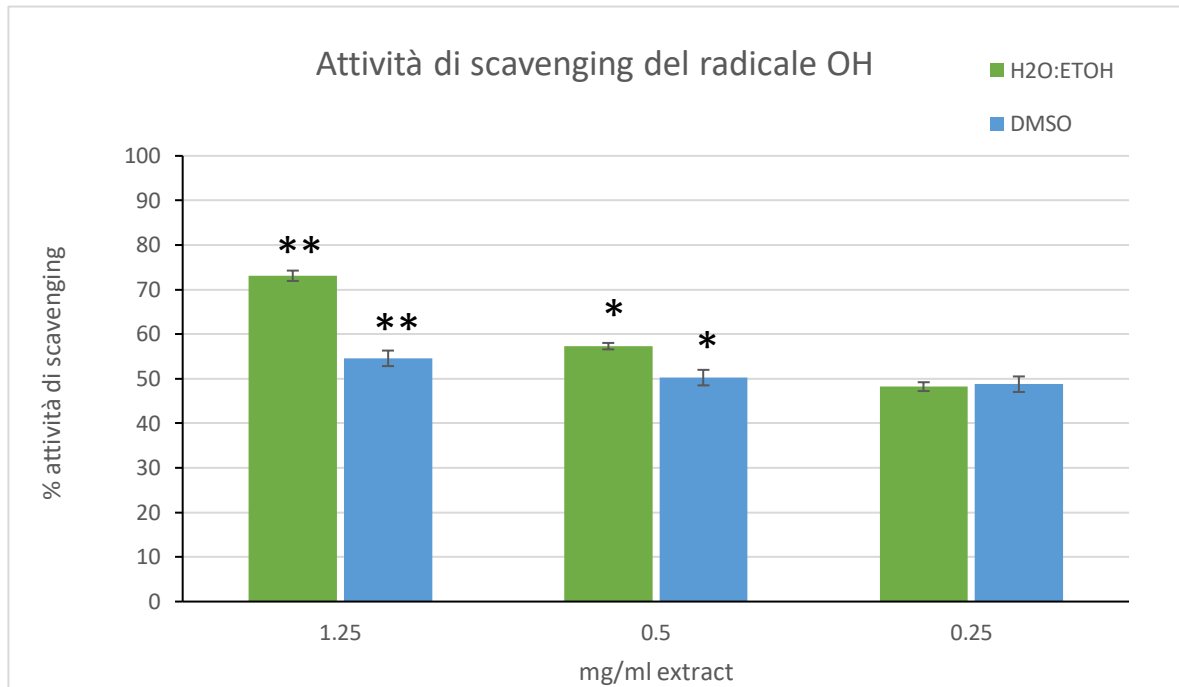
**Figura 2: attività riducente del Fe (III) ottenuta dal dosaggio del ferrocianuro di potassio.**

I dati sono la media  $\pm$  S.D. di tre esperimenti eseguiti in doppio e sono espressi come percentuale di potere riducente rispetto al controllo positivo dell'acido ascorbico. Barre verdi: estratto di etanolo al 50%, barre celesti: estratto di DMSO. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey accoppiato tra le varie concentrazioni utilizzate (ANOVA  $p < 0,00001$ , barre verdi: Tukey tra 1,25 e 0,5, tra 1,25 e 0,25 e tra 0,5 e 0,25 \*\*  $p < 0,0005$ ; barre celesti: Tukey tra 1,25 e 0,5, tra 1,25 e 0,25 e tra 0,5 e 0,25 \*\*  $p < 0,0005$ ).

### 2.3 VALUTAZIONE DELLA ATTIVITÀ DI SCAVENGING DI RADICALI OH• E NO

I radicali OH e NO sono responsabili di gravi danni molecolari all'interno e all'esterno delle cellule durante lo stress ossidativo e sono anche coinvolti come secondi messaggeri nei percorsi chiave di trasduzione che propagano i segnali infiammatori (Weidinger et al., 2015). Pertanto, la specifica capacità di scavenging degli estratti di *C. amentacea* verso le due specie radicaliche è stata testata con saggi spettrofotometrici. I risultati dimostrano che, anche in questo caso, è presente un potenziale di scavenging elevato e selettivo sia negli estratti etanoliche che in quelli con DMSO (Fig. 3 e 4). In particolare, l'attività di scavenging dei radicali OH (Fig.3) è stata testata con il dosaggio del sale di Mohr, mostrando una maggiore attività di scavenging per l'estratto etanoliche rispetto all'estratto di DMSO alle massime concentrazioni, mentre i valori diventavano più simili alla concentrazione più bassa testata. Infatti, alla massima concentrazione l'estratto etanoliche mostrava un'attività di scavenging leggermente superiore al 70% mentre alla concentrazione più bassa era del 42%, con un EC50 calcolato di 292,9 µg/ml (barre verdi). Al contrario, l'estratto di DMSO ha mostrato un'attività di scavenging del 54,5% alla massima concentrazione testata e del 48,7% alla minima concentrazione, con un EC50 calcolato di 454,5 µg/ml (barre celesti). Lo studio di Andrade et al. (2013) è, a conoscenza, l'unico a riferire questo test sulle alghe del genere *Cystoseira*, salvo la specie *amentacea*, quindi l'unico per il quale è possibile fare un confronto. Lo studio ha riportato valori di EC25 di scavenging del radicale ossidrilico al di sotto di 500 µg/ml solo per la specie *C. tamariscifolia* (210 µg/ml), e quindi in qualche modo comparabile ai valori di *C. amentacea* di questa tesi, con le altre specie analizzate (*C. usneoides*, *nodicaulis* e *spongiosus*) che mostrano un'attività di scavenging significativamente più bassa. Pertanto, ad oggi, è probabile che secondo la letteratura, gli

estratti di *C. amentacea* mostrano la più alta attività di scavenging dei radicali OH nel genere *Cystoseira*.

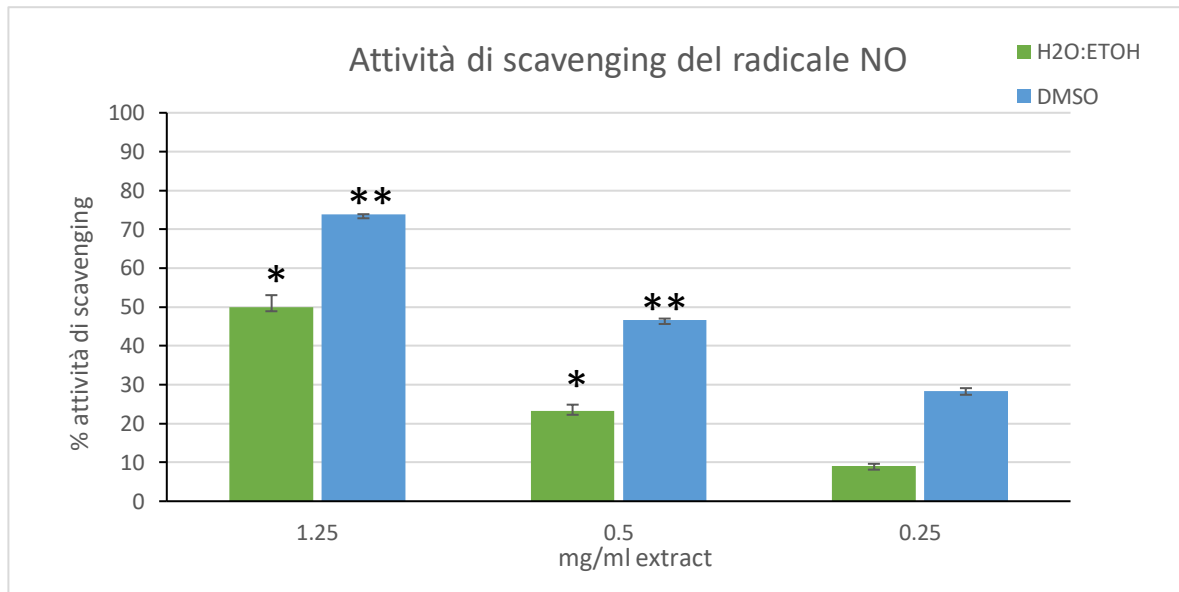


**Figura 3: Attività di scavenging del radicale OH ottenuta dal dosaggio del sale di Mohr.**

I dati sono la media  $\pm$  S.D. di tre esperimenti eseguiti in doppio e sono espressi come percentuale di attività antiossidante rispetto all'assorbanza del controllo negativo. Barre verdi: estratto di etanolo al 50%, barre celesti: estratto di DMSO. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey accoppiato tra le varie concentrazioni utilizzate (ANOVA  $p < 0,001$ , barre verdi: Tukey tra 1,25 e 0,5, tra 1,25 e 0,25 \*\*  $p < 0,01$ , tra 0,5 e 0,25 \*  $p < 0,05$ ; barre celesti: Tukey tra 1,25 e 0,5, tra 1,25 e 0,25, \*\*  $p < 0,01$ , tra 0,5 e 0,25 \*  $p < 0,05$ )

Infine, l'attività di scavenging degli estratti NO è stata valutata mediante il test del nitroprussiato. In questo caso l'estratto di DMSO ha mostrato un potenziale di scavenging più elevato rispetto all'estratto etanologico (Fig. 4). In particolare, l'estratto di DMSO, alla massima concentrazione, ha mostrato un potenziale di scavenging di NO superiore al 70% mentre alla concentrazione più bassa era leggermente inferiore al 30%, con un EC50 di 546,2  $\mu\text{g/ml}$  (barre celesti). Viceversa, alle stesse concentrazioni l'estratto etanologico

mostrava un'attività di scavenging del 49,9% alla concentrazione più alta e del 9,1% a quella più bassa, con un EC50 di 1293 µg/ml (barre verdi).



**Figura 4: Attività di Scavenging dei radicali NO misurata con il metodo del nitroprussiato di sodio accoppiata al test Griess.**

I dati sono la media  $\pm$  S.D. di tre esperimenti eseguiti in doppio e sono espressi come percentuale di attività antiossidante rispetto all'assorbanza del controllo negativo. Barre verdi: estratto di etanolo al 50%, barre celesti: estratto di DMSO. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey accoppiato tra le varie concentrazioni utilizzate (ANOVA  $p < 0,0001$ , barre verdi: Tukey tra 1,25 e 0,5, tra 1,25 e 0,25 e tra 0,5 e 0,25 \*  $p < 0,001$ , barre celesti: Tukey tra 1,25 e 0,5, tra 1,25 e 0,25 e tra 0,5 e 0,25 \*\*  $p < 0,0001$ ).

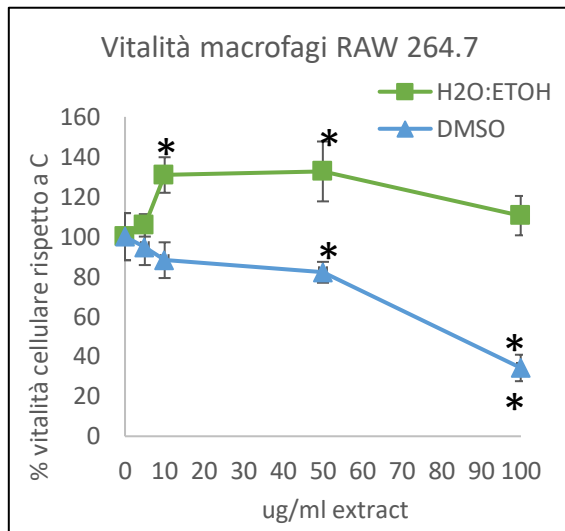
Rispetto all'unico studio in letteratura di Andrade et al (2013), che, come sopra menzionato, riportava l'attività antiossidante di *C. tamarscifolia*, *nodicaulis*, *usneoides* e *spongiosus*, i valori ottenuti con *C. amentacea* hanno prodotto, anche in questo caso, risultati simili a *C. tamarscifolia* (EC25 di 240 µg/ml) e *C. nodicaulis* (EC25 480 µg/ml) ma superiore a *C. usneoides* (EC25 790 µg/ml) e *C. spongiosus* (EC25 3190 µg/ml). Complessivamente questi dati indicano che il potenziale antiossidante di *C. amentacea* var. *stricta* può essere considerato uno dei più promettenti tra le specie del genere *Cystoseira* con una documentata attività. Questa attività non può essere ascritta esclusivamente al contenuto di TPC e TFC degli estratti etanolic e DMSO perché, come riportato nella sezione

precedente, il contenuto di TPC negli estratti di *C. amentacea* var. *stricta* è, in media, un ordine di grandezza inferiore a quelli misurati nelle altre specie del genere *Cystoseira*. Un importante contributo a questa notevole attività antiossidante è probabilmente dovuto alla varietà molto ricca e all'abbondanza di prodotti chimici che sono stati identificati nelle varie specie del genere, passando dai terpenoidi (meroditerpeni, diterpeni lineari) a carboidrati, lipidi e vitamine a cui può essere attribuita l'attività di scavenging (Bruno de Sousa et al, 2017).

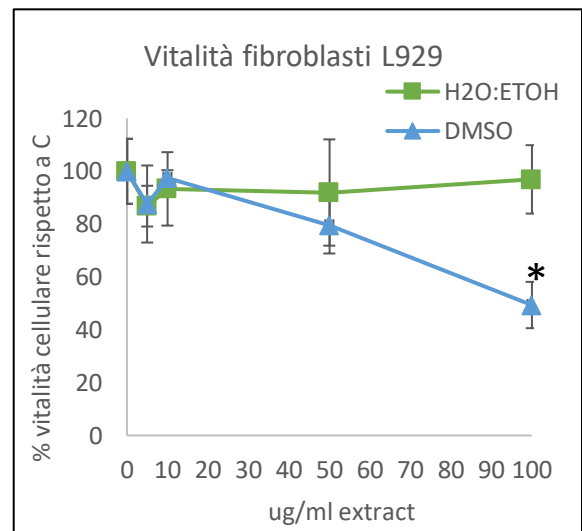
### 3 TEST DI CITOTOSSICITÀ DEGLI ESTRATTI DI *C. AMENTACEA*

La citotossicità dei due estratti a varie concentrazioni è stata valutata su due linee cellulari per capirne il possibile utilizzo come nutraceutici o componenti di farmaci antinfiammatori. La linea cellulare di macrofagi RAW 264.7 e la linea cellulare di fibroblasti L929 sono state incubate per 24 ore con varie diluizioni dei due estratti (da 5 a 100 µg/ml) e la vitalità cellulare è stata valutata tramite test MTT e confrontata con cellule di controllo non trattate. I risultati hanno mostrato che, per entrambe le linee cellulari, l'estratto etanolic non ha mai diminuito la vitalità cellulare a tutte le concentrazioni testate (Fig. 5 macrofagi RAW 264.7; Fig. 6 fibroblasti L929;), che mostra invece un leggero aumento del numero delle cellule per valori di concentrazione pari a 10 e 50 µg/ml ( $p < 0,05$  per entrambi rispetto a C) indicando che questo estratto può essere tranquillamente usato nell'uomo. Al contrario, l'estratto di DMSO ha mostrato un significativo deterioramento della vitalità cellulare in entrambe le linee cellulari a 24 ore (mortalità del 66% nei macrofagi RAW 264.7,  $p < 0,001$  rispetto a C, e mortalità cellulare del 50% nei fibroblasti L929; indicatore triangolare,  $p < 0,005$  rispetto a C, rispettivamente), ma solo alla massima concentrazione

(100 µg/ml). A concentrazioni inferiori anche l'estratto di DMSO potrebbe essere considerato sicuro in entrambe le linee cellulari (Fig. 5 e fig.6, indicatore a triangolo).



**Figura 5: Valutazione quantitativa della crescita cellulare di macrofagi murini RAW 264.7, mediante test MTT di vitalità cellulare a 24 ore, in presenza di concentrazioni crescenti di estratti di *C. amentacea***  
I risultati sono espressi come percentuale di cellule rispetto al controllo (cellule non trattate) e sono la media ± S.D. di tre esperimenti eseguiti in quadruplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey accoppiato (ANOVA,  $p < 0,05$ ; Tukey vs C: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , rispettivamente).



**Figura 6: Valutazione quantitativa della crescita cellulare di fibroblasti murini L929, mediante test MTT di vitalità cellulare a 24 ore, in presenza di concentrazioni crescenti di estratti di *C. amentacea***  
I risultati sono espressi come percentuale di cellule rispetto al controllo e sono la media ± S.D. di tre esperimenti eseguiti in quadruplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey accoppiato (ANOVA,  $p < 0,05$ ; Tukey vs C: \*  $p < 0,005$ , rispettivamente).

I risultati ottenuti differiscono da quelli riportati da Stanojkovic et al. (2014) sugli estratti di *C. amentacea* del Mare Adriatico, mostrando un potenziale citotossico significativo su diverse linee di cellule tumorali (EC50 <30 µg/ml nelle cellule di carcinoma mammario umano, e EC50 <100 µg/ml in carcinomi di cervice uterina e colon umani). Questa discrepanza può essere attribuita alle diverse condizioni utilizzate da Stanojkovic et al. dove è stato utilizzato un estrattore Soxhlet con acetone come solvente, recuperando una frazione più idrofobica dei metaboliti algali, rispetto alle condizioni di estrazione lievi qui usate. In queste condizioni probabilmente sono stati estratti meno terpenoidi, che di solito

sono considerati responsabili dell'attività antitumorale di molti prodotti naturali (Bruno de Sousa et al., 2017), e questo potrebbe spiegare i diversi risultati dell'alga mediterranea rispetto agli esemplari dell'Adriatico. In effetti, un certo grado di tossicità è stato osservato anche negli estratti di DMSO dove era stata recuperata una frazione più organica, e di conseguenza più simile all'estrazione dell'acetone di Stanojkovic, con un EC50 di 83 e 103,6 µg/ml per macrofagi RAW 264.7 e fibroblasti L929 rispettivamente. Una significativa attività citotossica negli estratti organici è stata dimostrata anche in altre alghe dello stesso genere, come riportato ad esempio con estratti di *C. tamariscifolia* in esano e dietiletere (Vizetto Duarte et al., 2016) che mostrano un EC50 <30 µg/ml sulle linee cellulari tumorali e anche per gli estratti di acetone di *C. barbata* (Trifan et al., 2019) con un EC50 <100 µg/ml su cellule di adenocarcinoma mammario MCF7. Nel complesso, i risultati dimostrano che gli estratti etanolic e di DMSO di *C. amentacea* del Mar Ligure potrebbero essere tranquillamente utilizzati come nutraceutici poiché non hanno rivelato alcun grado, o livello estremamente basso, di tossicità e una potente attività antiossidante. Queste caratteristiche potrebbero essere sfruttate per la formulazione di nuovi additivi biologicamente attivi negli integratori alimentari, o nei prodotti cosmetici per i trattamenti della pelle, dove gli antiossidanti esercitano significativi effetti anti-invecchiamento.

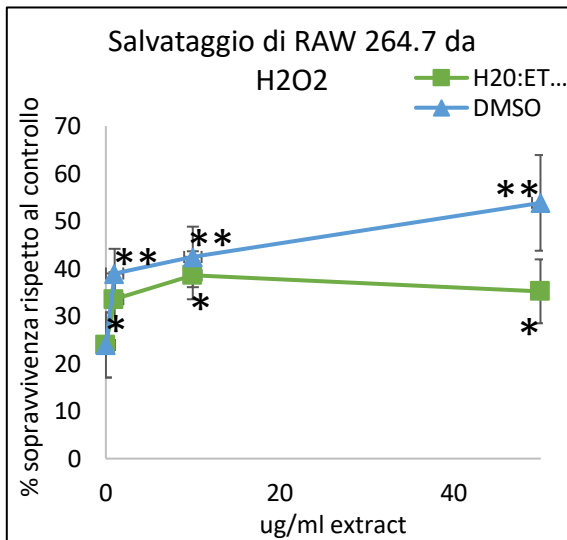
#### 4 POTENZIALE ANTINFIAMMATORIO DEGLI ESTRATTI DI *C. AMENTACEA*

Poiché dai risultati ottenuti l'estratto etanolic e l'estratto di DMSO non erano tossici a 100 µg/ml per il primo e 50 µg/ml per il secondo, queste due sono state le concentrazioni più elevate utilizzate nei seguenti esperimenti. Nel dettaglio, è stata valutata l'efficacia dell'attività antiossidante e antinfiammatoria dei due estratti in modelli cellulari.



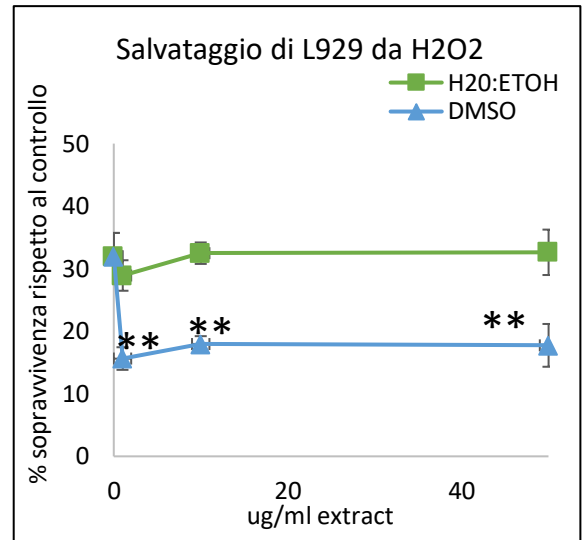
L'inibizione dalla morte cellulare indotta da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM è stata valutata sia nei macrofagi RAW 264.7 che nei fibroblasti L929 in presenza dei due estratti (Fig. 7 e 8, rispettivamente) dopo 24 ore. Nella linea cellulare RAW 264.7 dopo il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, rispetto al controllo, è stata osservata solo una sopravvivenza cellulare del 23,9%, che era leggermente più alta nelle cellule trattate con estratti etanolicci (35,2 e 38,6% a 50 e 10 µg/ml, rispettivamente, Fig 7) e significativamente più alta negli estratti DMSO (53,8 e 42,5% a 50 e 10 µg/ml, rispettivamente, Fig. 7). Al contrario, nella linea cellulare di fibroblasti L929, dove il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rispetto al controllo porta a una sopravvivenza cellulare del 32%, non è stato possibile osservare un effetto benefico sulla vitalità cellulare in presenza dei due estratti a tutte le concentrazioni testate (Fig. 8), cosa che indica una certa variabilità negli effetti degli estratti di *C. amentacea* verso diversi tipi di cellule.

Tuttavia i macrofagi, rispetto ai fibroblasti, sono cellule immunitarie altamente reattive che subiscono una rapida produzione di ROS funzionale all'attivazione da parte di stimoli pro-infiammatori. Pertanto, i risultati positivi ottenuti nei macrofagi RAW 264.7 sembrano più significativi per il possibile uso degli estratti come farmaci antinfiammatori, poiché la produzione di ROS da parte dei macrofagi è effettivamente fisiologicamente più rilevante, più frequente e più pericolosa nell'organismo umano.



**Figura 7:** Inibizione della morte cellulare indotta con 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in macrofagi RAW 264.7 in presenza di estratti di etanolo al 50% e di DMSO, valutati mediante test MTT a 24 ore.

I risultati sono espressi come percentuale di cellule rispetto al controllo, ovvero cellule non trattate e sono la media  $\pm$  S.D. di due esperimenti eseguiti in quadruplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey accoppiato (ANOVA,  $p < 0,05$ ; Tukey vs  $\text{H}_2\text{O}_2$ : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , rispettivamente).

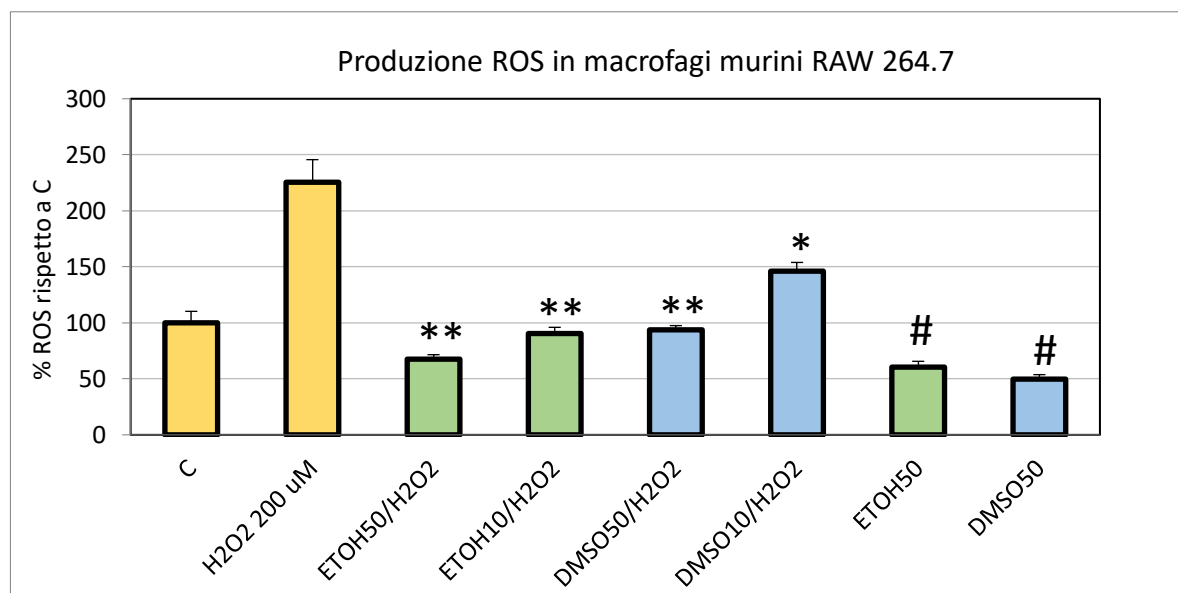


**Figura 8:** Inibizione della morte cellulare indotta con 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in Fibroblasti L929 in presenza di estratti di etanolo al 50% e di DMSO, valutati mediante test MTT a 24 ore.

I risultati sono espressi come percentuale di cellule rispetto al controllo, cellule non trattate e sono la media  $\pm$  S.D. di due esperimenti eseguiti in quadruplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey accoppiato (ANOVA,  $p < 0,05$ ; Tukey vs  $\text{H}_2\text{O}_2$ : \*\*  $p < 0,005$ ).

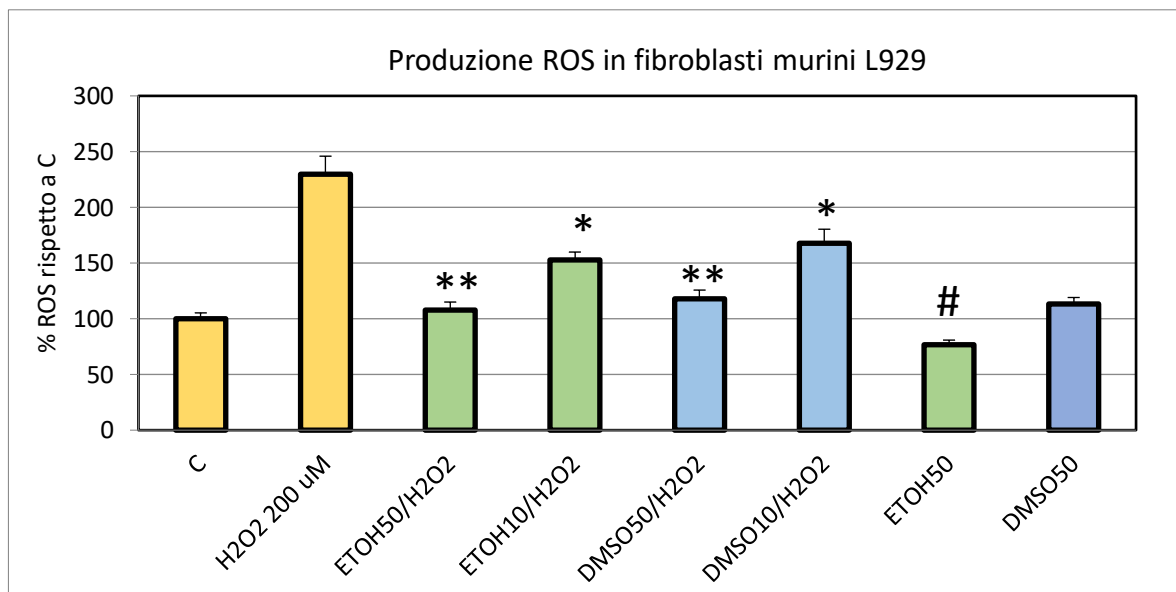
Per valutare il potenziale antinfiammatorio degli estratti di *C. amentacea*, è stata misurata l'inibizione della produzione di ROS intracellulare generati durante un aumento dell'attività respiratoria cellulare dopo una stimolazione con  $\text{H}_2\text{O}_2$  sia nei macrofagi RAW 264.7 che nei fibroblasti L929 (Fig. 9 e Fig. 10, rispettivamente) in presenza e assenza dei due estratti nel terreno di crescita. Successivamente, è stata misurata l'espressione dei principali marker infiammatori in macrofagi RAW 264.7 stimolati con lipopolisaccaride (LPS) in presenza o in assenza dei due estratti. Questi marker sono: radicale ossido di azoto (NO), fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), cicloossigenasi-2 (COX-2), NO sintasi inducibile (iNOS), Interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleuchina-6 (IL-6) e i risultati sono mostrati nelle Figure da 12 a 16. La quantificazione della produzione di ROS intracellulare dopo 2 ore di stimolazione

con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM ha rivelato che la percentuale di produzione di ROS nelle cellule RAW 264.7 era del 225% rispetto alle cellule di controllo (Fig. 9) e che questa produzione è stata completamente inibita dall'estratto etanologico a entrambe le concentrazioni testate, 50 e 10 µg/ml (barre verdi), mentre l'inibizione in presenza dell'estratto di DMSO era completa solo alla massima concentrazione testata (50 µg/ml) e parziale al minimo (10 µg/ml), con una inibizione del 63% (barre celesti). Inoltre, la sola somministrazione dei due estratti è stata di per sé in grado di ridurre significativamente anche la produzione di ROS basale nei macrofagi RAW 264.7, con una inibizione del 40% per la concentrazione più alta dell'estratto con etanolo e una inibizione del 51% per la concentrazione più alta dell'estratto di DMSO.



**Figura 9: Produzione di ROS intracellulare misurata mediante analisi fluorimetrica DCF in macrofagi murini RAW 264.7 incubati per 2 ore con 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barre gialle) e in presenza di 50 e 10 µg/ml di estratti al 50% di etanolo (barre verdi) o di DMSO (barre blu), rispettivamente.** I risultati sono espressi come percentuale della produzione di ROS rispetto alle cellule di controllo e sono la media ± DS di tre esperimenti condotti in quadruplicato. Gli asterischi indicano significato nel test Tukey (ANOVA p < 0,0001; Tukey vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, \* p < 0,05, \*\* p < 0,005, rispettivamente; Tukey vs C #p < 0,05).

Lo stesso esperimento è stato condotto su fibroblasti L929 e, anche in questo caso, è stata ottenuta l'inibizione della produzione di ROS intracellulare dopo la somministrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza dei due estratti, sebbene con un'efficienza inferiore rispetto ai risultati ottenuti con i macrofagi RAW 264.7 (Fig.10 vs Fig.9). Analogamente ai macrofagi, i fibroblasti stimolati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dopo 2 ore hanno aumentato la produzione di ROS intracellulare del 230% rispetto alle cellule di controllo (Fig. 10) e questa sovrapproduzione veniva completamente soppressa da entrambi gli estratti alla massima concentrazione (50 µg/ml), mentre solo parzialmente alla concentrazione più bassa: 60% per l'estratto di etanolo (barre verdi) e 48% per quello di DMSO (barre celesti). Infine, solo l'estratto etanologico di per sé è stato in grado di ridurre leggermente la produzione di ROS basale intracellulare nei fibroblasti L929 rispetto alle cellule di controllo del 24%.

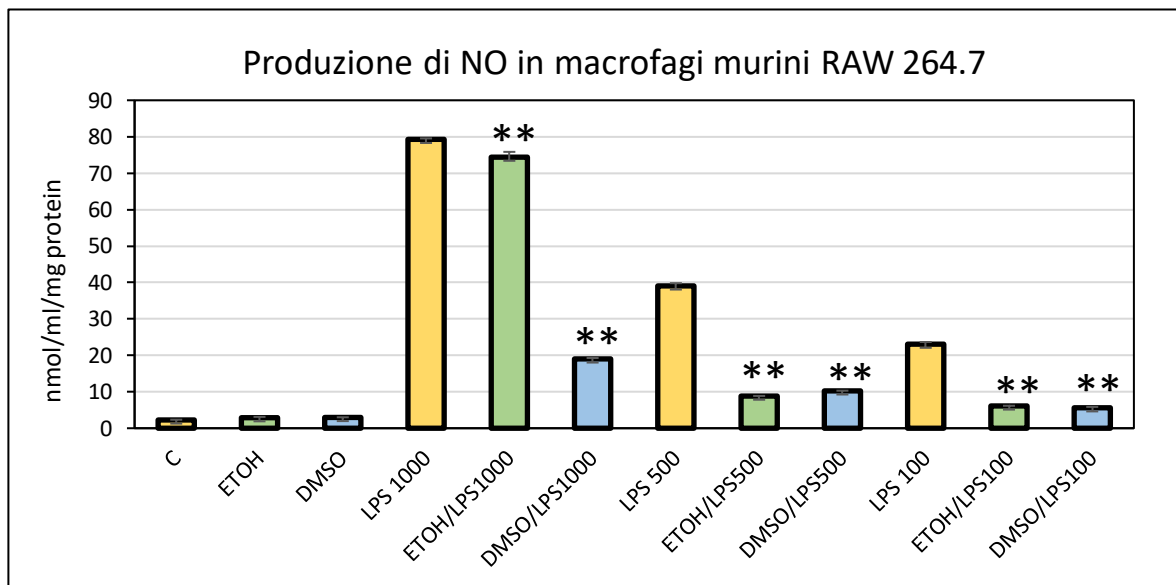


**Figura 10: Produzione ROS intracellulare misurata mediante analisi fluorimetrica DCF in fibroblasti murini L929 incubati per 2 ore con 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controllo positivo) e in presenza di 50 e 10 µg/ml di estratti al 50% etanolo (barre verdi) o estratti di DMSO (barre blu), rispettivamente.** I risultati sono espressi come percentuale della produzione di ROS rispetto alle cellule di controllo e sono la media ± DS di tre esperimenti condotti in quadruplicato. I risultati sono espressi come percentuale della produzione di ROS rispetto alle cellule di controllo e sono la media ± DS di tre esperimenti condotti in quadruplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey (ANOVA  $p < 0,00001$ ; Tukey vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, \*  $p < 0,005$ , \*\*  $p < 0,0001$ , rispettivamente; Tukey vs C # $p < 0,05$ ).

Sebbene con diversi tipi di cellule, anche Stanojkovic et al. (2014) hanno osservato una parziale riduzione della produzione di ROS in eritrociti e granulociti polimorfonucleati stimolati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza degli estratti a base di acetone in Soxhlet di *C. amentacea*. Il metodo usato in quel caso non ha permesso una quantificazione precisa dell'inibizione di ROS intracellulari, ma solo una valutazione qualitativa, e quindi questa è la prima volta che un significativo potenziale antiossidante intracellulare degli estratti di un'alga dal genere *Cystoseira* viene riportato in letteratura, indicando che i metaboliti secondari purificati dagli estratti etanolici e a base di DMSO siano in grado di attraversare le membrane cellulari e agire a livello citoplasmatico. Questa è una scoperta importante perché indica chiaramente l'efficacia di questi estratti come potenziali farmaci nelle cellule umane in cui l'equilibrio ossidativo fisiologico è compromesso.

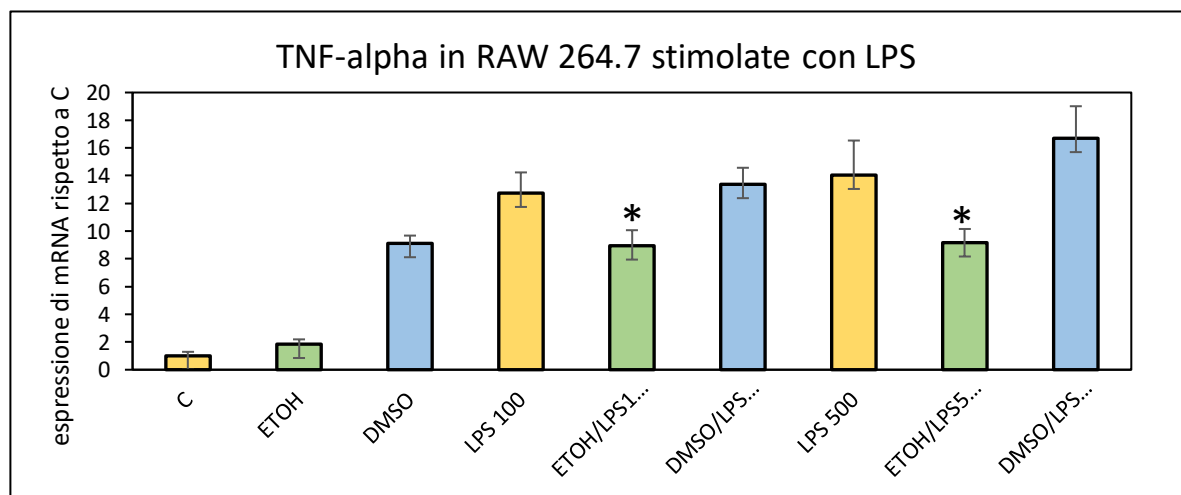
Successivamente, macrofagi RAW 264.7 sono stati stimolati con concentrazioni crescenti (da 100 a 1000 ng/ml) di endotossina batterica (LPS) altamente infiammatoria e la produzione di NO è stata valutata dopo l'incubazione in presenza o assenza dei due estratti di *C. amentacea* (Fig. 11); allo stesso tempo, la sovraespressione di citochine pro-infiammatorie è stata valutata mediante PCR quantitativa (qPCR, Fig. 12-16) per valutare infine il reale potenziale antinfiammatorio delle due miscele. A 24 ore, la stimolazione con LPS porta ad una significativa sovrapproduzione di NO da parte dei macrofagi RAW 264.7 a tutte le concentrazioni di endotossina utilizzata (79,3; 39,1 e 23,1 nmol/ml/mg di proteina per la stimolazione con LPS 1000, 500 e 100 ng/ml, rispettivamente) rispetto alle cellule di controllo in cui la produzione era quasi non rilevabile (Fig. 11). Questa produzione di NO è stata completamente inibita da entrambi gli estratti a tutte le concentrazioni quando è stato usato LPS alla concentrazione più bassa. Inoltre, la sovrapproduzione di NO è stata fortemente inibita dai due estratti (81,7% per l'estratto a base etanolo e 77,8% per quello

di DMSO) in presenza della concentrazione intermedia di LPS (500 ng/ml). Infine, alla massima concentrazione di LPS (1000 ng/ml) solo l'estratto di DMSO ha mantenuto la capacità di inibire drasticamente la produzione di NO nei macrofagi RAW 264.7, con una inibizione del 78%, mentre l'estratto etanólico mostrava solo una leggera, ma comunque significativa riduzione di NO (il 6,3%). Non avendo trovato in letteratura studi con valori simili, questa è la prima dimostrazione che gli estratti di un'alga del genere *Cystoseira* sono in grado di eliminare la produzione naturale, e potenzialmente pericolosa, di NO da parte dei macrofagi attivati, indicando nuovamente un importante effetto antinfiammatorio in un ambiente più simile a quello in vivo come è una coltura cellulare rispetto a un saggio spettrofotometrico privo di cellule, come quello del nitroprussiato solitamente utilizzato negli altri studi (Andrade et al., 2013).



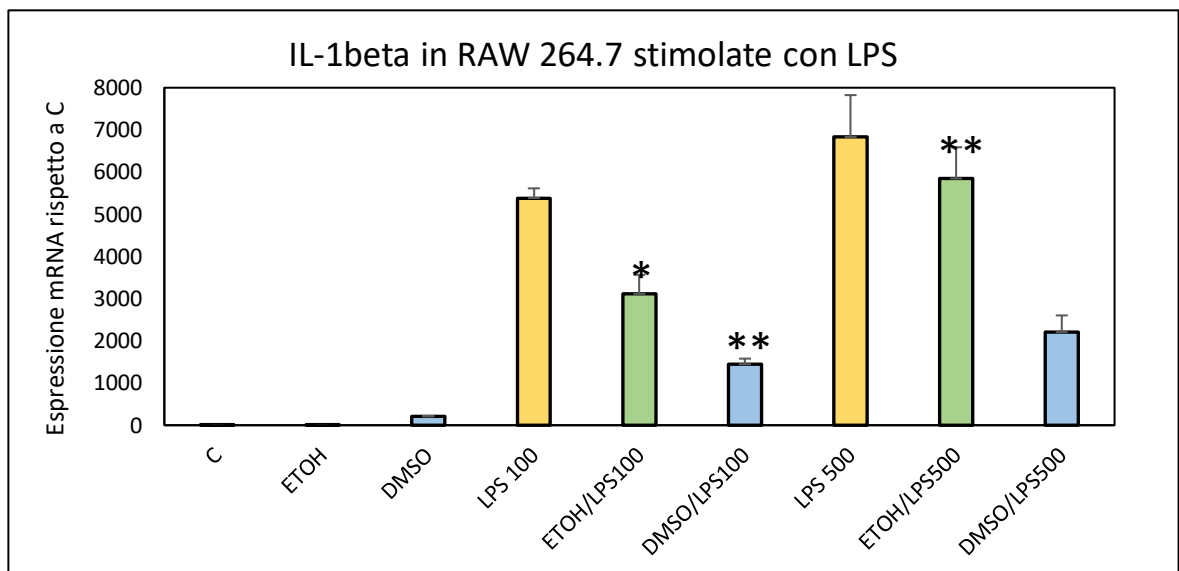
**Figura 11: Quantificazione mediante test Griess della produzione di NO nel terreno di coltura di macrofagi RAW 264.7 stimolati per 24 ore a diverse concentrazioni di LPS (barre gialle, 100-500-1000 ng/ ml) in presenza di 100 µg/ml di estratto 50% etanólico (barre verdi) o 50 µg/ml di estratto di DMSO (barre blu). I risultati sono espressi come nmol di NO produzione/ml terreno/mg di proteina cellulare totale e sono la media ± DS di tre esperimenti condotti in duplicato. Gli asterischi indicano significato nel test Tukey (ANOVA  $p < 0,00001$ ; Tukey rispetto alla rispettiva concentrazione di LPS \*\*  $p < 0,0001$ ).**

Infine, si è studiata l'inibizione della sovraespressione genica di marcatori noti dell'infiammazione dopo la stimolazione con LPS dei macrofagi RAW 264.7 in presenza dei due estratti e, anche in questo caso, si è potuto osservare un forte effetto antinfiammatorio degli estratti di *C. amentacea* con conseguente riduzione della sovraespressione di IL1- $\beta$ , IL-6, iNOS e COX-2 e un effetto inibitorio parziale sulla sovraespressione di TNF- $\alpha$  (Fig. 12). In particolare, l'mRNA di TNF- $\alpha$  era sovraespresso 12,7 e 14 volte dopo 8 ore di stimolazione con 100 e 500 ng/ml di LPS, rispettivamente, nelle cellule dei controlli positivi ed era parzialmente inibita solo dall'estratto etanolico del 29,8 e 34,7% alle due concentrazioni di LPS (barre verdi), rispettivamente. Al contrario, per l'estratto di DMSO (barre blu), non è stato possibile osservare alcuna inibizione della sovraespressione del TNF- $\alpha$  ad entrambe le concentrazioni di LPS utilizzate. Ciò probabilmente è una conseguenza della proprietà del DMSO di per sé di aumentare significativamente l'espressione del TNF- $\alpha$  di 9,1 volte rispetto alle cellule di controllo a causa del solvente utilizzato che è stato infatti testato.



**Figura 12: Inibizione dell'espressione genica di TNF- $\alpha$  mediata dall'estratto di *C. amentacea* nei macrofagi RAW 264.7 stimolati con LPS misurata mediante analisi qPCR.** Espressione genica di TNF- $\alpha$  dopo incubazione dei macrofagi RAW 264.7 per 8 ore, con o senza concentrazioni crescenti di LPS (100-500 ng/ml) e in presenza di 100  $\mu$ g/ml di estratto di etanolo al 50% o di 50  $\mu$ g/ml di estratto di DMSO. I dati sono normalizzati sul gene housekeeping GAPDH, ed espressi all'aumentare dell'mRNA rispetto alle cellule di controllo non trattate. I risultati sono la media  $\pm$  DS di tre esperimenti eseguiti in triplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey (TNF-alfa ANOVA  $p < 0,00001$ , Tukey rispetto alla rispettiva concentrazione LPS \* $p < 0,005$ ).

Per quanto riguarda la sovraespressione di IL-1 $\beta$  (Fig.13) in presenza di LPS, è stata osservata una forte induzione dell'espressione genica nei macrofagi RAW 264.7, a entrambe le concentrazioni di LPS utilizzate nelle cellule di controllo, mentre in presenza di entrambi gli estratti questo aumento è stato significativamente inibito alla concentrazione di LPS più bassa, rispettivamente del 42% per l'estratto etanolo (barre verdi) e del 73% in quello di DMSO (barre blu). Alla massima concentrazione di LPS, solo l'estratto di DMSO ha mantenuto la capacità di inibire l'espressione di questa citochina; nello specifico l'inibizione era del 67,7%.

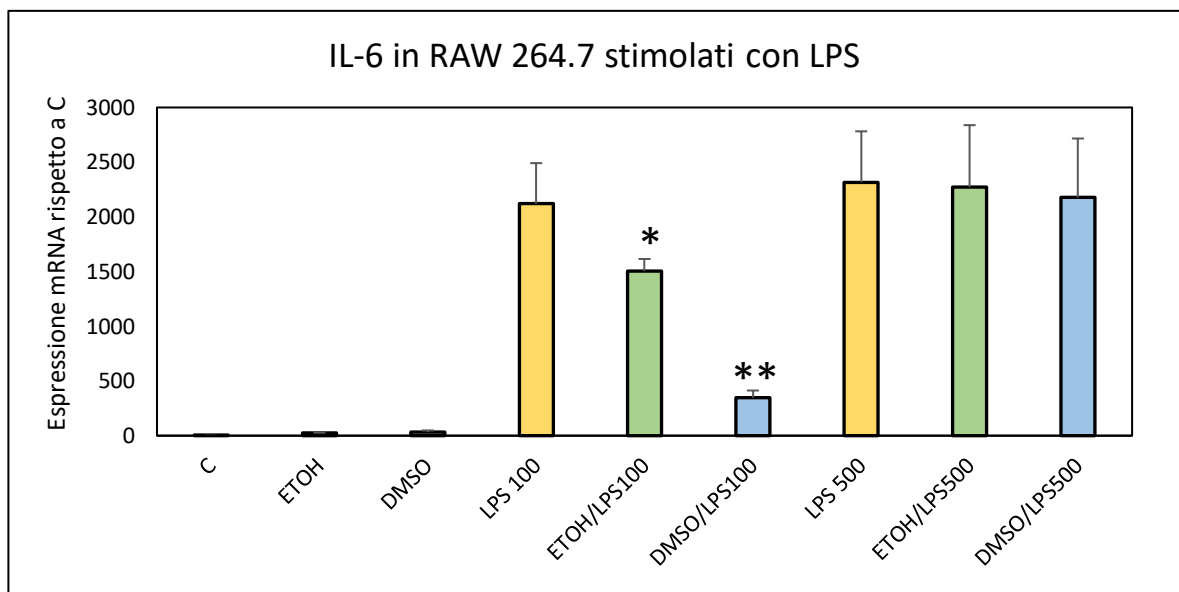


**Figura 13: Inibizione dell'espressione genica di IL-1 $\beta$  mediata dall'estratto di *C. amentacea* nei macrofagi RAW 264.7 stimolati con LPS misurata mediante analisi qPCR.**

Espressione genica di IL-1 $\beta$  dopo incubazione dei macrofagi RAW 264.7 per 8 ore, con o senza concentrazioni crescenti di LPS (100-500 ng/ml) e in presenza di 100  $\mu$ g/ml di estratto di etanolo al 50% o di 50  $\mu$ g/ml di estratto di DMSO. I dati sono normalizzati sul gene housekeeping GAPDH, ed espressi all'aumentare dell'mRNA rispetto alle cellule di controllo non trattate. I risultati sono la media  $\pm$  DS di tre esperimenti eseguiti in triplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey (IL-1 $\beta$  ANOVA  $p < 0,00001$ , Tukey rispetto alla rispettiva concentrazione LPS, \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,0005$ , rispettivamente).



Una forte sovraespressione (aumento di 2120 volte) di IL-6, in presenza di LPS, è stata osservata nei macrofagi RAW 264.7, con entrambe le concentrazioni di LPS utilizzate (Fig.14). Questo aumento è stato significativamente inibito da entrambi gli estratti alla concentrazione di LPS più bassa, rispettivamente del 29% per quelli etanolic (barre verdi) e del 84% in quelli di DMSO (barre blu), mentre alla massima concentrazione di LPS nessuno degli estratti è stato in grado di influenzare l'espressione di IL-6.

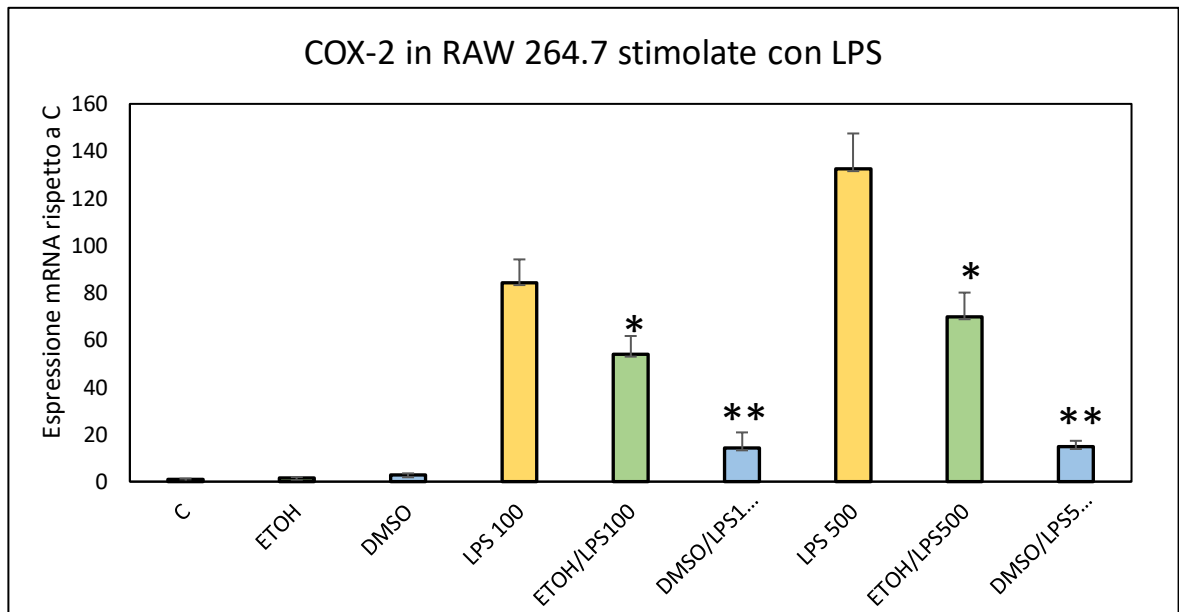


**Figura 14: Inibizione dell'espressione genica di IL-6 mediata dall'estratto di *C. amentacea* nei macrofagi RAW 264.7 stimolati con LPS misurata mediante analisi qPCR.**

Espressione genica di IL-6 dopo incubazione dei macrofagi RAW 264.7 per 8 ore, con o senza concentrazioni crescenti di LPS (100-500 ng/ml) e in presenza di 100 µg/ml di estratto di etanolo al 50% o di 50 µg/ml di estratto di DMSO. I dati sono normalizzati sul gene housekeeping GAPDH, ed espressi all'aumentare dell'mRNA rispetto alle cellule di controllo non trattate. I risultati sono la media ± DS di tre esperimenti eseguiti in triplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey (IL-6 ANOVA  $p < 0,0001$ , Tukey rispetto alla rispettiva concentrazione LPS, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ).

L'indagine sull'espressione dell'mRNA di COX-2 (Fig.15) ha mostrato che entrambe le concentrazioni di LPS sono state in grado di sovraesprimere fortemente questo importante mediatore infiammatorio, di 84,3 volte quando stimolate con una concentrazione di LPS pari a 100 ng/ml e 132,5 volte con 500ng/ml, rispetto alle cellule di controllo. Ad entrambe le concentrazioni di LPS però, entrambi gli estratti di *C. amentacea* sono stati in grado di

inibire la sintesi del mRNA di COX-2. In particolare, la stimolazione con 100 ng/ml di LPS risultava significativamente inibita nella sovraespressione della COX-2 del 36% in presenza dell'estratto etanolic (barre verdi) e dell'83% in presenza dell'estratto DMSO (barre blu). Quando stimolata con 500 ng/ml di LPS, l'inibizione indotta dai due estratti era del 47,3% per l'etanolo e dell'88,8% per l'estratto DMSO rispettivamente.

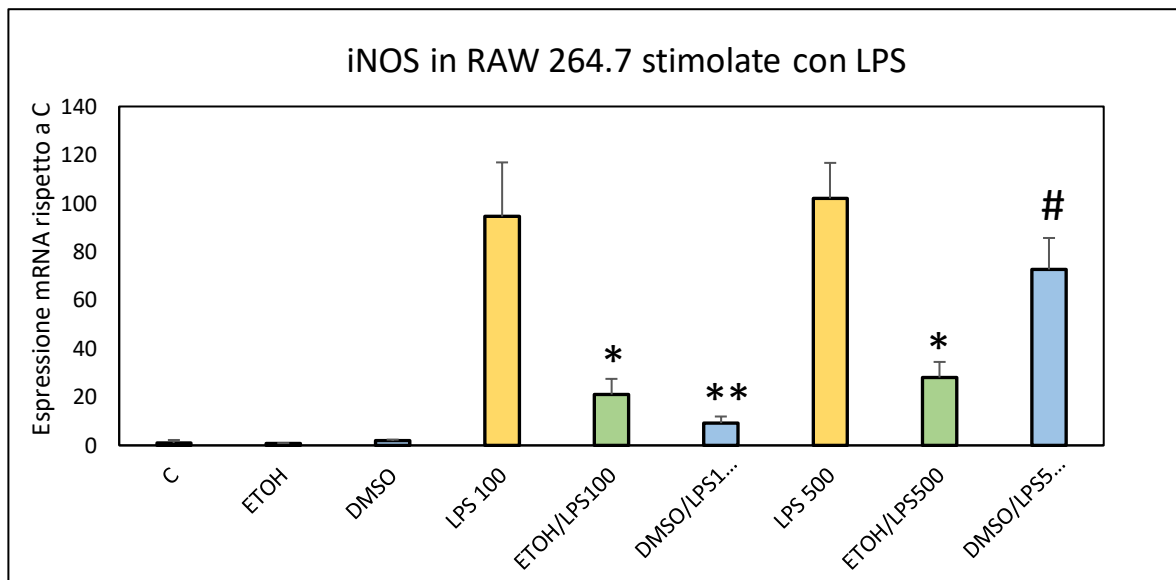


**Figura 15: Inibizione dell'espressione genica di COX-2 mediata dall'estratto di *C. amentacea* nei macrofagi RAW 264.7 stimolati con LPS misurata mediante analisi qPCR.**

Espressione genica di COX-2 dopo incubazione dei macrofagi RAW 264.7 per 8 ore, con o senza concentrazioni crescenti di LPS (100-500 ng/ml) e in presenza di 100 µg/ml di estratto di etanolo al 50% o di 50 µg/ml di estratto di DMSO. I dati sono normalizzati sul gene housekeeping GAPDH, ed espressi all'aumentare dell'mRNA rispetto alle cellule di controllo non trattate. I risultati sono la media ± DS di tre esperimenti eseguiti in triplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey (COX-2 ANOVA  $p < 0,00001$ , Tukey rispetto alla rispettiva concentrazione LPS, \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,0001$ , rispettivamente)

Infine, è stata studiata anche la sovraespressione di iNOS (Fig. 16), responsabile degli alti livelli di radicale citotossico NO nei macrofagi. Nei macrofagi RAW 264.7 entrambe le concentrazioni di LPS sono state in grado di sovraregolare fortemente questo importante enzima, di 94,6 volte e 102,1 volte rispetto alle cellule di controllo ed anche in questo caso, entrambi gli estratti sono stati in grado di inibire la sovrapproduzione di mRNA di iNOS.

Infatti, con una stimolazione LPS di 100 ng/ml si è verificata una significativa inibizione dell'iNOS del 78% con l'estratto etanolic (barre verdi) e del 90% con l'estratto DMSO (barre blu). Al contrario, con 500 ng/ml di LPS, l'estratto etanolic è stato in grado di inibire la sovraespressione di iNOS del 73% e l'estratto di DMSO del 29%.



**Figura 16: Inibizione dell'espressione genica di iNOS mediata dall'estratto di *C. amentacea* nei macrofagi RAW 264.7 stimolati con LPS misurata mediante analisi qPCR.**

Espressione genica di iNOS dopo incubazione dei macrofagi RAW 264.7 per 8 ore, con o senza concentrazioni crescenti di LPS (100-500 ng/ml) e in presenza di 100 µg/ml di estratto di etanolo al 50% o di 50 µg/ml di estratto di DMSO. I dati sono normalizzati sul gene housekeeping GAPDH, ed espressi all'aumentare dell'mRNA rispetto alle cellule di controllo non trattate. I risultati sono la media ± DS di tre esperimenti eseguiti in triplicato. Gli asterischi indicano significatività nel test Tukey (iNOS ANOVA  $p < 0,00001$ , Tukey rispetto alla rispettiva concentrazione LPS, #  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,001$ , rispettivamente).

Questi dati sull'inibizione di iNOS sono particolarmente interessanti perché dimostrano per la prima volta che, oltre a un effetto antiossidante diretto che elimina l'eccesso di NO prodotto da questo enzima, i metaboliti estratti da *C. amentacea* possono anche inibire la precedente sintesi di iNOS, di fatto annichilendo il potenziale di danno dell'NO. Gli unici dati che riportano un effetto antinfiammatorio degli estratti del genere *Cystoseira* su un modello fisiologico di infiammazione in letteratura sono quelli ottenuti da Mhadhebi et al

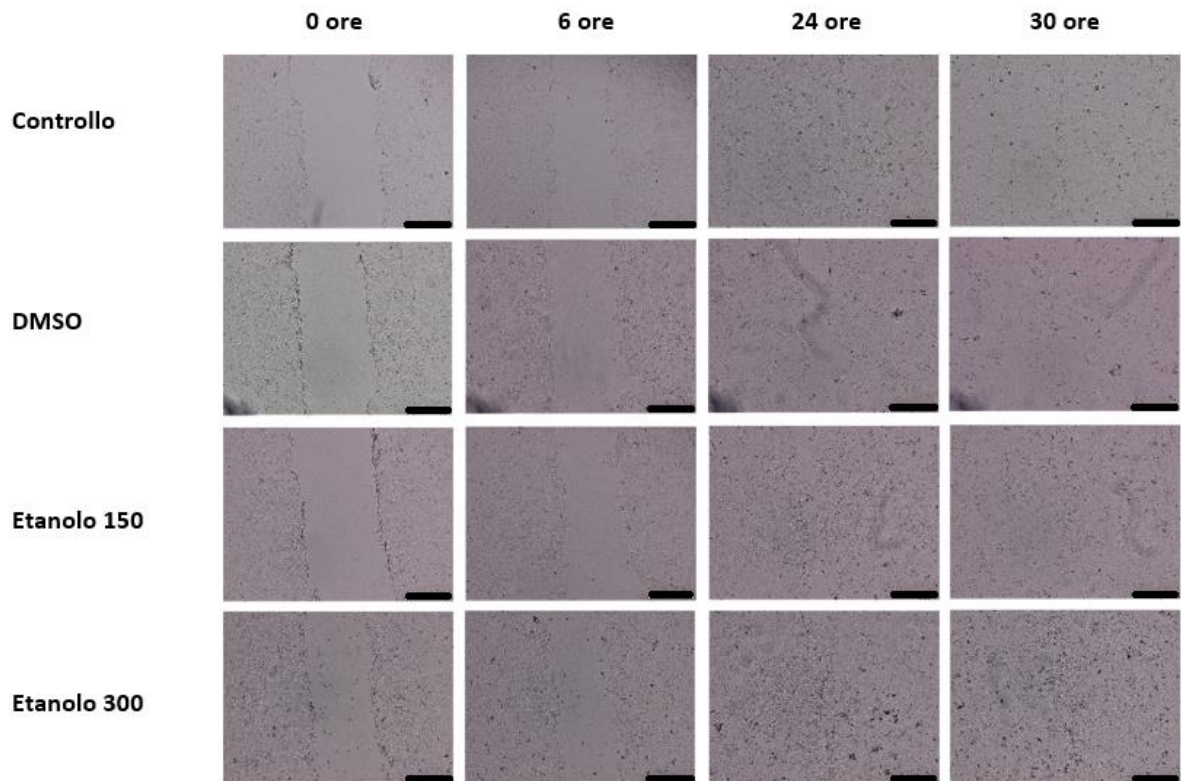
(2014) in cui gli estratti acquosi di *C. compressa*, *crinita* e *sedoides* hanno mostrato un forte effetto benefico con il test dell'edema della zampa di ratto simile a quello ottenuto in un trattamento con desametasone, confermando la potenzialità degli estratti anche in vivo, sebbene in quel caso non sia stato studiato il meccanismo cellulare di azione degli estratti.

## 5 WOUND HEALING TEST

Potendo trovare in bibliografia diversi lavori che studiano l'attività stimolante la rigenerazione di estratti di diverse alghe, alcuni dei quali anche in vivo, si è deciso di valutare l'azione esercitata dagli estratti di *C. Amentacea* sulla migrazione e sulla proliferazione cellulare dei cheratinociti HaCaT e dei fibroblasti L929 eseguendo lo "scratch" test in vitro. Per fare ciò, una volta fatto lo scratch su ogni pozzetto, le cellule sono state incubate con una concentrazione variabile dell'estratto; nello specifico la concentrazione finale dell'estratto di DMSO era pari a 150 µg/ml, mentre per l'estratto etanologico le concentrazioni finali erano due: 150 e 300 µg/ml. Ciascun pozzetto è stato quindi fotografato al tempo 0 e dopo 6 ore, 24 ore e 30 ore e successivamente la distanza tra i margini è stata quantificata ai vari tempi per ottenere un grafico della velocità di copertura dell'incisione nei vari campioni (Fig.17 e 18).

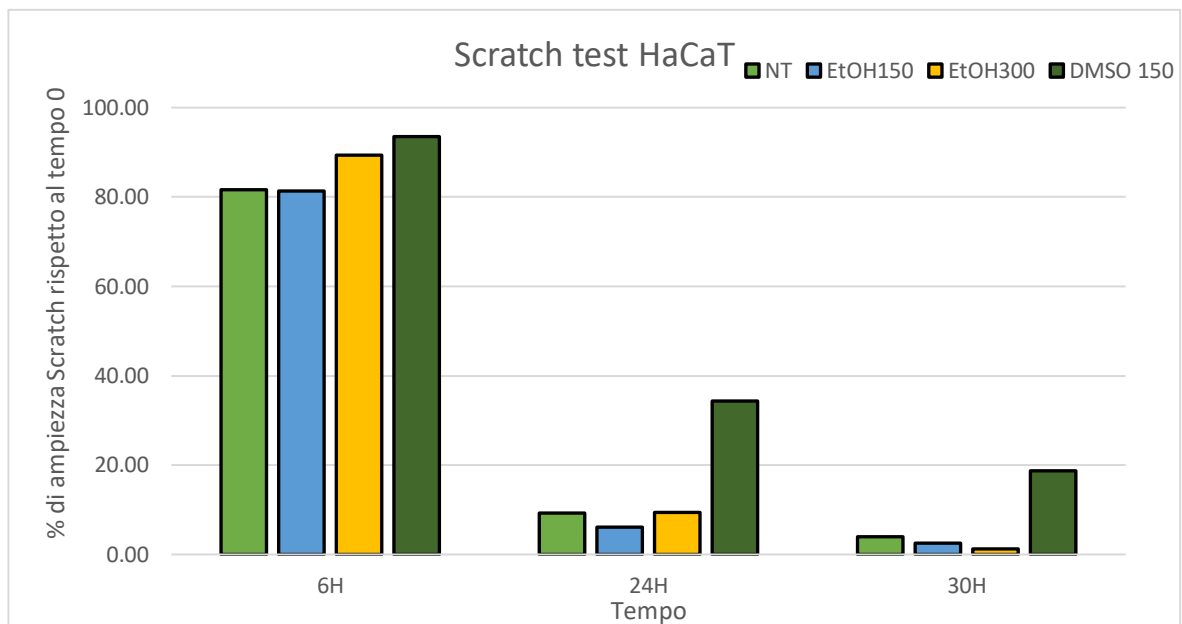
Nei cheratinociti HaCaT era possibile osservare la progressiva chiusura dello scratch in tutti i campioni, per quanto questa avvenisse a velocità diverse in base al trattamento. Rispetto al tempo 0 infatti, a 6h dallo scratch solo lo stimolo con la concentrazione più bassa dell'estratto di etanolo aveva effettivamente migliorato la proliferazione dei cheratinociti con una conseguente maggiore chiusura dello scratch; questa però era solo dello 0,27% maggiore rispetto al controllo, mentre passate 30 ore entrambe le concentrazioni usate

dell'estratto di etanolo risultavano migliorare la capacità proliferativa dei cheratinociti HaCaT, portando infatti la larghezza dello scratch ad essere ridotta del 2,76% (etanolo 150  $\mu\text{g/ml}$ ) e del 1,45% (etanolo 300  $\mu\text{g/ml}$ ) in più rispetto al controllo (Fig. 18)



**Figura 17: Fotografie scattate a distanza di 0, 6, 24 e 30 ore dalla incisione dello scratch sul monostrato cellulare di cheratinociti HaCaT.**

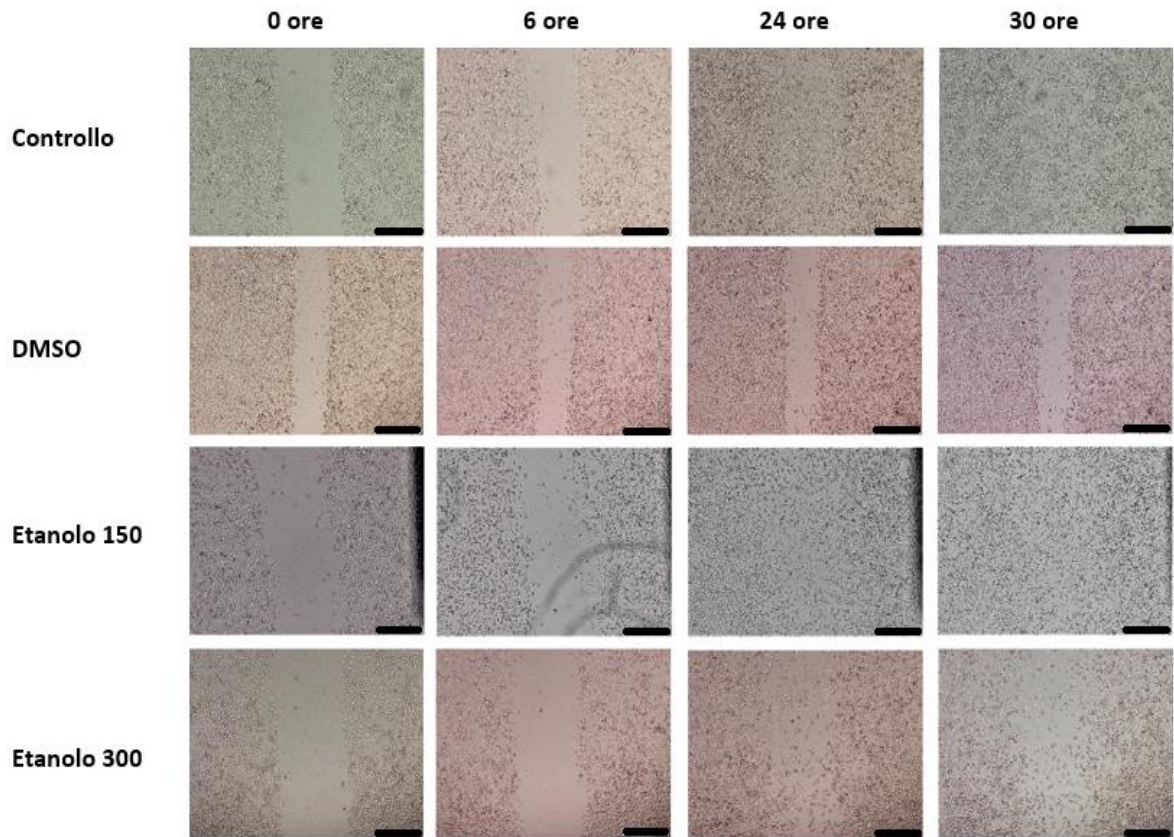
Microfotografie scattate con microscopio ottico Leica utilizzando un ingrandimento 4X a distanza di 0, 6, 24 e 30 ore dalla incisione dello scratch sul monostrato cellulare di cheratinociti HaCaT. Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di estratti (150  $\mu\text{g/ml}$  e 300  $\mu\text{g/ml}$  finali dell'estratto etanolic e 150  $\mu\text{g/ml}$  dell'estratto etanolic) e la barra nera in basso a destra in ogni singola foto rappresenta una distanza di 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18: Quantificazione dell'ampiezza dello scratch a vari tempi dalla incisione del monostrato cellulare di cheratinociti HaCaT.**

Grafico della valutazione quantitativa ottenuta esprimendo in percentuale la distanza misurata in pixel a 6-24-30 ore tra i margini dello scratch di ciascun campione, rispetto al medesimo campione al tempo iniziale delle immagini in Fig. 17 ottenute dal trattamento delle cellule HaCaT in presenza o assenza degli estratti etanolico (150 e 300  $\mu\text{g/ml}$ ) e di DMSO (150  $\mu\text{g/ml}$ ) di *C. amentacea*.

Nei fibroblasti L929 era invece evidente una progressiva migrazione e colonizzazione dello scratch da parte delle cellule presenti nel controllo, ma non in tutti i campioni del trattamento, per quanto i risultati fossero meno evidenti e apprezzabili rispetto ai cheratinociti HaCaT. Nello specifico, l'estratto etanolico a entrambe le concentrazioni testate (150 e 300  $\mu\text{g/ml}$ ) non ha mostrato una particolare attività favorente la migrazione dei fibroblasti, che risultavano infatti coprire lo scratch a circa la stessa velocità del controllo, mentre l'unica concentrazione testata dell'estratto di DMSO (150  $\mu\text{g/ml}$ ) non sembrava favorire la migrazione e la proliferazione delle cellule, che risultavano invece inibite sia nella migrazione che nella proliferazione.



**Figura 19: Fotografie scattate a distanza di 0, 6, 24 e 30 ore dalla incisione dello scratch sul monostrato cellulare di fibroblasti L929.**

Microfotografie scattate con microscopio ottico Leica utilizzando un ingrandimento 4X a distanza di 0, 6, 24 e 30 ore dalla incisione del monostrato cellulare di fibroblasti L929. Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di estratti (150 µg/ml e 300 µg/ml finali dell'estratto etanolic e 150 µg/ml dell'estratto etanolic) e la barra nera in basso a destra in ogni singola foto rappresenta una distanza di 50 µm

## CONCLUSIONI

I dati ottenuti in questa tesi dimostrano il forte effetto antinfiammatorio di due estratti di *C. amentacea* (DMSO ed etanolic) del Mar Ligure mediante analisi molecolari e cellulari. Gli estratti hanno mostrato diversi effetti antiossidanti e antinfiammatori che sono stati per la prima volta accuratamente indagati mediante test spettrofotometrici privi di cellule ma, soprattutto, mediante l'uso di modelli cellulari di tossicità e infiammazione. Gli effetti degli estratti nel noto modello infiammatorio dei macrofagi RAW 264.7 stimolati da LPS evidenziano la capacità dei metaboliti contenuti negli estratti di agire a diversi livelli del processo infiammatorio, entrambi abbattendo l'esplosione respiratoria che porta all'eccessiva produzione di ROS tipica della fase iniziale della risposta infiammatoria da parte delle cellule immunitarie, e anche nella fase successiva, bloccando la produzione e il rilascio di importanti mediatori che propagano ed esacerbano il processo. Questo risultato è estremamente interessante se si va ad esempio a considerare l'inibizione della trascrizione di COX-2. Esso infatti produce un importante mediatore dell'infiammazione, la PGE2, la quale è responsabile dei molti effetti dannosi dell'infiammazione acuta generalizzata come l'aumento della risposta sensoriale del dolore ed il suo effetto pirogeno. Pertanto, l'inibizione della produzione di PGE2 è l'obiettivo principale di numerosi farmaci antinfiammatori chiamati FANS (farmaci antiinfiammatori non steroidei). Questi prodotti negli anni hanno mostrato molti effetti indesiderati in quanto in grado di andare ad inibire non solo COX-2 ma anche COX-1, un enzima costitutivamente attivo necessario alla produzione di molecole come i trombossani a partire dall'acido arachidonico (Patil et al., 2019); esiste quindi una necessità nel mercato farmaceutico di nuovi prodotti più sicuri, con una azione più selettiva e una bassa tossicità, che possono



essere ottenuti da piante e fitocostituenti isolati. La stessa attività di scavenging dei ROS da parte degli estratti di *C. amentacea* nelle cellule all'inizio della risposta infiammatoria è probabilmente la ragione dei forti effetti inibitori sull'attivazione dei macrofagi, in quanto diversi ROS come il radicale ossidrilico, l'anione superossido e il perossido di idrogeno, prodotti immediatamente dopo gli stimoli infiammatori dall'attivazione del NADPH ossidasi, sono considerati segnali a monte in grado di attivare sia NF-kB che la segnalazione delle MAP chinasi (Korbecki et al., 2013; Scarfi et al., 2007) responsabili della maggior parte della risposta infiammatoria delle cellule a valle. Ciò suggerisce che l'uso degli estratti di *C. amentacea* non abbia effetti collaterali sull'attività di COX-1, poiché il meccanismo di azione non si basa un'inibizione diretta dell'attività dell'enzima COX-2, ma sull'attivazione del segnale di trasduzione a monte, come al contrario si ha nei FANS che quindi incidono anche sull'isoforma costitutiva dell'enzima causando danni ben noti in primis sul compartimento gastrico.

In conclusione, la bassa tossicità cellulare dimostrata dai due estratti apre la strada all'uso, nel prossimo futuro, dei suoi principi bioattivi, dimostrati in questa tesi, per la formulazione di preparati nutraceutici antiossidanti per scopi anti-invecchiamento, nonché di lozioni cosmetiche lenitive e riparatrici in trattamenti per curare gli stati infiammatori della pelle.

## BIBLOGRAFIA

AHN C. B., JEON Y. J., KANG D. S., SHIN T. S., JUNG B. M.; Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry.; *Food Research International*; **2004**; 37, 253–258.

AMES BN, SHIGENAGA MK, HAGEN TM. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **1993**; 90: 7915-7922

ANDERSON D.M.W., BRYDON W.G., EASTWOOD M.A., SEDGWICK D.M.; Dietary effects of Propylene Glycol Alginate in Humans, *Food Addit. Contam.*; **1991**; vol. 8, no. 3, pp. 225–236.

ANDERSON D.M.W., BRYDON W.G., EASTWOOD M.A., SEDGWICK D.M.; Dietary effects Of Sodium Alginate in Humans, *Food Addit. Contam.*; **1991**; vol. 8, no. 3, pp. 237–248.

ANDRADE PB, BARBOSA M, MATOS RP, LOPES G, VINHOLES J, MOUGA T, VALENTAO P. Valuable compounds in macroalgae extracts; *Food Chem* **2013**; 138: 1819-1828

ARANGO DUQUE G, DESCOTEAUX A.; Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases.; *Front Immunol.*; **2014**; 5: 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491. eCollection 2014.

ARUOMA OI; Nutrition and health aspects, of free radicals and antioxidants; *Food Chem Toxicol*; **1994**; 32: 671-683.

BEUTLER BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease.; *J Rheumatol Suppl*; **1999**; 57: 16–21.

BIJU J, SULAIMAN CT, SATEESH G, REDDY VRK.; Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants in Kerala.; *Int J Pharm Pharm Sci*; **2014**; 6(1): 406-408

BRADFORD MM.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.; *Anal Biochem*; **1976**; 72: 248-254.

BRAILSKI KH., DIMITROV B., Treatment of Duodenal Ulcer with the Bulgarian Preparation "Gastralgin," *Vutr. Boles.*, **1987**, vol. 26, no. 2, pp. 79–82

BRUNO DE SOUSA, C., GANGADHAR, K. N., MACRIDACHIS, J., PAVAO, M., MORAIS, T. R., CAMPINO, L., VARELA, J & LAGO, J. H. G.; Cystoseira algae (Fucaceae): update on their chemical entities and biological activities; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2017**; 28(11), 1486-1505.

CHANDRA M., GANDHI I.S.; Comparative Study of Alginate and Non–Alginate Antacids Concurrently Administered with H2 Antagonists in Cases of Duodenal Ulcer, *Br. J. Clin. Pract.*; **1989**, vol. 43, no. 3, pp. 97–101

CHOE E., MIN D. B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods.; *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; **2009**; 8, 345–358

CRAFT B. D., KERRIHARD A. L., AMAROWICZ R., & PEGG R. B.; Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment.; *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; **2012**; 11, 148–173.

CRIST R.H., OBERHOLSER K., SCHWARTZ D., MARZOFF J., RYDER D., CRIST D.R.; Interactions of metals and protons with algae.; *Environmental Science & Technology*; **1988**; 22; 755-760.

DAR RA, BRAHMAN PK, KHURANA N, WAGAY JA, LONE ZA, GANAIE M, PITRE KS. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays.; *Arab J Chem*; **2017**; 10: s1119-s1128 DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.02.004

DARR D, FRIDOVICH I. Free radicals in cutaneous biology; *J Invest Dermatol*; **1994**; 102:671-5.

DAWCZYNSKI CHRISTINE, RAINER AND JAHREIS, GERHARD; Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products; *Food Chemistry*; **2007**, 103, 891-899

FALACE A, ALONGI G, CORMACI M, FURNARI G, CURIEL D, CECERE E; Changes in the benthic algae along the Adriatic Sea in the last three decades; *Chemistry and ecology*; **2010**, 26(S1):77–90

FALACE A, KALEB S, DE LA FUENTE G, ASNAGHI V, CHIANTORE M (2018) EX SITU CULTIVATION PROTOCOL FOR CYSTOSEIRA AMENTACEA VAR. STRICTA (FUCALES, PHAEOPHYCEAE) FROM A RESTORATION PERSPECTIVE; Ex situ cultivation protocol for *Cystoseira amentacea* var. *stricta* (Fucales, Phaeophyceae) from a restoration perspective; *PLOS ONE*; **2018**; 13(2): e0193011.

FUJIHARA M., KOMIYAMA K., UMEZAWA I., NAGUMO T.; Antitumor Activity and Action Mechanism of Sodium Alginate Isolated from the Brown Seaweed *Sargassum fulvellum*, *Chemotherapy (Tokyo)*; **1984**; vol. 32, pp. 1004–1009

FUNAHASHI H, IMAI T, MASE T, SEKIYA M, YOKOI K, HAYASHI H, SHIBATA A, HAYASHI T, NISHIKAWA M, SUDA N, HIBI Y, MIZUNO Y, TSUKAMURA K, HAYAKAWA A, TANUMA S.; Seaweed prevents breast cancer? *Jpn. J. Cancer Res*; **2001**; 92: 483–487

G, GIACCONE AND GIACCONE, THALASSIA AND CATRA, MARCELLO; *Cystoseira amentacea* Bory v. *amentacea*, v. *spicata* (Ercegovic) Giaccone, v. *stricta* Montagne. In: Protected Species according to the SPA/BIO protocol (Barcelona Convention) present in Italy, *biologia marina mediterranea*; **2009**; 16 (suppl. 2),22-27

HERNÁNDEZ-CARMONA G., CARRILLO-DOMÍNGUEZ S., ARVIZU-HIGUERA D. L., RODRÍGUEZMONTESINOS Y. E., MURILLO-ÁLVAREZ J. I., MUÑOZ-OCHOA M.; Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J. E. Areschoug. *Journal of Applied Phycology*; **2009**; 21, 607–616.

HIROSE Y, YOSHIMI N, SUZUI M, KAWABATA K, TANAKA T, MORI H.; Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas.; *Mol Carcinog.*; **1997**; 19(1): 25-30.

HWANG H., CHEN T., NINES R.G., SHIN H.C., STONER G.D.; Photochemoprevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols; *International Journal of Cancer*; **2006**; 119, 2742–2749.

HYUN AH JUNG, MD. NURUL ISLAM, CHAN MEE LEE, HYONG OH JEONG, HAE YOUNG CHUNG, HEE CHUL WOO, JAE SUE CHOI; Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from the edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*; *Food Science and Technology*; **2012**; 78:1321–1329

JONES CG, LAWTON JH, SHACHAK M. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*; **1994**; 69(3):373–386.

KAHL R., & KAPPUS H.; Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E.; *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*; **1993**; 196, 329–338

KANG K., HYE J. H., DONG H. H., PARK Y., SEONG H. K., BONG H. L; Antioxidant and antiinflammatory activities of ventol, a phlorotannin-rich natural agent derived from *Ecklonia cava*, and its effect on proteoglycan degradation in cartilage explant culture.; *Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology*; **2004**; 115–116, 77–95.

KEHRER JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.*; **1993**; 23: 21-48.

KHOTIMCHENKO S. V., & KULIKOVA I. V.; Lipids of different parts of the lamina of *Laminaria japonica* aresch. *Botanica Marina*; **2000**; 43, 87–91

KIM M.M., KIM S.K.; Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation; *Food and Chemical Toxicology*; **2010**; 48, 2925–2933.

KIM T.H., BAE J. S.; *Ecklonia cava* extracts inhibit lipopolysaccharide induced inflammatory responses in human endothelial cells. *Food and Chemical Toxicology*; **2010**; 48, 1682–1687.

KLAUNIG JE, XU Y, BACHOWSKI S AND JIANG J. Free radical induced changes in chemical carcinogenesis; in *Free Radical Toxicology* (ed.); *KB Wallace (Washington:Taylor and Francis) Washington*; **1997**; 375-400

KNÖFERL MW, DIODATO MD, SCHWACHA MG, CIOFFI WG, BLAND KI, CHAUDRY IH; Cyclooxygenase-2-mediated regulation of Kupffer cell interleukin-6 production following trauma-hemorrhage and subsequent sepsis; *Shock*; **2001**; 16: 479-483.

KOIVIKKO R., LOPONEN J., PIHLAJA K., JORMALAINEN V.; High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*; *Phytochemical Analysis*; **2007**; 18, 326–332.

KORBECKI J, BARANOWSKA-BOSIACKA I, GUTOWSKA I, CHLUBECK D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid.; *J Physiol Pharmacol*; **2013**; 64(4): 409-421

LACHER C., SMITH R.W., Sorption of Hg(II) by *Potamogeton natans* dead biomass; *Minerals Engineering*; **2002**; 15, 187e191

LI X., FAN X., HAN L., & LO, Q.; Fatty acids of some algae from the Bohai; *Sea. Phytochemistry*; **2002**; 59, 157–161.

LODEIRO P., J.L. BARRIADA, R. HERRERO, M.E. SASTRE DE VICENTE; The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium(II) and lead(II) removal: Kinetic and equilibrium studies; *Environmental Pollution*; **2006**; 142; 264-273

LOPES G., SOUSA C., SILVA L. R., PINTO E., ANDRADE P.B., BERNARDO, J.; Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions?; *PlosOne*; **2012**; 7, e31145.

MAÍRA BUENO ARIEDEA, THALITA MARCÍLIO CANDIDO, ANA LUCIA MOROCHO JACOMEA, MARIA VALÉRIA ROBLES VELASCOA, JOÃO CARLOS M. DE CARVALHOB, ANDRÉ ROLIM BABYA; Cosmetic attributes of algae - A review, *Algal Research*; **2017**; 25; 483–487

MANNINO AM, VAGLICA V, ODDO E. Seasonal variation in total phenolic content of *Dictyopteris polypoides* (Dictyotaceae) and *Cystoseira amentacea* (Sargassaceae) from the Sicilian coast; *Fl Medit*; **2014**; 24: 39-50.

MAURIZIO ZAVANELLA, Alle origini della vita: le alghe, *Edito a cura della fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche* – BRESCIA, **2015**, 3-7

MCDERMID K. J., & STUERCKE B.; Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*; **2003**; 15, 513–524.

MHADHEBI L, MHADHEBI A, ROBERT J, BOURAOUI A.; Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects of aqueous extracts of three mediterranean seaweeds of the genus *Cystoseira*. *Iran J Pharm Res*; **2014**; 13 (1): 207-220

MINEUR F, ARENAS F, ASSIS J, DAVIES AJ, ENGELEN AH, FERNANDES F; European seaweeds under pressure: Consequences for communities and ecosystem functioning; *J Sea Res*; **2015**; 98:91–108.

NAGAYAMA, K., IWAMURA, Y., SHIBATA, T., HIRAYAMA, I., & NAKAMURA, T.; Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; **2002**; 50, 889–893.

NARAYAN B., MIYASHITA K., & HOSAKAWA M.; Comparative evaluation of fatty acid composition of different *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters; *Journal of Aquatic Food Product Technology*; **2004**; 13, 53–70.

NATHAN C.; Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.; *faseb j*; **1992**; 6: 3051-3064.

P. KIURU, M.V. D'AURIA, C.D. MULLER, P. TAMMELA, H. VUORELA, J. YLI-KAUHALUOMA, Exploring marine resources for bioactive compounds, *Planta Med.*; **2014**; 80



PATIL KR, MAHAJAN UB, UNGER BS, GOYAL SN, BELEMKAR S, SURANA SJ, OIHA S, PATIL CR. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals.; *Int J Mol Sci*; **2019**; 20(18): 4367

PAVITHRA K, VADIVUKKARASI S. Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn.; *Food Sci Hum Well*; **2015**; 4: 42-46

PERCIVAL E., MCDOWELL, R.H.; Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides; **1967**; *Academic Press, London/New York*.

PLOUGUERNÉ E., IOANNOU E., GEORGANTEA P., VAGIAS C., ROUSSIS V., HELLIO C.; Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Marine Biotechnology*; **2010**; 12, 52–61.

PODKORYTOVA A.V., AMININA N.M., Usage of Alginate-Containing Foodstuff in Therapeutic and Prophylactic Dietology, *Novye biomeditsinskie tekhnologii s ispol'sovaniem biologicheski aktivnykh dobavok: Mater. Ross. Nauchn. Konf. (New Biomedical Technologies Using Bioactive Additives. Proc. All-Russian Conference)*, Vladivostok: IMKVL Siberian Branch, Ross. Akad. Med. Nauk, **1998**, pp. 205–209

POZZOLINI M, SCARFÌ S, GALLUS L, CASTELLANO M, VICINI S, CORTESE K, GAGLIANI MC, BERTOLINO M, COSTA G, GIOVINE M.; Production, characterization and biocompatibility evaluation of collagen membranes derived from marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847.; *Mar Drugs*; **2018**; 16: 111

RUBERTO G, BARATTA MT, BIONDI DM, AMICO V.; Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system; *J Appl Phycol*; **2001**; 13: 403-407.

SAMOILOVA L.N., GAGAEVA E.V., ANNAEV A.G.; Sovremennye napravleniya sozdaniya i otsenki kachestva gotovykh lekarstvennykh preparatov antibiotikov i antimikrobnnykh veshchestv (Modern Approaches of Developing and Quality Rating of Antibiotics and Antimicrobial Drugs), *Moscow: Meditsina*, **1990**, p. 125

SAMPATH KUMAR NS, NAZEER RA, JAIGANESH R.; Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalapsis cordyla*) and croaker (*Otholithes ruber*).; *Amino Acids*; **2012**; 42: 1641-1649

SANADA F, TANIYAMA Y, MURATSU J, OTSU R, SHIMIZU H, RAKUGI H, MORISHITA R. Source of Chronic Inflammation in Aging.; *Front Cardiovasc Med.*; **2018**; 5: 12. doi: 10.3389/fcvm.2018.00012.

SÁNCHEZ-MACHADO D. I., LÓPEZ-CERVANTE, J., LÓPEZ-HERNÁNDEZ J., & PASEIRO-LOSADA P.; Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds.; *Food Chemistry*; **2004**; 85, 439–444.

SANDBERG A.S., ANDERSSON H., BOSAEUS I.; Alginate, Small Bowel Sterol Excretion, and Absorption of Nutrients in Ileostomy Subjects; *Am. J. Clin. Nutr.*; **1994**, vol. 60, no. 5, pp. 751–756.

SCARFÌ S, BENATTI U, POZZOLINI M, CLAVARINO E, FERRARIS C, MAGNONE M, VALISANO L, GIOVINE M.; Ascorbic acid-pretreated quartz enhances cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 murine macrophages; *FEBS J*; **2007**; 274: 60-73

SCHIEWER S., VOLESKY B.; Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of divalent metal ions and protons.; *Environmental Science & Technology*, **1997**; 31; 2478-2485.

SHANNON E, ABU-GHANNAM N.; Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications; *Mar Drugs*; **2016**;14(4):81.

SHIN H. C., HWANG H. J., KANG K. J., LEE B. H.; An antioxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*; *Archives of Pharmacal Research*; **2006**; 29, 165–171

SHINAGAWA N, TAKAYAMA T, KATO K, HIRATA K, KATSURAMAKI T, MUKAIYA M, SATO T, USHIJIMA Y, USHIDA T, YURA J, AIKAWA N, SEKINE K, MANABE T, TAKEYAMA H, HASEGAWA M, TANAKA N, IWAGAKI H, TANIGUCHI M, FUCHIMOTO S, MASHITA K, KIMURA H, ISHIKAWA S, KONAGA E, TAKEUCHI H, MIZUNO A, KINOSHITA H, MORIMOTO K, SUEDA T, TAKESUE Y, FUJIMOTO M, YOKOYAMA T, HIYAMA E, TANIMURA H, IKEDA S, YASUNAMI Y, YAMAUE H, OHNISHI H, SUZUKI Y.; Bacteria isolated from surgical infections and its susceptibilities to antimicrobial agents--special references to bacteria isolated between April 2002 and March 2003; *The Japanese Journal of Antibiotics*; **2004**; Feb;57(1):33-69.

SHINDO Y, WITT E, PACKER L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light.; *J Invest Dermatol.*; **1993**; 100(3):260-5.

SIDHARTHAN M., VISWANADH G. S., KYOUNG H. K., HYUK J. K., & SHIN H. W.; Biofouling attractants from a brown marine alga *Ecklonia cava*; *Journal of Environmental Biology*; **2007**; 28, 173–176.

SINGH I. P., BHARATE S. B.; Phloroglucinol compounds of natural origin.; *Natural Product Reports*; **2006**; 23, 558–591.

STANOIKOVIC TP, KONIC-RISTIC A, KLJAJIC Z, GROZDANIC-STANISAVLJEVIC N, SRDIC-RAJIC T, ZDUNIC G, SAVIKIN K. Antioxidant, antiplatelet and cytotoxic activity of extract of *Cystoseira amentacea* from the coast of Montenegro (South-east Adriatic Sea); *Digest J Nanomat Biostruct*; **2014**; 9 (2): 869-880.

STANOJKOVIC, TATJANA AND KONIC RISTIC, ALEKSANDRA AND KLJAJIC, ZORAN AND GROZDANIĆ, NAĐA AND SRDIC-RAJIC, TATJANA AND ZDUNIĆ, GORDANA AND ŠAVIKIN, K. ANTIOXIDANT; Antiplatelet and cytotoxic activity of extract of *Cystoseira Amentacea* from the coast of montenegro (South-East Adriatic sea); *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*; **2014**; 9; 869-880

STENGEL D. B., CONNAN S., & POPPER Z. A.; Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*; **2011**; 29, 483–501.

SUGAWARA T, BASKARAN V, TSUZUKI W, NAGAO A.; Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice; *the Journal of Nutrition*; **2002**;132(5):946-51.

SUN Y., M. CHAVAN, Cosmetic Compositions Comprising; *Marine Plants*; **2014**; 14/077 934

TERASAKI M., HIROSE A., NARAYAN B., BABA Y., KAWAGOE C., YASUI H.; Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents; *Journal of Phycology*; **2009**; 45, 974–980.

THIBAUT T, BLANFUNÉ A, BOUDOURESQU CF, VERLAQUE M., Decline and local extinction of *Fucales* in the French Riviera: the harbinger of future extinctions?; *MEDITERR MAR SCI.*; **2015**, 50(12):1472–1489

TRIFAN A, VASINCU A, LUCA SV, NEOPHYTOU C, WOLFRAM E, OPITZ SEW, SAVA D, BUCUR L, CIOROIU BI, MIRON A, APROTOSOAIE AC, CIOANCA O, HANCIANU M, JITAREANU A, CONSTANTINOU AI. Unravelling the potential of seaweeds from the Black Sea coast of Romania as bioactive compounds sources. Part I: *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh.; *Food Chem Toxicol*; **2019**; 134: 110820 DOI: 10.1016/j.fct.2019.110820

VIZETTO-DUARTE C, CUSTÓDIO L, ACOSTA G, LAGO JHG, MORAIS TR, BRUNO DE SOUSA C, GANGADHAR KN, RODRIGUES MJ, PEREIRA H, LIMA RT, VASCONCELOS MH, BARREIRA L, RAUTER AP, ALBERICIO F, VARELA J. Can macroalgae provide promising anti-tumoral compounds? A closer look at *Cystoseira tamariscifolia* as a source for antioxidant and anti-hepatocarcinoma compounds; *PeerJ*; **2016**: e1704 DOI 10.7717/peerj.1704

VOLF I, IGNAT I, NEAMTU M, POPA VI.; Thermal stability, antioxidant activity and photo-oxidation of natural polyphenols.; *Chem Papers*; **2014**; 68 (1): 121-129

WEIDINGER A, KOZLOV AV.; Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction.; *Biomolecules*; **2015**; 5: 472-484 DOI: 10.3390/biom5020472

WINTERBOURN CC.; Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction.; *Toxicol Lett*; **1995**; 82/83: 969-974

XU Y, ZHAO H, ZHANG M, LI CJ, LIN XZ, SHENG J, SHI W. Variatons of antioxidant properties and NO scavenging abilities during fermentation of Tea.; *Int J Mol Sci*; **2011**; 12: 4574-4590

YAN X, NAGATA T AND FAN X. Antioxidative activities in some common seaweed. *Plant Foods Hum. Nutr.*; **1998**; 52: 253-262.

ZOU Y., QIAN Z. J., LI Y., KIM M. M., LEE S. H., KIM S. K.; Antioxidant effects of phlorotannins isolated from *Ishige okamurae* in free radical mediated oxidative systems; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2008**; 56, 7001–7009.