

A05



Vai al contenuto multimediale

Guglielmo Paganetto
Gianni Sacchetti

Biotechnologie delle piante officinali





Aracne editrice

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

Copyright © MMXVIII
Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.gioacchinoonoratieditore.it
info@gioacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20
00020 Canterano (RM)
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-1750-7

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: settembre 2018

Indice

- 9 *Prefazione*
- 11 **Capitolo I**
Cosa sono le biotecnologie applicate alle piante officinali
- 1.1. La specie vegetale, 13 – 1.2. La molecola, 16 – 1.3. La produzione biotecnologica, 17 – 1.4. Le tecniche estrattive e analitiche, 19 – 1.5. Pianta medicinale o pianta officinale, 19 – 1.6. Alcune definizioni, 21 – 1.6.1. *Droga vegetale*, 21 – 1.6.2. *Fitocomplesso*, 22 – 1.6.3. *Principio attivo*, 22 – 1.6.4. *Elicitori*, 22.
- 23 **Capitolo II**
I metaboliti secondari e le vie biogenetiche
- 2.1. Filogenesi dei metaboliti secondari, 24 – 2.2. La via dell'acido shikimico, 28 – 2.3. La via dell'acetato (malonato), 31 – 2.4. Biosintesi dei composti fenolici, 37 – 2.5. Via dell'acetato (mevalonato), 37 – 2.6. Vie biogenetiche complesse (alcaloidi), 41 – 2.7. Tessuti secretori e strutture di accumulo, 44.
- 49 **Capitolo III**
Risposte al condizionamento ambientale nei vegetali
- 3.1. Gli ormoni, 49 – 3.1.1. *Auxine*, 50 – 3.1.2. *Citochinine*, 53 – 3.1.3. *Gibberelline*, 56 – 3.1.4. *Etilene*, 58 – 3.1.5. *Acido abscissico*, 59 – 3.2. Meccanismi di risposta all'ambiente biotico, 61 – 3.2.1. *Difese chimiche costitutive e indotte*, 61 – 3.2.2. *Composti allelochimici e allelopatia*, 63 – 3.3. Meccanismi di risposta all'ambiente abiotico, 65.
- 69 **Capitolo IV**
Coltura in vitro di cellule e tessuti di piante officinali
- 4.1. Colture in vitro di cellule vegetali, 71 – 4.1.1. *L'espianto*, 71 – 4.1.2. *Allestimento della coltura di calli*, 73 – 4.1.3. *Il terreno di coltura*, 75 – 4.1.4. *Evoluzione temporale della coltura*, 78 – 4.1.5. *Colture liquide in sospensione*, 82

– 4.1.6. *Curva di crescita e studio della vitalità cellulare*, 84 – 4.1.7. *Culture di protoplasti*, 85 – 4.2. *Culture in vitro di organi*, 86 – 4.2.1. *Culture di radici e di hairy roots*, 87 – 4.2.2. *Embriogenesi somatica*, 89 – 4.2.3. *Culture di germogli e micropropagazione*, 90.

95 Capitolo V *Ingegneria Genetica nelle Piante*

5.1. *Trasformazione genetica con agrobacterium tumefaciens*, 96 – 5.1.1. *Dai plasmiditi ai vettori di trasformazione delle cellule vegetali*, 98 – 5.1.2. *Bio-istica*, 101 – 5.2. *Le nuove piattaforme biotecnologiche vegetali: Plant Molecular Farming*, 103 – 5.2.1. *Espressione transgenica del dimero umano dell'apolipoproteina A-I Milano in semi di riso (Oryza sativa)*, 104 – 5.2.2. *Produzione di β -glucosidase in semi della pianta del tabacco (Nicotiana tabacum)*, 105 – 5.2.3. *Produzione di maltasi acida umana in semi di tabacco (Nicotiana tabacum)*, 105 – 5.2.4. *Vaccini derivanti biotecnologicamente dalle piante*, 106.

107 Capitolo VI *I processi estrattivi e la caratterizzazione molecolare nell'applicazione biotecnologica alle piante officinali*

6.1. *Processi estrattivi*, 107 – 6.1.1. *Estrazione solido-liquido*, 110 – 6.1.2. *Estrazione solido-liquido con fluidi supercritici*, 116 – 6.2. *Estrazione liquido-liquido*, 120 – 6.2.1. *Estrazione liquido-liquido per spostamento*, 122 – 6.3. *Estrazione e separazione per distillazione*, 126 – 6.3.1. *Liquidi completamente miscibili e distillazione semplice*, 126 – 6.3.2. *Liquidi completamente miscibili e ri-distillazione*, 130 – 6.3.3. *Liquidi immiscibili e distillazione in corrente di vapore d'acqua*, 132 – 6.4. *Isolamento e caratterizzazione molecolare*, 135 – 6.4.1. *Le tecniche cromatografiche*, 136 – 6.4.2. *Classificazione delle tecniche cromatografiche in base allo stato fisico della fase mobile e del letto cromatografico*, 140 – 6.4.3. *Cromatografia planare (Thin Layer Chromatography, TLC)*, 141 – 6.4.4. *Cromatografia liquida su colonna*, 142 – 6.4.5. *Gasromatografia*, 145.

147 Capitolo VII *Dal laboratorio alla produzione*

7.1. *Tipologie di bioreattori*, 147 – 7.1.1. *Bioreattore ad agitazione meccanica (Stirred Tank Reactors)*, 149 – 7.1.2. *Bioreattore pneumatici (Airlift reactors)*, 150 – 7.1.3. *Bioreattori a letto fisso o a letto fluidizzato*, 151 – 7.1.4. *Bioreattori per culture in larga scala di hairy roots*, 153 – 7.2. *Le variabili che influenzano la produttività di sistemi biotecnologici*, 155 – 7.2.1. *L'espian- to*, 156 – 7.2.2. *Terreno di coltura*, 157 – 7.2.3. *Gli zuccheri*, 157 – 7.2.4. *I nitra- ti*, 158 – 7.2.5. *I fosfati*, 158 – 7.2.6. *Precursori biosintetici dei principi attivi*, 159

- 7.2.7. *La luce*, 159 – 7.2.8. *Il pH*, 160 – 7.2.9. *La temperatura*, 161 – 7.2.10. *L'a-
reazione*, 161 – 7.2.11. *L'elicitazione*, 162 – 7.2.12. *L'immobilizzazione*, 162 –
7.2.13. *La selezione*, 164.
- 165 **Capitolo VIII**
Dalla tradizione erboristica alla produzione biotecnologica
- 8.1. *Atropa belladonna*, 165 – 8.1.1. *Caratteristiche e proprietà*, 165 – 8.1.2. *Strategie biotecnologiche*, 167 – 8.2. *Cannabis sativa*, 169 – 8.2.1. *Caratteristiche e proprietà*, 169 – 8.2.2. *Strategie biotecnologiche*, 171 – 8.3. *Papaver somniferum*, 173 – 8.3.1. *Caratteristiche e proprietà*, 173 – 8.3.2. *Strategie biotecnologiche*, 174 – 8.4. *Digitalis purpurea*, 178 – 8.4.1. *Caratteristiche e proprietà*, 178 – 8.4.2. *Strategie biotecnologiche*, 179.
- 181 **Capitolo IX**
La produzione biotecnologica di principi attivi per la terapia del cancro
- 9.1. Gli alcaloidi di *Catharantus roseus*, 181 – 9.1.1. *La biosintesi e l'approccio biotecnologico*, 183 – 9.1.2. *La produzione di alcaloidi da coltura di germogli di Catharantus roseus*, 186 – 9.2. La podofillotossina di *Podophyllum peltatum*, 189 – 9.2.1. *I derivati della podofillotossina*, 190 – 9.2.2. *La produzione di podofillotossina da coltura di Linum album*, 193 – 9.3. Gli alcaloidi di *Camp-
totheca acuminata*, 196 – 9.3.1. *Biosintesi e produzione biotecnologica*, 198 – 9.4. Ancora sul taxolo, 201 – 9.4.1. *Colture di calli da Taxus spp*, 203 – 9.5. *Plant Molecular Farming* e anticorpi monoclonali, 204.
- 207 **Capitolo X**
Da artemisia annua all'artemisinina
- 10.1. La storia, 207 – 10.2. La molecola, biosintesi e meccanismo d'azione, 211 – 10.3. Strategie biotecnologiche, 213 – 10.4. Impiego di bioreattori, 214.
- 219 **Bibliografia**

Prefazione

Entro la tenera corteccia di questo fragile fiore risiede un veleno e anche un potere medicamentoso; perchè se odorato, esso rallegra ogni senso col suo profumo; ma se è assaporato, arresta tutti i sensi insieme con il cuore.

W. SHAKESPEARE*

Nella stesura di questo testo si sono voluti descrivere i correlati scientifici e concettuali che caratterizzano la botanica farmaceutica e la farmacognosia applicata rispetto all'evoluzione delle moderne biotecnologie, sviluppate con specifica attinenza alle piante officinali. Lo sviluppo di colture *in vitro* di cellule vegetali e di piante complete modificate geneticamente ha assunto negli ultimi decenni un ruolo di prorompente e progressiva rilevanza. Con specifico riferimento al contesto di quest'opera, le biotecnologie applicate alle piante officinali hanno trovato e trovano oggi grande propulsione nel miglioramento agronomico delle coltivazioni attraverso un'attenta selezione *in vitro* di linee cellulari, assecondando il moderno mercato dei prodotti erboristici che vedono nelle coltivazioni tradizionali il maggiore canale di approvvigionamento di droghe vegetali, nonché — e soprattutto — nel miglioramento qualitativo e quantitativo della produzione di principi attivi con finalità salutistiche e farmacologiche in contesti esclusivamente biotecnologici. Ciò attraverso il potenziamento della biomassa estrattiva e le strategie impiantistiche (bioreattori) che, dalla scala laboratoristica, consentono il trasferimento a livello industriale incrementando la produttività. La comprensione dei relati scientifici che sottendono l'ampia e sempre prolifica letteratura in questo contesto richiede una rivisitazione alla luce delle nuove tecnologie ed esigenze della moderna botanica farmaceutica, farmacognosia e

* W. SHAKESPEARE, *Romeo e Giulietta*, (atto 2, scena 3).

produzione erboristica, attraverso la proposizione di nuovi moduli didattici che possano essere di ausilio all'apprendimento e, soprattutto, di strumenti concettuali che costituiscano i fondamenti per comprenderne la continua evoluzione. A tal fine, dopo un primo capitolo in cui si è cercato di qualificare questi correlati con l'esempio di un farmaco antitumorale la cui scoperta e sviluppo rappresentano un riferimento paradigmatico, nei capitoli successivi vengono affrontate la biosintesi dei metaboliti secondari, i fattori ecologici che ne condizionano la produzione, l'allestimento e modifica genetica delle colture cellulari, le metodiche di estrazione e analisi fino alla produzione massiva ed industriale in bioreattori. Gli ultimi tre capitoli riprendono alcuni esempi significativi della letteratura specialistica al fine di evidenziare i successi, i limiti e le potenzialità di sviluppo delle tecniche dei capitoli precedenti secondo l'attuale *stato dell'arte*. Con queste premesse, gli autori non hanno pertanto inteso fornire una trattazione esaustiva su di una tematica così ampia ed in costante evoluzione, ma auspicano di essere stati efficaci, oltre che nel coadiuvare il lettore nell'apprendimento dei fondamenti, anche nell'orientarlo verso un corretto atteggiamento metodologico, utilizzando gli strumenti concettuali qui appresi come viatico intellettuale alla comprensione della dinamicità scientifica di questa disciplina.

Cosa sono le biotecnologie applicate alle piante officinali

La lezione del taxolo

Il Taxolo è un principio attivo antitumorale molto efficace presente in commercio dai primi anni novanta (Fig. 1.1). Oggi, a più di 30 anni dalle prime ricerche, è approvato nell'ambito della pratica clinica di 75 paesi per il trattamento del tumore alla mammella, all'ovaio e al polmone. Ai fini della presente trattazione il taxolo costituisce un riferimento paradigmatico per familiarizzare con la terminologia, l'approccio metodologico e tecnico finalizzato all'inquadramento della disciplina che vogliamo descrivere. Per far questo seguiamo la storia per sommi capi di questa molecola così da introdurre le varie tematiche che svilupperemo nei prossimi capitoli.

Nel 1958 il *National Cancer Institute* avviò un programma che prevedeva l'analisi di 35.000 specie botaniche nelle quali fosse possibile identificare un principio attivo efficace nella terapia dei tumori [1]. Tra i reperti entrati nel protocollo di verifica era presente la corteccia di un albero proveniente dalla costa californiana del Pacifico, noto dai nativi del luogo come *albero dello yew* o "medico della foresta", scientificamente *Taxus brevifolia*. Questi riferimenti etnobotanici avevano indotto i ricercatori ad inserire questa specie nella ricerca al fine di ottenere un fitocomplesso, estratto dalla corteccia, che sarebbe poi stato caratterizzato dal punto di vista della composizione chimica e delle proprietà farmacologiche.

Due ricercatori del *Research Triangle Institute in North Carolina*, Monroe Wall e M.C. Wani, testarono le molecole ottenute dal fitocomplesso su linee cellulari tumorali pervenendo ad attribuire nel 1971 al composto 17, poi denominato taxolo, un'indubbia efficacia nel contrastarne la crescita e la propagazione.

Ci vollero quasi dieci anni per confermare questa evidenza e per chiarire il meccanismo d'azione del taxolo nei confronti delle cellule in rapida divisione ed in particolare per le cellule tumorali. Il merito va a Susan Horwitz dell'*Albert Einstein College of Medicine di New York* che dimostrò come questa molecola impedisca la depolimerizzazione della tubulina impedendo così la formazione del fuso mitotico. Potè così cominciare il lungo lavoro preliminare di ottimizzazione della resa produttiva che doveva fornire i quantitativi necessari alla sperimentazione clinica alla quale si approdò solo nel 1983. In quell'anno, infatti, si riuscì ad ottenere un quantitativo sufficiente di molecola pura da somministrare ai pazienti come principio attivo. Il maggior problema era rappresentato dall'estrema esiguità della concentrazione percentuale di taxolo nei fitocomplessi, e dalla difficoltà di estrazione e purificazione della singola molecola. L'impiego della corteccia dell'*albero del yew* richiedeva quantitativi così elevati di materiale da rischiare l'estinzione della specie. La concentrazione di taxolo nella pianta adulta è infatti estremamente ridotta tanto che la resa di estrazione — estremamente scarsa — richiederebbe circa 20–25 kg di materiale vegetale fresco da estrarre per ottenere un solo grammo di principio attivo. L'ideale sarebbe stato sintetizzare completamente la molecola in laboratorio

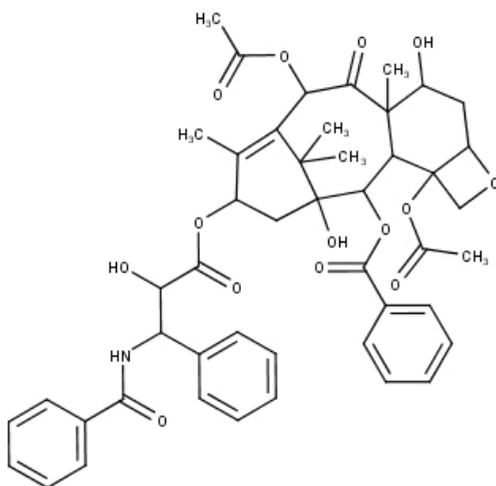


Figura 1.1. Struttura chimica del taxolo.

con procedure efficaci e resa industriale. L'estrema complessità della struttura molecolare richiese altri dieci anni di tentativi per realizzare la sintesi chimica *ab initio*, ma con una resa decisamente carente a fini commerciali [2]. Questa sconfitta della chimica di sintesi rispetto alla produzione del taxolo ha determinato la spinta propulsiva della ricerca verso lo sviluppo delle biotecnologie, con particolare riferimento alla loro applicazione rispetto alle piante officinali. L'utilizzo delle straordinarie capacità biosintetiche della cellula vegetale, lo sfruttamento delle cellule vegetali come laboratorio di produzione di principi attivi è stata la chiave di volta che — attraverso la lezione del taxolo — ha determinato lo sviluppo e la crescita vertiginosa di questo straordinario quanto complesso strumento di produzione, oggi ancor più di ieri indispensabile al progresso farmaceutico. Quindi, nonostante le oggettive difficoltà della sintesi chimica, grazie all'impiego di tecniche biotecnologiche, di cui diremo in seguito dei tecnicismi nello specifico, nonché di procedure di semi-sintesi la produzione di taxolo raggiunge livelli sufficienti allo sfruttamento industriale alla fine degli anni ottanta del secolo scorso. A partire dal 1992, iniziarono pertanto ad essere concesse dalle varie agenzie governative del farmaco le autorizzazioni alla commercializzazione e all'applicazione clinica del taxolo. Nel 1992 la *Food and Drug Administration* americana (FDA) lo autorizza per trattare il cancro ovarico, nel 1993 l'autorizzazione americana viene estesa dall'Agenzia Europea di Controllo sui Medicinali (EMEA) all'Europa. Dal 1994 in poi l'uso viene esteso al trattamento del cancro polmonare e mammario.

Ogni singola fase del lungo *iter* che conduce dalla pianta all'impiego clinico richiede l'applicazione di procedure e metodologie specialistiche a partire dalla caratterizzazione tassonomica del vegetale di estrazione fino all'impiego sull'uomo.

1.1. La specie vegetale

Il *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), nota comunemente come Tasso del Pacifico, ma anche come albero della morte oltre che come *medico della foresta*, è un piccolo albero dioico, di 5–10 metri di altezza, con chioma conica, larga ed irregolare. Il sistema radicale è profondo e diffuso, il tronco è irregolare ed ha diametro superiore al metro, cor-

teccia sottile, liscia con scaglie allungate, di colorazione rosso-bruna, rami sottili, gemme scalari acute, giallastre. Le foglie sono lineari, strette e leggermente appiattite, molli e pieghevoli e distribuite su due file [130]. La descrizione di dettaglio delle caratteristiche morfo-anatomiche della pianta potrebbe configurarsi, a prima vista, come pedante ed eccessiva (Fig. 1.2) ma, di fatto, l'attenta analisi di ogni particolare è un presupposto indispensabile alla qualificazione sicura della specie vegetale, inquadrandosi nella necessità di circoscrivere in modo rigoroso sia l'identità del soggetto botanico rispetto alla specie di effettiva utilità farmaceutica sia l'estrema variabilità delle componenti fitochimiche che dovranno rispettare parametri coerenti con l'efficacia e la sicurezza d'uso terapeutico.

Già la stessa specie può, infatti, presentare in diversi esemplari distribuiti in areali anche relativamente vicini peculiarità chimiche produttive sensibilmente differenziate come espressione del metabolismo secondario rispetto alla intrinseca resiliente capacità adattativa ad ambienti e condizioni differenti delle specie vegetali. A maggior ragione, se consideriamo il "cugino" europeo del *Taxus brevifolia*, il *Taxus baccata*, specie affine originaria dell'Africa del Nord e dell'Asia, che vegeta spontaneo nelle zone montuose della regione mediterranea prediligendo zone umide e ombrose. La specie arborea *T. baccata*,



Figura 1.2. Il *Taxus brevifolia* è un piccolo albero dioico, di 5–10 metri di altezza, con chioma conica larga ed irregolare. Il sistema radicale è profondo e diffuso, il tronco è irregolare e ha diametro superiore al metro, corteccia sottile, liscia con scaglie allungate, rosso-bruna, rami sottili, gemme scalari acute, giallastre.

sempreverde, viene coltivata come pianta ornamentale di incredibile longevità, dotata di una chioma ricca di foglie aghiformi verdi scure, di una durissima corteccia rossiccia e di frutti dalla forma di bacche, chiamati arilli, e può raggiungere i 15–20 metri di altezza.

Il nome comune tasso deriva dal greco *taxon* che significa “freccia”. L’appellativo di albero della morte gli veniva forse attribuito dall’impiego nella fabbricazione di dardi velenosi, o forse dalla sua tossicità, che potrebbe rendere conto della biosintesi del taxolo. Un’altra interpretazione ha origini espressamente europee, scozzesi in particolare, dal momento che veniva utilizzato e lavorato il legno dei rami adulti per fabbricare archi di incredibile potenza, in grado di lanciare frecce molto più lontano rispetto agli archi dei vicini inglesi, per questo spesso sconfitti in battaglia.

Già nel 1880 il chimico italiano Domenico Amato isolò dal *Taxus baccata* un alcaloide o, meglio, un’ammina alcaloidea, che caratterizzò tramite svariate reazioni riconoscitive, ma purtroppo non pervenne alla definizione della struttura, né continuò a studiarlo. Tuttavia resta il dubbio che egli sia stato il primo chimico a isolare questa sostanza, pur non avendone descritto gli effetti tossici.

A questo punto, il lettore avrà compreso come l’azione terapeutica del taxolo si espliciti come azione tossica sulle cellule tumorali, dunque sorge spontaneo il quesito sul motivo del processo coevolutivo che accompagna la selezione di piante tossiche nei confronti del regno animale ed in particolare dei mammiferi. La produzione del taxolo comporta per la pianta un dispendio energetico non trascurabile a fronte della sintesi di una molecola non necessaria al trofismo organico. Il taxolo è infatti un metabolita secondario, con questo termine ci si riferisce a metaboliti che, a differenza dei metaboliti primari (proteine, zuccheri, lipidi e acidi nucleici), non svolgono un ruolo fondamentale nelle funzioni vitali di base della cellula come divisione, crescita, differenziamento, riproduzione. Essi servono primariamente alla pianta nel complesso e non alla singola cellula, agiscono come segnali chimici nell’interazione della pianta con l’ambiente biotico (microorganismi, piante animali) e costituiscono una risposta a fattori stressogeni di natura abiotica (temperatura, UV, carenza di acqua, e/o di nutrienti, fattori climatici in genere).

Molti metaboliti secondari agiscono da deterrenti, specifici o aspecifici, nei confronti di animali erbivori, microrganismi e virus. Alcune

piante sono in grado di produrre composti con funzione antibiotica, antimicotica, antivirale, o, come nel caso del taxolo, embriotossica o teratogena. L'effetto embriotossico consente alla pianta un controllo indiretto sulla popolazione dei predatori. Anche l'azione embriotossica è esito di un processo coevolutivo: le cellule neoplastiche acquisiscono molte delle caratteristiche tipiche delle cellule indifferenziate embrionali, soprattutto per quanto riguarda i meccanismi di difesa, ciò rende conto della specificità nei confronti delle cellule tumorali.

1.2. La molecola

Il taxolo può essere classificato in base alla struttura molecolare tra le ammine alcaloidee, ma anche come diterpenoide alcaloideo. Come vedremo, i metaboliti secondari possono essere genericamente raggruppati secondo tre classificazioni di massima come terpeni, composti fenolici, ed alcaloidi. Ciascuna di queste tre grandi famiglie chimiche di metaboliti secondari si declinerà naturalmente in tipologie più specifiche che tratteremo di volta in volta che le argomentazioni si svilupperanno rispetto a specifici principi attivi da specifiche specie officinali. Una definizione soddisfacente di alcaloidi fa riferimento ad una caratteristica strutturale ricorrente: contengono infatti uno o più atomi d'azoto all'interno di un anello eterociclico che, in ragione dell'assetto elettronico spaiato nell'orbitale più esterno, possono conferire alla molecola proprietà basiche (alcaloide = simile alle basi). Quando l'azoto non è eterociclico non si potrebbe parlare a rigore di alcaloidi per cui si preferisce identificare la molecola come protoalcaloide o ammina alcaloidea, ed è proprio questo il caso del taxolo (Fig. 1.1). Ma, in considerazione della biosintesi molecolare, lo si può fare rientrare tra le molecole molto simili ai terpeni (in particolare ai diterpeni); molto simili, ma non caratterizzabili propriamente come diterpeni in quanto l'atomo di azoto non consente una sua piena identificazione in questa classe di composti, da cui la identificazione come diterpenoide. In altre parole, il taxolo non è propriamente un alcaloide, ma protoalcaloide, e allo stesso tempo non è propriamente un terpene, bensì un terpenoide.