



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA SPERIMENTALE Ciclo XXXI

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Maria Assunta Lo Gullo

Organismi acquatici come

fonte di risorse: due casi di studio,

Arthrospira platensis (Gomont, 1892) e

Raspaciona aculeata (Johnston, 1842)

Tesi di Dottorato di:
Dott. Andrea Spinelli

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa *Nunziacarla Spanò*

Co-Tutor: Chiar.ma Prof.ssa *Ana Bartual Magro*

INDICE

1. Introduzione generale	<i>pag. 1</i>
2. Scopo della tesi	<i>pag. 4</i>
3. Capitolo I: Caratteristiche degli organismi studiati	<i>pag. 6</i>
3.1.1. <i>Arthrospira platensis</i> (Gomont, 1892)	<i>pag. 6</i>
3.1.2. <i>Raspaciona aculeata</i> (Johnston, 1842)	<i>pag. 12</i>
4. Capitolo II: Estrazione e purificazione di metaboliti secondari in <i>Raspaciona aculeata</i>	
4.1. <i>Materiali e metodi</i>	<i>pag. 16</i>
4.1.1 <i>Sito d'indagine: Lago Faro, RNO di Capo Peloro, Italia</i>	<i>pag. 16</i>
4.1.2 <i>Rilevamenti sul campo</i>	<i>pag. 20</i>
4.1.3 <i>Identificazione tassonomica</i>	<i>pag. 21</i>
4.1.4 <i>Liofilizzazione</i>	<i>pag. 22</i>
4.1.5 <i>Estrazione con solventi organici</i>	<i>pag. 24</i>
4.1.6 <i>Cromatografia</i>	<i>pag. 28</i>
4.1.7 <i>Spettrofotometria di massa</i>	<i>pag. 37</i>
4.1.8 <i>Risonanza magnetica nucleare</i>	<i>pag. 38</i>
4.1.9 <i>HPLC (High Performance Liquid Chromatography)</i>	<i>pag. 40</i>
4.2. <i>Risultati e discussione</i>	<i>pag. 41</i>
4.2.1 <i>Distribuzione e tassonomia</i>	<i>pag. 41</i>
4.2.2 <i>Prima fase sperimentale: metaboliti secondari in <i>Raspaciona aculeata</i></i>	<i>pag. 46</i>
4.2.3 <i>Seconda fase sperimentale: Determinazione e quantificazione di carotenoidi in <i>Raspaciona aculeata</i></i>	<i>pag. 56</i>
4.3. <i>Conclusioni</i>	<i>pag. 60</i>
5. Capitolo III: Accrescimento e composizione biochimica di <i>A. platensis</i> in differenti condizioni sperimentali: usi potenziali	
5.1. <i>Stato dell'arte e obiettivi</i>	<i>pag. 62</i>

<i>5.2. Materiali e metodi</i>	<i>pag. 64</i>
<i>5.2.1 Condizioni generali</i>	<i>pag. 64</i>
<i>5.2.2 Disegno e studio sperimentale</i>	<i>pag. 66</i>
<i>5.2.3 Calcolo del tasso di mutazione spontanea</i>	<i>pag. 69</i>
<i>5.2.4 Quantificazione cellulare</i>	<i>pag. 70</i>
<i>5.2.5 Pretrattamento dei campioni</i>	<i>pag. 72</i>
<i>5.2.6 Metodi analitici della biomassa (proteine, lipidi, carboidrati)</i>	<i>pag. 74</i>
<i>5.3. Risultati e discussione</i>	<i>pag. 77</i>
<i>5.3.1 Prima fase sperimentale: Crescita e acclimatazione in terreni a salinità crescente</i>	<i>pag. 77</i>
<i>5.3.2 Seconda fase sperimentale: Composizione biochimica: proteine, lipidi e carboidrati</i>	<i>pag. 83</i>
<i>5.4. Conclusioni</i>	<i>pag. 87</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>pag. 88</i>

1. Introduzione generale

L'oceano copre il 70% della Terra, essendo un habitat enorme dove milioni di specie animali e vegetali vivono, le sue profondità rappresentano un mondo ancora poco esplorato. Così, l'ambiente marino, offre una nuova frontiera di ricerca, che ad oggi ha attirato l'interesse di scienziati di diverse discipline come chimici organici, biochimici, farmacologi, biologi ed ecologi. (Newman and Cragg, 2000). Lo sviluppo delle tecniche SCUBA ha consentito a partire dagli anni sessanta un rapido accesso sia agli organismi che vivono in superficie che a quelli che popolano le acque più profonde, rendendoli disponibili alle analisi chimiche e biochimiche (Krebs, 1989; Helfman, 1983); dal 2008 ad oggi, i progressi scientifici hanno permesso la descrizione di oltre 100 molecole isolate nelle profondità oceaniche (Skropeta and Wei, 2014), molte delle quali hanno mostrato bio-attività. Gli studi sono già molti e hanno ampiamente confermato che l'habitat marino rappresenta una straordinaria fonte di nuovi metaboliti bioattivi estraibili da organismi vegetali e animali, quest'ultimi appartenenti a *phyla* differenti (Annelida, Arthropoda, Bryozoa, Chordata, Cnidaria, Ctenophora, Echinodermata, Mollusca, Porifera) (Newman and Cragg, 2000; Simmons et al., 2005; Newman and Cragg, 2012). Attualmente sono stati isolati oltre 20.000 nuovi prodotti naturali da invertebrati (compresi spugne, tunicati, briozoi e molluschi), alghe e batteri marini; ad oggi, circa un centinaio di nuove molecole vengono scoperte ogni anno (Parisi, 2009). Tuttavia, solo una piccola percentuale di queste molecole è stata studiata in relazione al loro potenziale nel campo applicato (Becker et al., 2014). Alcune molecole con attività farmacologica pronunciata, sono state utilizzate per nuovi antivirali, antibatterici, antimicotici, antiprotozoi, antitubercolari, antimalarici, analgesici, anticoagulanti, antibiotici e antitumorali (Tascedda et al., 2015; Markl, 2013). Negli ultimi anni, ricercatori di tutto il mondo hanno orientato la loro ricerca al fine di migliorare il benessere e la salute nutrizionale (International Research Policy Policy Institute, 2016).

Tutti i risultati ottenuti indicano che i prodotti naturali derivanti da microalghe e cianobatteri sono fondamentali nel campo applicato (Costa et al., 2017). La maggior parte delle molecole aventi attività applicativa derivano da invertebrati che vivono in mari sub-tropicali o temperati, dove la pressione dei predatori è più alta che in altri ecosistemi (Cimino and Gavagnin, 2006). Sotto questa severa pressione selettiva, molti di questi organismi, in particolare quelli sessili che vivono in habitat densamente popolati, dove la competizione per le risorse è intensa, sopravvivono soltanto se hanno sviluppato la capacità di sintetizzare efficienti prodotti chimici di difesa, oppure siano in grado di utilizzare composti tossici generalmente prodotti da batteri simbiotici (Cimino and Ghiselin, 2009; Parisi, 2009). Questi composti aiutano alcuni invertebrati a difendersi dai predatori, dai competitori e per paralizzare le loro prede. Tali prodotti naturali vengono rilasciati nell'acqua di mare e pertanto sono rapidamente diluiti; e affinché possano avere effetto devono esplicare la loro azione a concentrazioni molto basse. Da ciò si evince che quelle molecole che esplicano azione farmacologica sono potenzialmente più efficienti e specifiche dei corrispondenti farmaci correntemente utilizzati (Parisi, 2009). Questo a volte può anche essere attribuito a condizioni di habitat estreme, mancanza di luce, alta pressione, alta concentrazione ionica, temperature variabili e scarsa disponibilità di cibo (Williams et al., 1989). Gli organismi utilizzano numerose strategie chimiche derivanti dal ricco background di molecole del "metabolismo secondario" che comprende composti come terpeni, alcaloidi, peptidi, glicosidi, steroidi e metaboliti originari da differenti vie biogenetiche (Simmons et al., 2005). Per questa ragione, data l'immensa diversità biologica nel mare, la ricerca di macromolecole che possano manifestare utili attività applicative derivate prevalentemente da invertebrati o microalghe, è in rapida ed esponenziale crescita (Mimieux Vaske and Crews, 2014).

Inoltre, mentre le risorse terrestri sono considerate ampiamente esplorate da un punto di vista farmaceutico e biochimico, meno dell'1% delle specie marine esistenti sono state esaminate in relazione al loro potenziale applicativo (Capon, 2001). Pertanto, gli oceani rappresentano una ricca fonte di composti biologicamente attivi e poco esplorati, oltre che, di nuovi percorsi biochimici che sono ancora sconosciuti e potrebbero essere utili nel campo scientifico applicato. Tra gli invertebrati marini, i Poriferi rappresentano il *phylum* più abbondante per la produzione di composti attivi, con una media di 200 nuovi metaboliti isolati ogni anno (Taylor et al., 2007). Questi metaboliti secondari si rivelano di particolare interesse biotecnologico per le loro proprietà antivirali, anticancerogene, antimicrobiche o, in generale, citotossiche. Attualmente, l'attenzione delle aziende farmaceutiche è particolarmente rivolta ai farmaci antitumorali e ciò ha comportato l'inclusione di vari derivati delle spugne nei test clinici e preclinici del cancro. Un esempio è *Raspaciona aculeata* (Johnston, 1842), una spugna mediterranea della famiglia Raspailiidae, dalla quale sono stati isolati 19 composti del metabolismo secondario; i composti hanno mostrato citotossicità contro la linea di cellule tumorali MCF-7 con valori di IC 50 tra 4 e 8 μM (Yong-Xin Li et al., 2013). Il *phylum* Porifera è un'importante fonte di metaboliti con bio-attività, soprattutto contro il cancro, e può rappresentare un'importante risorsa per lo sviluppo scientifico. Un'altra fonte di metaboliti primari ampiamente utilizzata e di particolare interesse industriale sono le microalghe e i cianobatteri. Le microalghe, con i cianobatteri rappresentano organismi fotosintetici unicellulari, che utilizzano CO_2 ed energia solare, per la produzione di zuccheri per il proprio metabolismo biosintetico, e l'ossigeno viene utilizzato in parte con la respirazione e in parte emesso esternamente. Negli ambienti acquatici sono i principali produttori primari e sono un anello importante nella catena alimentare degli ecosistemi marini, garantendo flusso di materia ed energia necessaria per il mantenimento degli organismi eterotrofi.

Sono coltivati per produrre biomassa e ottenere prodotti e processi utili (cibo, integratori, biocarburanti, depuratori delle acque); le microalghe e i cianobatteri di diverse specie sono già prodotti e vengono introdotti sul mercato in diversi paesi, in cui sono utilizzati come integratori alimentari, alimenti per animali, pigmenti, acidi grassi $\omega 3$ e biomasse per l'acquacoltura. I primi utilizzi di microrganismi, in particolare di *Arthrospira platensis* (Gomont, 1892), sono storicamente noti sin dal sedicesimo secolo; fino ad oggi in cui rappresenta il cianobatterio più utilizzato per fini commerciali (Becker, 2007). Gli habitat acquatici in generale, e in particolare l'oceano rappresentano, quindi, un ricco e inesplorato mondo di composti biologicamente attivi (primari e secondari), e anche di nuove vie biochimiche quasi sconosciute, che potrebbe essere importanti per lo sviluppo scientifico applicato.

2. Scopo della tesi

Le attività di ricerca svolte nel corso degli anni di dottorato fanno parte del campo di studio dei metaboliti primari e secondari di origine marina; gli studi durante la mia ricerca hanno permesso di acquisire informazioni sull'ecologia e la chimica di specie di invertebrati marini appartenenti al *phylum* Porifera, tra cui *Raspaciona aculeata*, spugna mediterranea rossa, della famiglia Raspailiidae e in grado di offrire interessanti studi per le indagini chimiche (Fernández et al., 2000). Inoltre, durante le mie ricerche, si è pensato anche indagare su altre risorse di composti biologicamente attivi come cianobatteri che producono una vasta gamma di metaboliti primari: proteine, carboidrati e lipidi. In particolare, si è studiata la biochimica e l'ecologia della specie *Arthrospira platensis*, una specie di cianobatterio tipica di acque alcaline e salmastre, molto interessante per i suoi composti naturali (Costa et al., 2017) ed usato per secoli come integratore alimentare per la dieta umana (Ciferri, 1983).

Al fine di valutare il potenziale del sistema di coltura in sistemi costieri e salini, è stata studiata la sua adattabilità a diversi mezzi salini, quantificando la capacità di sintetizzare biomolecole efficienti che possono essere utili in seguito in termini nutraceutici. L'obiettivo principale del mio dottorato è stato "esplorare" ecologicamente diverse specie di organismi acquatici adattati all'ambiente marino e caratterizzarne i composti chimici con una possibile applicazione biotecnologica. La prima parte della ricerca si è incentrata su *Raspaciona aculeata*, una specie di porifero presente nella Riserva Naturale di Capo Peloro, Messina, Sicilia; considerata interessante dal punto di vista del metabolismo secondario. Nell'ambito della ricerca svolta durante la prima parte del dottorato, per studiare l'ecologia di questa specie è stato proposto l'uso di metodi di immersione SCUBA per l'osservazione diretta delle specie "bersaglio", quindi, per lo studio ecologico e il campionamento; da cui successivamente in laboratorio sono stati estratti, isolati e caratterizzati metaboliti secondari di possibile interesse. La disponibilità delle più recenti tecniche cromatografiche per l'isolamento e la purificazione, mediante tecniche spettroscopiche di indagine strutturale, tra cui la spettroscopia di massa, e la risonanza magnetica nucleare (NMR), hanno permesso di isolare e caratterizzare diversi composti, molti già conosciuti ma anche di purificarne uno sconosciuto fino ad ora, con probabili applicazioni interessanti. Lo studio chimico dei metaboliti secondari è stato effettuato nel corso di un soggiorno Erasmus di tre mesi presso il Dipartimento di Chimica Organica, Facoltà Scienze Marine ed Ambientali, dell'Università di Cadice, in Spagna, con il supporto del Prof.sa María Jesús Ortega, e concludendo la purificazione di alcuni metaboliti presso l'Università di Messina. Durante la seconda parte della mia ricerca di Dottorato le indagini ecologiche e biochimiche sono state condotte su *Arthrospira platensis*, specie di cianobatterio presente nel "Parco Nazionale della Doñana", Andalusia, Spagna.

Al fine di studiare l'ecologia e la biochimica di questa specie, è stato proposto l'utilizzo di metodiche di coltura con mezzi a differente salinità e pH sperimentando le capacità di adattamento del cianobatterio e il potenziale biochimico. La disponibilità di moderne tecniche di analisi di macromolecole primarie quali proteine, carboidrati e lipidi ha permesso di studiare la possibile variazione dei componenti biochimici come risultato di adattamento causato dal terreno di coltura con diversa salinità e pH. La ricerca ecologica su *Arthrospira platensis* è stata effettuata con quattro terreni di coltura con salinità crescente, dal 12,11 ‰ a un massimo di 34,51 ‰ ottenendo risultati di sopravvivenza per tutte le colture. L'attività di ricerca è stata condotta nel corso di un'esperienza Erasmus interdisciplinare di sei mesi presso il Dipartimento di Biologia presso l'Università di Cadice, Spagna utilizzando un protocollo comune, con il supporto della Dott.sa Ana Bartual Magro e della Dott.sa Carmen Garrido al fine di ampliare le conoscenze sulle tecniche di coltura algale, estrazione e analisi biochimiche. Tutti i risultati ottenuti durante il dottorato sono stati oggetto di presentazioni a conferenze e saranno anche oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche.

3. Capitolo I: Caratteristiche degli organismi studiati

3.1.1. *Arthrospira platensis* (Gomont, 1892)

Il genere *Arthrospira*, che comprende almeno 38 specie, si riferisce a un cianobatterio, phylum Cyanophyta. Due specie di *Arthrospira*, *A. platensis* e *A. maxima* (Setchell and N.L. Gardner, 1917) rappresentano le più esplorate scientificamente (Ciferri, 1983 Mosulishvili et al., 2002), e utilizzate per la produzione di biomassa. La tipica morfologia di *Arthrospira* è caratterizzata dai suoi "tricoli" a spirale (Fig. 1), circondati da una guaina che costituisce il filamento a spirale che li caratterizza. Le caratteristiche morfologiche, quali il grado di spirale e la presenza o no di setti tra le cellule, sono importanti criteri tassonomici per l'identificazione delle specie (Lewin, 1980).

Può anche presentarsi con morfologie anomale, con forme irregolarmente curve e anche lineari, in particolare nelle colture di laboratorio e industriali (Wang and Zhao, 2005; Ciferri, 1983). Dopo il primo isolamento da parte di Turpin nel 1827 in un fiume di acqua dolce (Turpin, 1827) specie di *Arthrospira* (ex *Spirulina*) sono state trovate in una varietà di ambienti come terra, sabbia, paludi, acqua salmastra, mare e acqua dolce. *Arthrospira* è un cianobatterio che forma filamenti blu-verdi composti da cellule cilindriche disposte in una forma non ramificata, in tricomi elicoidali. I tricomi sono, in generale, lunghi pochi millimetri, sebbene in certe condizioni i tricomi di *A. platensis* sono stati osservati fino a 20 mm (Van Eykelenburg, 1979).

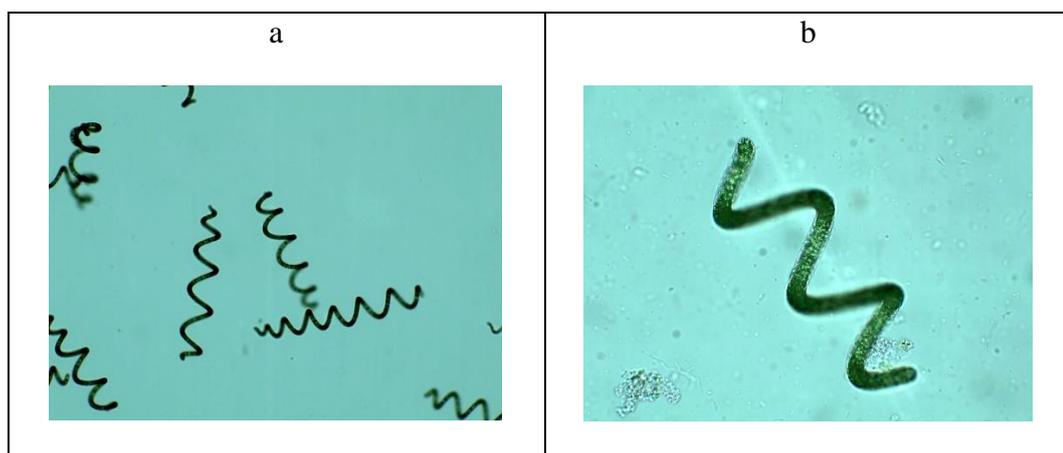


Figura 1: Microfotografie che mostrano la morfologia tipica delle colonie di *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, a) scala 200 µm, X 100; b) scala 100 µm, X 200

Il ciclo di vita di *A. platensis* in coltura di laboratorio è abbastanza semplice (Fig. 2). Un tricoma maturo viene spezzato in più pezzi attraverso la formazione di cellule specializzate, i necridi, che subendo la lisi, danno vita a dischi biconcavi di separazione. La frammentazione del tricoma nei necridi produce catene scorrevoli corte, da 2 a 4 cellule e ormoni, che si allontanano dal filamento genitore per dare origine a un nuovo tricoma. Le cellule nell'ormogonio perdono parti attaccate delle cellule necridiali, diventando arrotondate alle estremità distali e con un ispessimento delle pareti.

Durante questo processo, il citoplasma appare meno granulato e le cellule assumono un colore blu-verde pallido. Il numero di cellule nell'ormogonio aumenta con la fissione cellulare mentre il citoplasma si granula e le cellule mostrano un colore blu-verde brillante. Con questo processo i tricomi aumentano di lunghezza e assumono la tipica forma elicoidale (Ciferri, 1983).

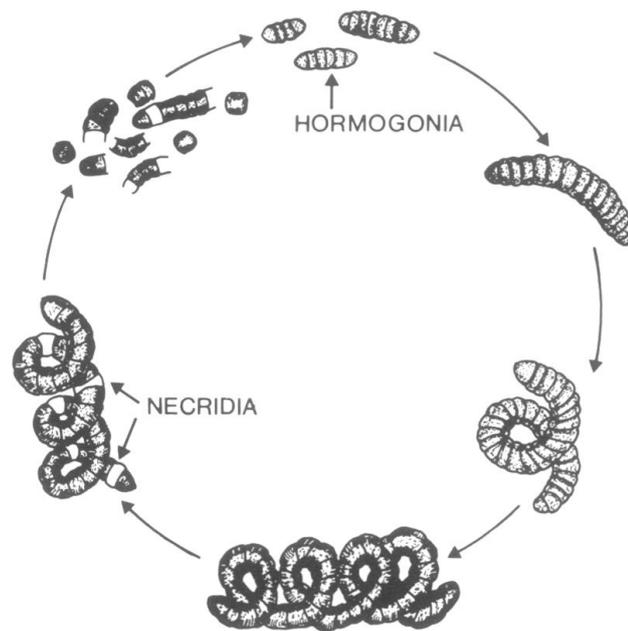


Figura 2: Rappresentazione grafica del ciclo di vita del genere *Sirulina* (*Arthrospira*) (Ciferri, 1983)

Questo cianobatterio è stato utilizzato come fonte di varie sostanze nutrienti fin dai tempi antichi ed è noto come super-alimento a causa della diversità e la alta concentrazione di contenuto proteico (Becker, 1978). È facilmente digeribile e assorbito nel corpo umano perché la sua membrana cellulare non contiene cellulosa. In peso secco la biomassa è composta per più del 60% di proteine, il rimanente è costituito da carboidrati e acidi grassi. *Arthrospira* ha anche un relativo basso contenuto di acidi nucleici, pur essendo ricca di pigmenti, vitamine e minerali (Henrikson, 2009).

Il crescente potenziale scientifico di *Arthrospira* e quello clinico riguardo i benefici nutrizionali e della salute, hanno spinto allo sviluppo di varie applicazioni alimentari, come pasta, zuppa istantanea, cereali, crackers, patatine di mais, popcorn, spuntini, semifreddi, muffin, ciambelle, condimenti per insalata, pasticceria, succhi di frutta e perfino birre speciali (Gershwin and Belay, 2007). La Food and Drug Administration (FDA) ha attribuito a questo cianobatterio lo *status* generalmente riconosciuto come sicuro (GRAS) (US FDA, 2003).

Questo *status* consente ad *Arthrospira* di essere legalmente commercializzata come integratore alimentare o come ingrediente bioattivo in alimenti e bevande funzionali (FDA statunitense, 2012). Altre applicazioni della biomassa di *Arthrospira* o dei suoi metaboliti bioattivi includono mangimi per animali, coloranti alimentari, cosmetici e biomolecole purificate (Slocombe and Benemann 2016). Diverse aziende hanno prodotto e commercializzato *Arthrospira*, comunemente chiamata spirulina per l'alimentazione umana. I maggiori produttori al mondo si trovano negli Stati Uniti e in Asia. Negli Stati Uniti, la produzione su larga scala è iniziata circa 40 anni presso la Earthrise (Irvine, CA) e la Cyanotech Corporation (Kailua-Kona, Hawaii). Cinque anni dopo, altri paesi hanno avviato la produzione di spirulina, in particolare l'India (Slocombe et al., 2016).

Nei primi anni 2000, la Cina è diventata il principale produttore mondiale di microalghe, che ad oggi rappresenta oltre il 60% della produzione totale. Il mercato mondiale della spirulina è cresciuto con un tasso di crescita annuo del 15% e attualmente la sua produzione è di circa 15.000 tonnellate (Costa et al., 2017). La biomassa prodotta è stata applicata alla produzione di polvere, compresse, capsule e bevande (Morais et al., 2015). *Arthrospira platensis* vive naturalmente adattata all'ambiente dei laghi alcalini (Vonshak, 1997).

Recentemente, la vitalità della coltura in acqua di mare modificata su scala pilota è stata studiata utilizzando acqua di mare modificata, ma sono stati osservati bassi tassi di crescita e di produttività (Jarisoa et al., 2003).

Pertanto, vale la pena indagare sulle condizioni di coltura necessarie per ottenere un'adeguata produttività e un contenuto proteico sfruttabile nell'acqua di mare. Il contenuto proteico in *Arthrospira platensis* varia tra il 60% e il 70% del suo peso secco. Analisi recenti hanno confermato che le proteine rappresentano oltre il 60% e, in alcuni campioni, anche il 70% del peso secco, molto più alto di quello delle alghe unicellulari e di altri cianobatteri (Ciferri, 1983). Per quanto riguarda il contenuto di carboidrati, rappresentanti dal 15 al 20% del peso secco (Santillan, 1982), sono costituiti da polisaccaridi ramificati, composti di carboidrati semplici come glucosio, fruttosio e saccarosio; si trovano anche polioli, come glicerolo, mannitolo e sorbitolo (Belay, 2002). La parte assimilabile di questi composti è caratterizzata da polimeri come glucosani, ramnosi e glicogeno (Van Eykelenburg, 1978).

Alcuni degli ingredienti più popolari applicati nei nutri-cosmetici (Tabella 1) (Costa et al., 2017) riguardano combinazioni di micronutrienti, vitamine, acidi grassi polinsaturi (tra cui acido linoleico e acido γ -linolenico), amminoacidi, carotenoidi e polifenoli. Tutti Si possono trovare in quantità variabili nel genere *Arthrospira* (ex *Spirulina*), ad eccezione della Vitamina D.

Le forme efficaci per la somministrazione orale di biomassa o di estratti di spirulina sono comuni per altri nutri-cosmetici, compresi i prodotti di mercato o per ricette come zuppe, yogurt, marmellate, cioccolato, cereali, barrette, bevande, capsule o compresse (Carrie, 2008; Taeymans et al., Moro, 2013).

Tabella 1: Composti presenti in forma naturale in *Arthrospira* (ex *Spirulina*) (eccetto Vitamina D) con funzioni nutri-cosmetiche, da Costa et al., 2017

Ingredienti	Funzioni nella pelle
Vitamina A	<ul style="list-style-type: none"> - Aiuto nella proliferazione di cheratinociti e fibroblasti - Induce la biosintesi del collagene e riduce l'espressione di MMP 1 - Previene i danni indotti dai raggi UV
Vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> - Protegge la pelle mediante una donazione sequenziale di elettroni per neutralizzare i radicali liberi - Promuove la guarigione delle ferite - Migliora l'idratazione della pelle - Le vitamine C ed E agiscono sinergicamente contro i danni indotti dagli UV riducendo l'apoptosi cellulare
Vitamina D	<ul style="list-style-type: none"> - Migliora l'immunità innata
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> - Mostra attività anti-infiammatoria - Protegge gli acidi grassi polinsaturi nelle membrane cellulari dall'ossidazione - Modula la trasduzione del segnale e l'espressione genica - Protegge dalla fotocarcinogenesi
Rame	<ul style="list-style-type: none"> - Esibisce una capacità antiossidante - Induce la maturazione del collagene
Selenio	<ul style="list-style-type: none"> - Protegge la pelle dallo stress ossidativo generato dai raggi UV
Zinco	<ul style="list-style-type: none"> - Esibisce la funzione antimicrobica
Carotenoidi	<ul style="list-style-type: none"> - Previene il danno al DNA indotto da UVR - Migliora il sistema immunitario - Evita la sensibilità all'eritema indotto da UV
Acidi grassi polinsaturi	<ul style="list-style-type: none"> - Contribuisce alla permeabilità della barriera nell'omeostasi - Regola l'infiammazione e l'immunità cutanea

Per quanto riguarda i pigmenti, il β -carotene rappresenta l'80% dei carotenoidi presenti in *A. platensis*, il resto è composto da un complesso ricco di antiossidanti di almeno dieci altri carotenoidi. Gli altri principali carotenoidi sono la ficoxantina e la criptoxantina (Belay, 2002). In un chilogrammo di biomassa secca sono compresi tra 700 e 1700 mg di β -carotene, che viene convertito in vitamina A nei mammiferi. L'assunzione giornaliera di 2,5 g di *A. platensis* sarebbe sufficiente a fornire 3,5 mg di β -carotene, corrispondenti al 115% del valore giornaliero raccomandato di vitamina A (Henrikson, 2009). Inoltre, i carotenoidi vengono applicati nell'industria alimentare e farmaceutica per le loro capacità di pigmentazione e proprietà antiossidanti (Morais et al., 2015).

3.1.2 *Raspaciona aculeata* (Johnston, 1842)

Raspaciona aculeata è presente in tutto il Mar Mediterraneo e nell'Atlantico orientale tropicale, dalle Azzorre alle Canarie (Bergbauer and Humberg, 2000). È stata segnalata anche nell'Atlantico nord-orientale, dal Portogallo alla Galizia, nella costa orientale dell'Inghilterra (una tipica località in cui la specie è stata descritta per la prima volta) e nella regione di Roscoff nel nord della Bretagna (Le Granché and Vacelet, 2014). Questa spugna vive in fondali rocciosi ben illuminati, dai primi metri sotto la superficie a profondità di circa 40 m. È una specie ben presente nei biotopi coralligeni (Gilli and Maillard, 2000). Possiede una colorazione rosso vivo, si presenta principalmente sotto forma di lastre incrostanti di alcuni millimetri di spessore (Fig. 3). A volte può assumere una forma più carnosa, più o meno lobata, fino a 2 cm di spessore. La sua superficie è ricca di numerose verruche coniche. Queste escrescenze, alte solo 2-3 mm, sono in realtà grandi colonne di spicole che ne perforano la superficie e gli danno questo aspetto ispido (Le Granché and Vacelet, 2014).



Figura 4: *Raspaciona aculeata* fotografata nel lago Faro, Messina, Italia

La struttura morfologica di questa specie è molto caratteristica, infatti l'osservazione al microscopio mostra che gli stili formano colonne piumate disposte obliquamente e quindi mantenute da una piccola quantità di spugna. *Raspaciona aculeata* può essere confusa con altre spugne incrostanti dello stesso colore:

- *Crambe crambe* (Schmidt, 1862): una specie più lobata che presenta canali di espirazione. Possiede una colorazione più arancione;
- *Spirastrella cunctatrix* (Schmidt, 1868): simile alla specie *Crambe crambe*;
- *Phorbas topsenti* (Vacelet and Pérez, 2008): consistenza più carnosa, presenza di pori inalatori e ossicini elevati.

Tuttavia, in queste tre specie l'assenza di verruche sulla superficie le differenzia da *Raspaciona aculeata*, che, visibilmente, si presenta con una superficie più pelosa, facendo una grande differenza (Hooper and Van Soest, 2002). Le spugne sono animali filtranti che si nutrono di microparticelle: batteri, alghe unicellulari, rifiuti organici, generalmente non superiori a 3 micrometri.

Il flusso d'acqua necessario è creato dal movimento di specifiche cellule ciliate delle spugne: i coanociti. La riproduzione può essere sessuale o asessuale.

-Sessuale: con uova e sperma; ciò che risulta alla nascita è una larva ciliata che può nuotare e che aderisce rapidamente al fondo per dare origine a una nuova spugna. Le spugne sono generalmente ermafrodite, l'emissione di gameti maschili e femminili è a volte spettacolare, ma raramente viene osservata. *R. aculeata* è vivipara. L'oogenesi si verifica una volta all'anno, principalmente dalla fine dell'estate fino all'inizio dell'autunno, durante i 4 o 5 mesi quando l'acqua è più calda.

-Asessuale: attraverso gemmazione o frammenti di talee che si staccano dalla spugna madre per spostarsi e depositarsi altrove. Sebbene esista, questa riproduzione è relativamente secondaria (Riesgo Gil, 2007).

Le spugne hanno una forte capacità rigenerativa. Le spicole di questa spugna mostrano una grande variabilità. Gli acantociti (165-260 µm) possono essere dritti o curvi, alcuni completamente lisci, altri più o meno ricoperti di spine. Gli stili, aghi a punta lunga (1100-3000 µm) sono anche molto variabili, dritti o più o meno curvi, alcuni addirittura presentano un rigonfiamento (Vacelet, 1961; Johnston, 1842). I risultati recenti, compresi i dati molecolari, portano alla riclassificazione dei Raspailiidae agli Axinelidi, dove erano collocati in precedenza (Van Soest et al., 2018). Le spugne sono state considerate una miniera d'oro per chimici e biologi. Sono stati isolati più di 20.000 composti da fonti marine con centinaia di nuovi composti che vengono scoperti ogni anno, in relazione alla diversità dei loro metaboliti secondari, studiando il loro metabolismo e la possibilità di produrre sostanze di interesse applicativo. Rapporti sull'isolamento di prodotti naturali da spugne marine sono stati pubblicati a partire dal 1950 e le attività di ricerca su questo argomento hanno continuato ad aumentare (Becker et al., 2014).

Molti di questi prodotti naturali presentano interessanti potenzialità biomediche, rilevanza farmaceutica e varie applicazioni, oltre ad aumentare i componenti di sostanze chimiche bioattive farmacologicamente importanti. Le spugne marine sono una ricca fonte di composti farmacologicamente attivi che possono essere utilizzati potenzialmente come medicinali per curare malattie umane, e di composti bioattivi isolati già ampiamente studiati (Joshi and Kaur, 2015). *Raspaciona aculeata* è una spugna mediterranea dall'aspetto incrostante, di colore rosso, appartenente alla famiglia dei Raspailiidae e offre interessanti sviluppi per la ricerca chimica (Fernández et al., 2000). Nel 1990, da estratti liposolubili di *R. aculeata* si è isolata la prima grande rappresentazione di un nuovo triterpenoide, la raspacionina (Cimino et al., 1990), caratterizzata da due sistemi triterpeni collegate da un ponte di etilene in posizione equatoriale. Questa spugna sembra mostrare attività allelochimiche poiché è completamente priva di organismi epibiotici. La struttura della raspacionina è stata suggerita da un'analisi dei dati spettrali e relativa stereochimica assicurata mediante diffrazione ai raggi X (Puliti et al., 1991) ma la stereochimica assoluta non è stata determinata fino al 1993 con l'applicazione di RMN ad alto campo con metodo Mosher e con esteri α -metossi- α -trifluorometilfenilacetici (MTPA) (Cimino et al., 1993a). Nel 1992 e 1994 vennero isolati altri metaboliti polieterici, come la raspacionina A (Cimino et al., 1992), raspacionina B (Cimino et al., 1993b) e altri otto componenti minori (Cimino et al., 1994), tutti basati sullo stesso scheletro triterpenoide del composto raspacionina. Le principali differenze tra la struttura di raspacionina e raspacionina A sono l'assenza del sistema di eso-metilene-C10-C28 e la presenza nel sistema di perhidrobenzooxepina di un ossigeno tra C-4 e C-1, considerando l'origine biogenetica del precursore squalene, induce un cambiamento 1,2 del metile C-1 a C-11 e porta ad una riorganizzazione dello scheletro dei triterpenoidi (Fernandez et al., 2000).

Questo è stato inequivocabilmente determinato da studi di diffrazione dei raggi X del suo derivato 21-Deacetyl-21-oxo-raspacionina. La struttura e stereochimica della raspacionina B è stata chiarita con metodi spettrali, principalmente 1D e 2D RMN, suggerendo una struttura relazionata con raspacionina mostrando però due gruppi di chetone in C-4 e C-21. Questo metabolita è anche caratterizzato dalla presenza di un anello ciclopropano come stabilito dagli esperimenti HOHAHA e HMBC. Per quanto riguarda le raspacionine inferiori, le loro strutture mostrano funzionalizzazione differente nei carboni 4, 10, 15 e 21 (Cimino et al., 1994). La loro caratterizzazione completa con RMN ha portato alla razionalizzazione degli effetti di determinati sostituenti negli spostamenti chimici degli atomi, soprattutto nel sistema di perhydrobenzooxepina. È noto che i triterpeni isolati espongono una citotossicità contro una varietà di cellule tumorali, di conseguenza potrebbero essere utilizzati in esperimenti farmaceutici per valutare l'efficacia antitumorale in modelli animali preclinici (Cimino et al., 1993b; Cimino et al., 1994). Nonostante il gran numero di composti isolati da spugne marine come *Raspaciona aculeata* e le attività biologiche attribuite a molti di loro, quelli che sono stati commercializzati o in fase di sviluppo sono molto pochi.

4. Estrazione e purificazione di metaboliti secondari in *Raspaciona aculeata*

4.1. Materiali e metodi

4.1.1 Sito d'indagine: Lago Faro, RNO di Capo Peloro, Italia

Il lago di Faro, sito d'indagine nella prima parte del mio dottorato, è situato lungo le coste settentrionali della città di Messina, e fa parte del complesso di stagni salmastri di Capo Peloro (Fig. 4). Si è originato dalla chiusura di un tratto di mare ad opera di cordoni litorali, e possiede peculiarità floristiche e faunistiche che lo rendono un ecosistema speciale (Licata, 2004).

Nonostante la sua estensione di soli 263.600 m², è il bacino costiero più profondo in Italia, infatti nella parte orientale raggiunge i 29 m, mentre nella parte occidentale il fondo non supera i 3,5 metri di profondità. Il lago di Faro è comunicante con il Mar Tirreno attraverso un canale detto “Canale degli Inglesi”, e con il Mar Ionio tramite il canale artificiale “Canale di Faro”. Insieme al lago di Ganzirri, il lago di Faro è oggetto di tutela ambientale, in quanto compreso nella Riserva Naturale Orientata (“Laguna di Capo Peloro”), ed è inserito tra le aree umide mondiali protette dalla Convenzione Internazionale di Ramsar. Gli stagni costieri salmastri che si trovano lungo le coste del Mar Mediterraneo, generalmente sono caratterizzati da basso idrodinamismo, che quindi non rappresenta una significativa forzante sulla zonazione bentonica; la salinità è influenzata dal tasso di evaporazione, che può differenziarsi stagionalmente, o dall’apporto di acque dolci; la temperatura è un fattore estremamente variabile; l’estensione dei laghi generalmente è ampia rispetto alla profondità e agevola il riscaldamento repentino della colonna d’acqua contrastando la formazione di termoclini.

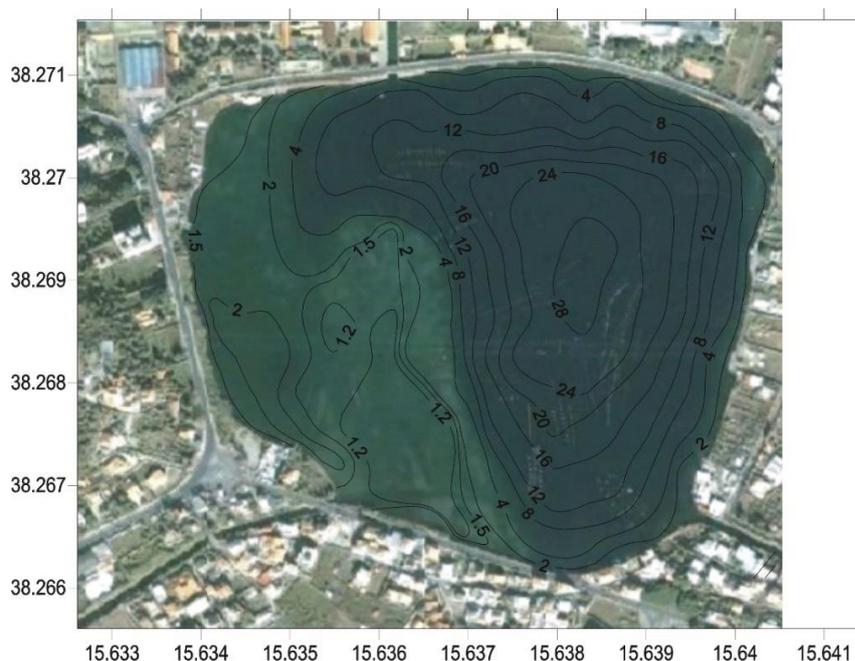


Figura 4: Lago di Faro e relativo andamento batimetrico.

Il lago di Faro è un caso particolare, in quanto pur essendo un bacino costiero, presenta caratteristiche che privilegiano la profondità rispetto all'estensione (Fig. 5); questo comporta che le acque profonde non entrano mai in circolazione, instaurando un caratteristico doppio regime, ossico in superficie con una biomassa eterotrofa predominante nel particellato (Leonardi et al., 2009), e anossico sul fondo dove è presente idrogeno-solfurato e una comunità di solfo batteri con intensa attività chemo-autotrofa (Saccà et al., 2008).

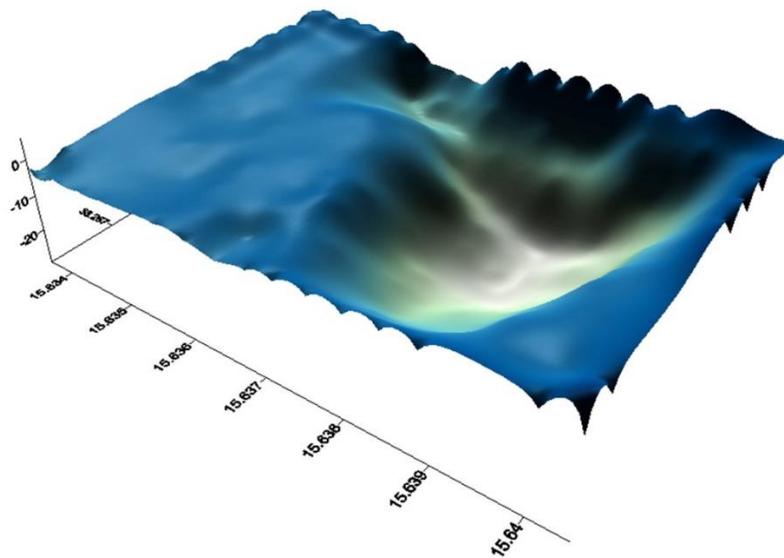


Figura 5: Ricostruzione batimetrica tridimensionale del lago di Faro.

Il lago Di Faro, è stato oggetto anche in passato di particolari e sistematiche ricerche sia idrologiche, sia microbiologiche (Genovese, 1962; Genovese, 1963) in relazione a tale struttura geomorfologica si ha nel lago di Faro, in condizioni normali, un regime meromittico, con acque a pH positivo in superficie e marcatamente negativo a fondo. Gli strati più bassi delle acque e il fango sono caratterizzati altresì dalla presenza di quantità variabili di idrogeno solforato. Il lago di Faro ha una salinità media di circa 35 ‰, con valori massimi dello stesso ordine di quelli che si riscontrano a mare (Abbruzzese and Genovese, 1952).

Nel lago di Faro la distribuzione dei sali nutritivi è in relazione con la presenza di idrogeno solforato negli strati inferiori delle acque. I fosfati di solito aumentano con l'aumentare della profondità, nello strato ossigenato delle acque possono a volte mancare, ma sono abbondantissimi nelle acque contenenti idrogeno solforato, raggiungendo al fondo valori superiori ai 350 mg/m³. Nel lago Faro i nitriti e i nitrati sono invece presenti nella fascia ossigenata delle acque. L'ammoniaca aumenta progressivamente con l'aumentare della profondità nello strato contenente idrogeno solforato, e diventa abbondantissima nelle acque in prossimità del fondo. Particolare interesse presenta il brusco aumento in sali nutritivi che si verifica a volte a profondità intermedie, comprese fra i 10 m e i 15 m, rispetto alle quote immediatamente adiacenti. Da rilevare che lo strato di separazione fra la zona superiore contenente ossigeno e quella inferiore contenente idrogeno solforato (acqua rossa) è localizzato alla quota di 12-13 m. L'esistenza di zone ad elevata produttività a livello del chemoclinio è caratteristica dei laghi meromittici (Tonolli, 1964) ed in particolare nel lago di Faro.

La presenza dell'acqua rossa batterica potrebbe essere considerata pertanto come un indice dell'accentuato trofismo di questi strati. Per le caratteristiche geomorfologiche, che determinano soprattutto un continuo apporto di materiale terrigeno ed un notevole accumulo di sostanza organica sul fondo, il lago di Faro presenta di solito un maggiore contenuto in sali nutritivi rispetto al mare (Vatova, 1962; D'Ancona and Battaglia, 1962), inoltre è sede di un'intensa attività microbica mineralizzante. Il lago presenta preziosi biotopi per la straordinaria varietà di microrganismi e specie animali e vegetali, alcune delle quali sono strettamente endemiche; come ad esempio *Raspaciona aculeata*, una spugna rossa incrostante che ha caratteristiche adeguate allo studio chimico ed ecologico della mia ricerca.

4.1.2 Rilevamenti sul campo

Le operazioni di monitoraggio e campionamento effettuate ai fini di questo studio sono il risultato di una serie di indagini condotte nel periodo tra ottobre 2015 e giugno 2017, ai fini della ricerca ecologica e del campionamento nel lago di Faro. Durante questa indagine, è stato possibile valutare le specie utili in termini ecologici e dal punto di vista biochimico. Nel lago di Faro, la scelta di utilizzare un metodo diretto (esplorazione subacquea) dipende dalla topografia del fondo marino, dall'area di studio e dalle specie studiate; l'applicazione di metodi diretti è necessaria per la maggior parte delle indagini scientifiche basate su studi ecologici e prelievamento di campioni, rendendoli prontamente disponibili per la ricerca di laboratorio (Krebs, 1989). Inoltre, l'economicità è anche un altro vantaggio del metodo, che dalla letteratura sembra essere la tecnica più diffusa (Giacobbe et al., 2017; Spinelli et al., 2017). Con le informazioni ottenute utilizzando i metodi di esplorazione subacquea, è più facile prendere decisioni e progettare indagini più complesse, per valutare con precisione la presenza di specie e la loro abbondanza (Giacobbe et al., 2016). La procedura di campionamento è stata concentrata, mediante immersioni, all'interno di aree campione precedentemente stabilite, al fine di identificare le specie bersaglio, valutarne l'abbondanza, campionarle e trasportarle in laboratorio per le analisi chimiche. Durante i primi sei mesi, la ricerca scientifica nel lago è stata principalmente finalizzata all'identificazione delle specie target, alla identificazione tassonomica. La ricerca scientifica era orientata principalmente all'identificazione e studio di specie appartenenti al *phylum* Porifera; ogni campione è stato fotografato *in situ* utilizzando una fotocamera SONY RX 100 IV dotata di uno scafandro subacqueo NAUTICAM, al fine di rilevare la colorazione *in vivo*, utile per l'identificazione tassonomica e per descrivere le caratteristiche dell'habitat. La posizione geografica di ciascun campione è stata determinata tramite un GPS portatile integrato con un sistema di informazione geografica GIS.

Allo stesso tempo, i parametri chimico-fisici dell'acqua sono stati analizzati utilizzando una sonda multi-parametrica. I campioni sono stati rinvenuti a profondità comprese tra 1,5 e 10 m, e una volta prelevati, sono stati immediatamente trasferiti in una scatola termica contenente acqua proveniente dal lago. Si è preferito raccogliere solo pochi esemplari delle aree in cui sono state trovate le spugne, per non incidere eccessivamente sulle popolazioni di poriferi del lago, oggetti di protezione nella Riserva Naturale Orientata.

4.1.3 Identificazione tassonomica

L'identificazione della specie è stato il primo passo necessario per il successivo studio chimico. In generale, per l'identificazione tassonomica di un porifero, gli elementi che costituiscono il suo scheletro vengono analizzati al microscopio: le spicole o le fibre di spugna. È utile per molte specie cospicue che popolano il fondo del Mediterraneo, insieme con determinazione laboratorio, l'utilizzo di fotografie scattate *in situ* per l'identificazione delle caratteristiche macroscopiche (Boury-Esnault and Ruetzler, 1997). Il primo elemento morfologico osservato è la forma, utile per dividere le spugne in quattro grandi gruppi: perforanti, incrostanti, massicce ed eretti. Oltre alla forma, può essere utile osservare qualsiasi sporgenza presente sulla superficie della spugna, come tubicoli e creste. Inoltre, in questo caso, l'esistenza di alcuni elementi morfologici limita il campo delle possibili scelte tassonomiche. Il colore è un'altra caratteristica che viene presa in considerazione, anche se è molto raramente discriminata (De Vos et al., 1991). Sebbene l'osservazione diretta e i metodi di fotografia subacquea possono essere utili per l'identificazione preliminare delle specie, l'analisi microscopica delle fibre di spicole o fibre di spugna è una certezza per la determinazione tassonomica (Hartman, 1982). Per questo motivo, tutti i campioni prelevati durante le prime fasi di studio sono stati conservati in alcool 75% e spediti presso l'Università degli Studi di Genova,

Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, per l'identificazione tassonomica, effettuata dal Dott. Marco Bertolino, specialista tassonomico di poriferi del Mediterraneo. La determinazione delle caratteristiche strutturali delle spugne ha permesso l'identificazione di un totale di 9 specie di poriferi, tra cui 1 specie esotica. Successivamente, è stata condotta una ricerca bibliografica per identificare le specie più "interessanti" in relazione al metabolismo secondario e, quindi, le possibilità di estrarre metaboliti utili per la mia ricerca. Lo studio chimico successivo è stato orientato principalmente verso l'utilizzo di *Raspaciona aculeata*, una specie appartenente al phylum Porifera; e considerata piuttosto interessante dal punto di vista del metabolismo secondario e dei suoi composti. Alcuni dei campioni sono stati conservati nel congelatore ad una temperatura di -18 ° C per successive analisi chimiche.

4.1.4 Liofilizzazione

La liofilizzazione dei campioni è stata necessaria per la conservazione dei campioni e per il trasporto dall'Italia alla Spagna, presso l'Università di Cadice, dove sono state effettuate le successive analisi di estrazione, isolamento e caratterizzazione chimica delle molecole. Dopo un'accurata ricerca bibliografica e per la necessità di quantità di materiale utile alle successive analisi chimiche, si è deciso di utilizzare solo una delle 9 specie precedentemente identificate, per il processo di liofilizzazione, al fine di ottenere un minimo di 20 g di materiale secco della spugna. Il processo di liofilizzazione è stato condotto nei laboratori della sezione SASTAS del Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali, con il supporto del Dott. Andrea Salvo. I campioni di spugna sono stati macinati, omogeneizzati e successivamente raffreddati a -80°C durante la notte. Il giorno successivo, sono stati versati in bicchieri di vetro e liofilizzati con un liofilizzatore Alpha 2-4 LD plus, marca CHRIST, per due giorni fino alla perdita totale di acqua.

In questo modo, è stato possibile ottenere campioni correttamente liofilizzati. La liofilizzazione è un processo tecnologico che consente l'eliminazione dell'acqua da una sostanza organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della sostanza stessa; realizzare un materiale liofilizzato significa renderlo rapidamente solubile in acqua. Il metodo include fundamentalmente due trasformazioni fisiche: la surgelazione e la sublimazione. Il principio del metodo prevede l'applicazione del calore al campione surgelato mantenuto sottovuoto; l'acqua contenuta nel prodotto e segregata sotto forma di ghiaccio, viene estratta direttamente come vapore per sublimazione. Il vapore acqueo estratto viene catturato per congelamento su serpentine fredde dette condensatori; i gas incondensabili vengono aspirati ed eliminati dalla pompa da vuoto. Il processo viene condotto in condizioni di temperatura e pressione accuratamente controllate per evitare danni alla struttura del prodotto, così che la matrice originale sia quasi perfettamente ripristinabile quando, al momento dell'utilizzo, si voglia procedere alla reidratazione (Wiley and Sons, 1992). Il processo si svolge in tre fasi successive: Congelamento, essiccamento primario ed essiccamento secondario. A processo ultimato, cioè alla fine dell'essiccamento secondario è stato necessario "rompere il vuoto" cioè riportare il materiale alla pressione atmosferica, introducendo nella camera di essiccamento aria o azoto, proteggendolo così dall'ossidazione.

I campioni liofilizzati sono stati collocati in flaconcini e conservati in un congelatore a -18°C. Il passo successivo è stato il confezionamento di campioni e la spedizione all'Università di Cadice in Spagna, dove sono state effettuate l'estrazione, l'isolamento e la caratterizzazione chimica delle molecole, con il supporto della Prof.ssa María Jesús Ortega, Dipartimento di Chimica Organica, Facoltà di Scienze Marine e Ambientali. Inoltre, 4 grammi di spugna liofilizzata (*Raspaciona aculeata*), sono stati divisi in due aliquote da 2 grammi, poste in due falcon da 50 ml e conservate nel laboratorio del

Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali per ulteriori ricerche, successive al periodo di soggiorno a Cadice.

4.1.5 Estrazione con solventi organici

I composti organici, di origine naturale si trovano spesso miscelati ad altre sostanze dalle quali devono essere separati. Nel caso, quindi, di sostanze naturali presenti in una data matrice biologica, per ottenere il composto allo stato puro, è necessario estrarlo dalla matrice, separarlo e purificarlo dagli altri composti eventualmente presenti. È stato quindi necessario utilizzare alcune tecniche di estrazione con solventi organici per separare i composti contenuti nelle miscele dei campioni liofilizzati. Queste tecniche sfruttano le differenti proprietà chimico-fisiche dei componenti della miscela per separarli. Tale procedura di estrazione con solventi organici è stata effettuata durante il periodo di mobilità ERASMUS (da aprile 2016 a luglio 2016) presso i laboratori di Chimica Organica dell'Università di Cadice con il supporto della Prof.ssa Maria Jesus Ortega. Inoltre, è stata effettuata un'altra procedura di estrazione successivamente al periodo di mobilità ERASMUS, presso l'Università di Messina, Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali.

L'estrazione liquido-liquido è stata la metodica di laboratorio utilizzata per il passaggio del soluto da un solvente ad un altro solvente allo scopo di ottenere composti più o meno puri dai campioni liofilizzati di *Raspaciona aculeata*.

Per ogni campione è stata eseguita una prima estrazione con metanolo (MeOH) o con una soluzione metanolo/cloroformio (MeOH/CHCl₃) a concentrazione 1:1; successivamente il prodotto estratto è stato filtrato e posto in un distillatore (Fig. 6).

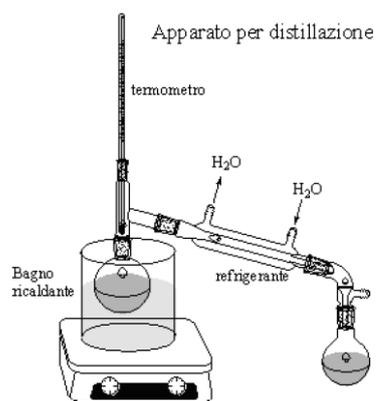


Figura 6: Schema di un apparato per distillazione

La distillazione è una tecnica che permette di separare i diversi componenti di una miscela liquida sfruttando il loro diverso punto di ebollizione; il distillato ottenuto è stato utilizzato per la successiva estrazione con eter-etilico (Et_2O). Per la seconda estrazione i solventi utilizzati sono stati acqua ed eter-etilico (Et_2O) solvente organico, meno polare e più leggero dell'acqua. L'apparecchio utilizzato per effettuare le estrazioni liquido-liquido è stato l'imbuto separatore, mostrato in figura 7.

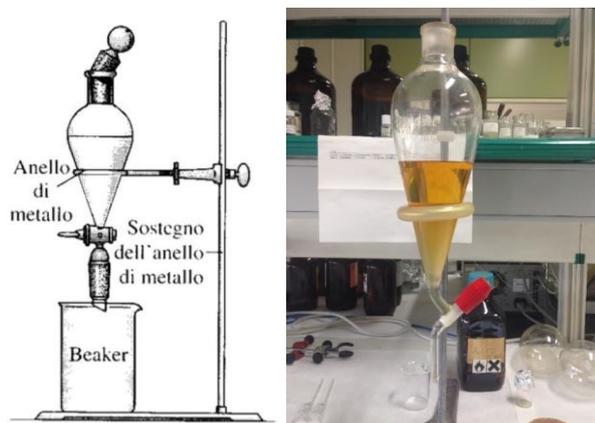


Figura 7: Imbutto separatore utilizzato per l'estrazione con solvente organico.

L'estrazione è stata effettuata agitando fortemente nell'imbuto separatore chiuso i due liquidi immiscibili (H_2O e Et_2O) che in tal modo si sono dispersi l'uno nell'altro in piccole gocce. Lasciando la miscela a riposo le gocce di ciascun liquido si riuniscono (coalescenza) portando alla formazione di due strati sovrapposti.

Allo scopo di estrarre una maggior quantità di soluto è stato opportuno ripetere più volte l'operazione. Quando le fasi si sono ben separate, si apre il rubinetto e si scarica il liquido inferiore (parte contenente H₂O), mentre la fase organica rimanente nell'imbuto si raccoglie in una beuta pulita. Terminata l'estrazione, la fase organica (risultante dalla riunione di tutte le fasi organiche separate) è stata anidrificata, per eliminare le piccole quantità di acqua che vengono sempre trattenute da qualsiasi solvente. L'acqua residua va sempre eliminata, poiché può interferire nelle reazioni successive a cui dobbiamo sottoporre la nostra sostanza e crea senz'altro inconvenienti durante le determinazioni spettrali che servono all'identificazione di tale sostanza. L'anidificazione è stata effettuata aggiungendo alla soluzione organica una piccola quantità di polvere di agente anidrificante, sostanza che può 'catturare' chimicamente le molecole d'acqua (nel nostro caso è stato utilizzato il solfato di magnesio MgSO₄). Dopo il trattamento con l'agente anidrificante, la soluzione è stata filtrata con un filtro a pieghe, fatto con carta da filtro, poggiato all'interno di un normale imbuto di vetro (Fig. 8a). Il prodotto finale è stato posto nel distillatore e pesato (106,2 mg) così da essere utilizzato per le successive analisi cromatografiche (Fig. 8b).

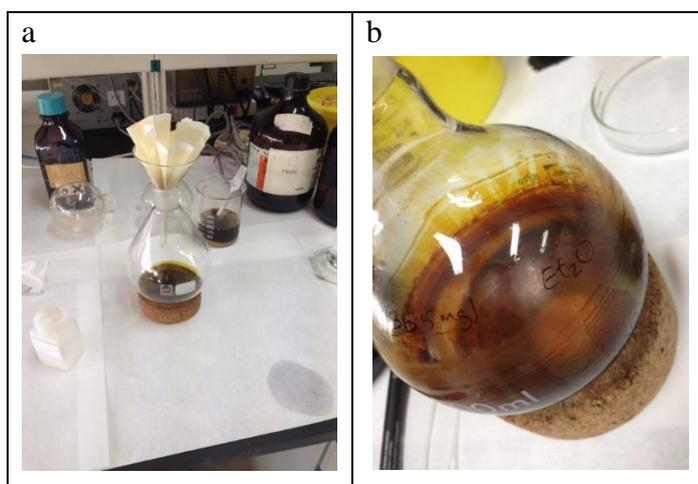


Figura 8. a) Soluzione filtrata con filtro a pieghe; b) distillato di *Raspaciona aculeata* ottenuto.

Il seguente schema riassume tutte le metodologie utilizzate in laboratorio per la prima estrazione di *Raspaciona aculeata*.

- Materiale secco utilizzato per la prima estrazione: 2 gr
- Peso liofilizzato: 2 gr
- Peso dopo l'estrazione: 1,22 gr
- Estrazione con CHCl₃/MeOH (1:1): 120 ml
- Peso estratto con CHCl₃/MeOH: 21,3 mg
- Resto di CHCl₃/MeOH; 276,2 mg
- Campione estratto con MeOH: 98 mg
- Separazione: 15 ml H₂O + 25 ml Et₂O (x 3 volte) pesando alla fine 106,2 mg
- 10 ml n-Butanol
- Campione estratto in Et₂O: 106,2 mg

Successivamente al periodo di mobilità Erasmus, sfruttato per la prima parte sperimentale del lavoro con *Raspaciona aculeata*, in Italia sono stati utilizzati 4 grammi di spugna liofilizzata (*Raspaciona aculeata*), suddividendoli in due aliquote di 2 grammi e collocati in due flaconcini da 50 ml. Si sono aggiunti 20 ml di n-esano in ogni campione e successivamente si sono collocati in un bagno ad ultrasuoni per 10 minuti; dopo sono stati centrifugati a 4500 rpm, quindi il surnatante è stato raccolto e passato in un matraccio di vetro da 50 ml. Il processo è stato ripetuto tre volte; il surnatante recuperato, è stato posto a essiccare utilizzando un termostato a rotore rotante a 30 ° C. Il residuo secco è stato estratto con lo stesso metodo con acetato di etile, la porzione di esano ed acetato di etile sono stati combinati ed essiccati, il residuo di color scuro (rosso), Metil-t-butil etere, è stato sciolto in 2 ml di metanolo con un rapporto volumetrico 1: 1 (MeOH / MTBE 1:1) utilizzato come eluente. Il prodotto finale è stato posto nel distillatore e pesato per ulteriori analisi cromatografiche.

4.1.6 Cromatografia

La cromatografia è una tecnica analitica utilizzata per separare specifiche sostanze in una miscela. Le separazioni si basano su interazioni fisico-chimiche a livello molecolare tra il supporto cromatografico, le sostanze da separare e taluni componenti del solvente mobile. Le tecniche di separazione utilizzate sono state la cromatografia su colonna (CC) e la cromatografia su strato sottile (TLC). La cromatografia è una tecnica indispensabile nella chimica di sintesi e delle sostanze organiche naturali, per isolare e purificare i componenti di miscele di varia natura.

Cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography)

La cromatografia su strato sottile (TLC) è una tecnica cromatografica di semplice e rapido impiego, utilizzata principalmente come metodologia analitica; nel nostro caso è stata utilizzata durante il periodo di mobilità ERASMUS, per la prima parte sperimentale di studio su *Raspaciona aculeata*, al fine di controllare l'efficacia della separazione dei campioni estratti. In questa tecnica, la fase stazionaria (gel di silice) è depositata su una lastrina di allumina sotto forma di strato sottile (circa 1 mm). La miscela da separare viene depositata alla base della lastrina, lontano dal bordo, e la lastrina viene inserita verticalmente in un recipiente di vetro che contiene uno strato di eluente alto circa 1 cm; il recipiente viene quindi chiuso per mantenere l'ambiente saturo di vapori di solvente. La fase mobile (eluente) è un solvente opportunamente scelto (o una miscela di solventi), capace di separare i componenti da analizzare e poco affine per polarità alla fase stazionaria scelta. La polarità è fondamentale per la scelta dell'eluente perché ne dipende l'entità del trascinarsi delle sostanze lungo la lastrina. Nel nostro caso gli estratti in Et₂O e MeOH sono stati studiati analiticamente tramite cromatografia su strato sottile utilizzando eluenti composti da miscele a diverse concentrazioni di cicloesano/etere-etilico, cloroformio/etere-etilico, e cloroformio/metanolo.

Durante il processo chimico l'eluente tende a salire lungo la lastrina per capillarità, trasportando con sé i vari componenti della miscela e separandoli tra loro in funzione della loro diversa affinità per la fase mobile e la fase stazionaria; prima che il solvente raggiunga la sommità della lastrina, si pone fine alla separazione estraendo la lastrina dal recipiente e lasciando evaporare l'eluente (Fig. 9). A separazione avvenuta è stato possibile osservare le sostanze contenute nel campione; le sostanze contenenti cromofori sono osservabili sulla lastrina come macchie presenti a distanza diversa dalla base (Fig.10). Per l'analisi di sostanze incolori, si è ricorsi all'osservazione sotto luce ultravioletta; le lastrine commerciali contengono un indicatore di fluorescenza (ZnS) che assorbe luce ultravioletta a 254 nm ed emette luce verde a 530 nm, pertanto la loro esposizione sotto la lampada UV rende lo strato di silice di color verde chiaro.

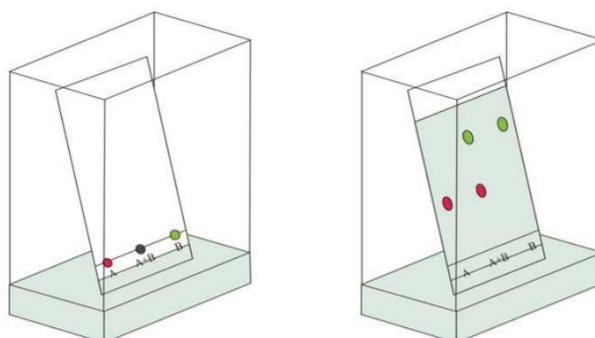


Figura 9: Schema dello sviluppo ascendente della lastrina con macchie delle sostanze separate.



Figura 10: Sviluppo ascendente della lastrina di *Raspaciona aculeata*.

Dove sono presenti sostanze che assorbono sopra i 250 nm, non si vede la fluorescenza dell'indicatore e si osservano macchie di color viola. Inoltre si è anche ricorsi a reazioni con reagenti che sviluppano composti colorati, quali iodio e ninidrina, evidenziando le macchie con colori diversi. Una volta individuate tutte le macchie di sostanza, esse sono state analizzate in base al loro fattore di ritardo o di ritenzione (Rf) o anche chiamato rapporto dei fronti, che esprime l'affinità relativa della sostanza per il sistema fase mobile/fase stazionaria. Individuate le possibili molecole d'interesse la fase successiva è stata la separazione e purificazione dei composti organici mediante cromatografia su colonna (CC).

Cromatografia su colonna (CC)

Per la separazione e purificazione dei composti organici presenti nei campioni di *Raspaciona aculeata* estratti durante la prima parte di studio sperimentale, si è utilizzata la cromatografia su colonna (CC), una tecnica largamente impiegata per questo tipo di analisi. Si riempie una colonna di vetro con il materiale che funge da fase stazionaria, nel nostro caso è stata utilizzata la polvere di silice, supportata da cicloesano. Successivamente avviene il riempimento che viene effettuato disperdendo la fase stazionaria nella fase mobile, creando una sospensione che viene inserita nella colonna lasciandola stratificare lentamente con la fase stazionaria. Si pone quindi la miscela da separare (campione estratto in Et₂O) in cima alla colonna e si fa fluire lungo la colonna con la fase mobile (eluente) che, sotto l'influenza della gravità, scende trasportando con sé i componenti della miscela. La miscela da separare, caricata sulla cima della colonna, viene trascinata all'interno della matrice da una aggiunta continua di solvente (fase mobile); nel nostro caso sono state utilizzate soluzioni a concentrazioni differenti di cicloesano/etere-etilico (Tab. 2).

Tabella 2: Soluzioni utilizzate per la cromatografia su colonna

ELUENTI UTILIZZATI	QUANTITA'
Esano	100 ml
Esano/Et ₂ O (9:1)	100 ml
Esano/Et ₂ O (8:2)	150 ml
Esano/Et ₂ O (7:3)	200 ml
Esano/Et ₂ O (1:1)	150 ml
Esano/Et ₂ O (3:7)	100 ml
Et ₂ O	100 ml
CHCl ₃ /MeOH (8:2)	50 ml (lavato)

I vari componenti si separano gli uni dagli altri muovendosi a velocità diverse lungo la colonna in funzione della loro differente affinità per la fase stazionaria e la fase mobile. Nel corso dell'intero processo di separazione cromatografica, l'eluente in uscita è stato raccolto in diverse frazioni (Fig. 11) ed ogni frazione è stata analizzata tramite cromatografia TLC, alla ricerca di componenti disciolte. Lo stesso procedimento è stato ripetuto fino a che sono state recuperate tutte le sostanze che interessavano.

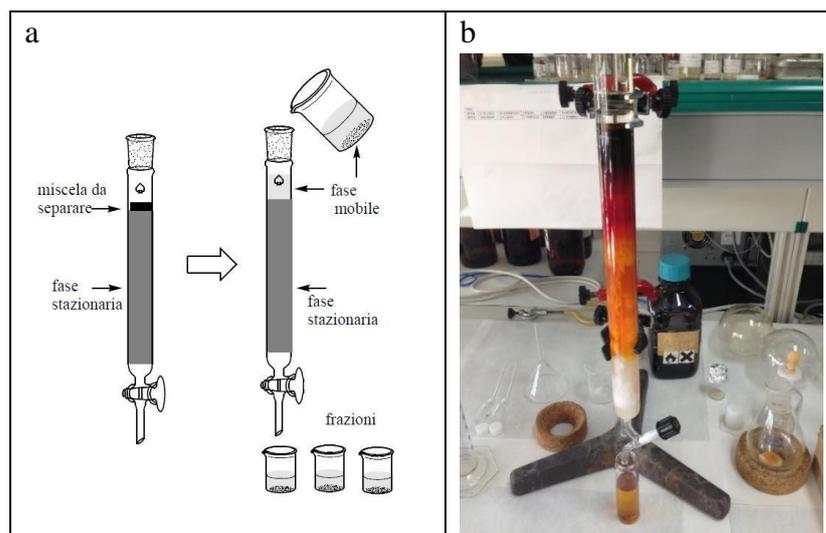


Figura 11: a) Schema del processo di separazione cromatografica su colonna; b) colonna di *R. aculeata* di 17,7 cm nel laboratorio de Chimica Organica, Università di Cadice.

Finita la cromatografia su colonna, le provette che contenevano gli stessi componenti sono state riunite (Tab. 3) ed il solvente è stato evaporato sotto vuoto per distillazione.

Tabella 3: Unione delle provette con lo stesso componente

PROVETTE	CODICE	PESO
1-8	RA-1	0,6 mg
9-10	RA-2	3,2 mg
11-22	RA-3	2,8 mg
23-27	RA-4	2,2 mg
28-35	RA-5	4,7 mg
36-44	RA-6	3,9 mg
45-48	RA-7	1,7 mg
49-50	RA-8	1,9 mg
51-56	RA-9	3,1 mg
57-62	RA-10	3,3 mg
63-71	RA-11	2,8 mg
Lavato	Lavato	1 mg

Per verificare l'efficacia della separazione dei campioni estratti e delle possibili molecole presenti, sono state preparate alcune piastrine per la cromatografia su strato sottile (TLC) selezionando opportunamente l'eluente (o una miscela di solventi):

- RA -1,2,3 – Esano/Et₂O (9,5 ml:5 ml)
- RA - 4,5 – Esano/Et₂O (8:2)
- RA – 6,7,8 – Esano/Et₂O (1:1)
- RA – 9,10,11 – Esano/Et₂O (3:7)

Successivamente, i campioni sono stati diluiti con cloroformio-D e analizzati mediante risonanza magnetica nucleare e spettrometria di massa. Le analisi spettroscopiche eseguite sui campioni estratti hanno mostrato la presenza di alcuni metaboliti secondari, che erano presenti insieme, non isolati e purificati. Per questo motivo, è stata effettuata una seconda estrazione con diverse miscele di solventi per isolare e purificare parte dei metaboliti secondari evidenziati durante la prima estrazione.

Il seguente diagramma riassume tutte le metodologie utilizzate in laboratorio per la seconda estrazione di *Raspaciona aculeta*:

- Peso liofilizzato: 25,36 gr
- Estrazione con CHCl₃/MeOH (1:1) 500 ml
- Separazione: 100 ml H₂O + 150 ml Et₂O
- Campione estratto in Et₂O: 1,31 gr

Per la separazione e purificazione dei composti organici presenti nei campioni di *Raspaciona aculeata* estratti, è stata ripetuta la stessa procedura utilizzata dopo la prima estrazione, la cromatografia su colonna (CC), ma con diverse concentrazioni di cicloesano / etere-etilico (Tab. 4).

Tabella 4: Soluzioni utilizzate per la cromatografia su colonna

ELUENTI UTILIZZATI	QUANTITA'
Esano/Et ₂ O (85:15)	500 ml
Esano /Et ₂ O (8:2)	300 ml
Esano /Et ₂ O (7:3)	300 ml
Esano/Et ₂ O (6:4)	300 ml
Esano/Et ₂ O (1:1)	400 ml
Esano/Et ₂ O (3:7)	400 ml
CHCl ₃ /MeOH (8:2)	250 ml
CHCl ₃ /MeOH (1:1)	250 ml

Una volta terminata la cromatografia su colonna (Fig. 12), le provette contenenti gli stessi componenti (Tab. 5) sono state riunite e il solvente è stato evaporato sotto vuoto per distillazione.

Tabella 5: Unione delle provette con lo stesso componente

PROVETTE	CODICE	PESO
1	RA-1b	45,2 mg
2-3	RA-2b	145,3 mg
4-5	RA-3b	16,2 mg
6-14	RA-4b	36,7 mg
15-19	RA-5b	201,9 mg
20	RA-6b	60,8 mg
21-24	RA-7b	195,5 mg
25	RA-8b	10,6 mg
26-27	RA-9b	201,6 mg
28-32	RA-10b	196,6 mg
33	RA-11b	10,7 mg
34-35	RA-12b	28 mg
36-39	RA-13b	47,1 mg
40-41	RA-14b	10,8 mg
42-46	RA-15b	13 mg
47-48	RA-16b	99,2 mg

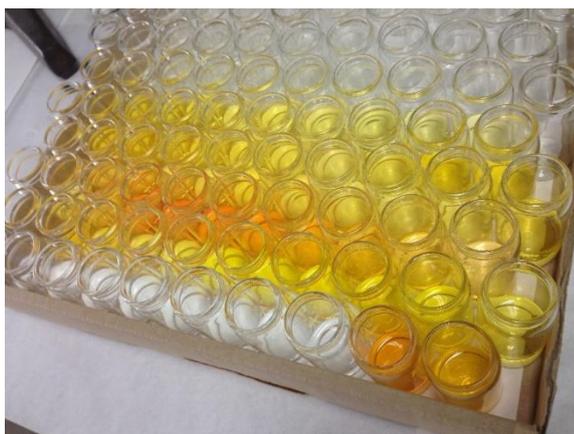


Figura 12: Provette separate tramite cromatografia su colonna.

L'efficacia della separazione dei campioni estratti e delle possibili molecole presenti è stata verificata preparando altre piastrine per cromatografia su strato sottile (TLC) selezionando appropriatamente l'eluente (o una miscela di solventi):

- RAb -1,2,3 – Esano/Et₂O (85:15)
- RAb - 4,5,6 – Esano/Et₂O (8:2)
- RAb – 7,8,9 – Esano/Et₂O (1:1)
- RAb – 10,11,12 – Esano/Et₂O (1:1)
- RAb – 13,14,15 – Esano/Et₂O (3:7)
- RAb – 16,17 – Esano/Et₂O (3:7)

Il passo successivo è stata la preparazione dei campioni per le analisi dei composti estratti e isolati, mediante spettrometria di massa (ESI) e risonanza magnetica nucleare (NMR). La determinazione della struttura di un nuovo metabolita bioattivo è il primo passo necessario per ogni successivo studio. Oggi è possibile determinare completamente ed in maniera non distruttiva la struttura di sostanze organiche complesse, disponendo di pochi milligrammi o addirittura di frazioni di milligrammo di campione. Il lavoro di determinazione strutturale effettuato durante il mio primo anno di ricerca è stato basato su tecniche spettroscopiche. Le principali tecniche spettroscopiche impiegate per determinare la struttura dei composti isolati sono state la spettrometria di massa (MS-ESI) e la risonanza magnetica nucleare (NMR).

Purificazione di *Raspaciona aculeata*

Per la seconda parte sperimentale di ricerca su *Raspaciona aculeata*, effettuata successivamente in Italia, presso l'Università di Messina, nel laboratorio del Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali, è stata preparata una colonna di vetro con un diametro di 1 cm, sono stati aggiunti 10 grammi di silice colloidale LUDOX® AS-30 nella colonna, impacchettando con n-esano. Successivamente, il campione di *Raspaciona aculeata* è stato versato in piccolissimi volumi disciolti in MeOH / MTBE, utilizzando come fase mobile gli stessi solventi usati per sciogliere il residuo secco. La fase mobile consisteva in un gradiente binario di metanolo / metil tert-butil etere / acqua (MeOH / MTBE / H₂O) (90: 8: 2; v / v / v) (A) e MeOH / MTBE / H₂O (8: 90: 2; v / v / v) (B). Durante l'eluizione i pigmenti hanno iniziato a separarsi (come si vede nella figura 13) e sono stati raccolti separatamente in provette (Fig. 14).



Figura 13: Processo di separazione cromatografica su colonna di *Raspaciona aculeata* presso i laboratori dell'Università di Messina.



Figura 14: Provette di campioni di *Raspaciona aculeata* separati tramite cromatografia su colonna.

Le separazioni sono state eseguite su una colonna YMC C30 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) e il volume di iniezione era di 20 μ L. La fase mobile consisteva in un gradiente binario di metanolo / metil tert-butil etere / acqua (MeOH / MTBE / H₂O) (90: 8: 2; v / v / v) (A) e MeOH / MTBE / H₂O (8: 90: 2; v / v / v) (B), a partire da 0% B con un aumento del gradiente lineare del 30% B in 20 min, da 80% B a 35 min, a 100% B a 65 minuti e al 100% B a 75 minuti, quindi riequilibrando la colonna alla concentrazione iniziale di B ad una velocità di flusso di 1 ml / min. Successivamente, sono state analizzate tutte le frazioni raccolte e analizzate nell'HPLC.

4.1.7 Spettrometria di massa

La determinazione della struttura di un nuovo metabolita bioattivo è il primo passo necessario per ogni successivo studio. Oggi è possibile determinare completamente ed in maniera non distruttiva la struttura di sostanze organiche complesse, disponendo di pochi milligrammi o addirittura di frazioni di milligrammo di campione. La determinazione della formula molecolare, realizzata attraverso spettri di massa a bassa e ad alta risoluzione, è il primo ed essenziale passo nello studio di una nuova molecola organica (Yates, 1998). Uno spettrometro di massa è uno strumento utilizzato per misurare la massa di una molecola dopo che essa è stata ionizzata, ossia alla quale è stata impartita una carica elettrica. La tecnica consiste nella trasformazione delle molecole del campione in ioni, nella loro separazione in funzione del loro rapporto massa su carica (m/z) e nella loro rivelazione. Il segnale ottenuto, lo spettro di massa, indica pertanto la massa della molecola e la massa dei pezzetti della molecola. In condizioni riproducibili l'aspetto dello spettro di massa di un qualsiasi composto è un'attendibile "impronta digitale", attraverso la quale il composto può essere riconosciuto. La rapida identificazione di composti noti avviene attraverso il confronto, effettuato da un calcolatore, dello spettro incognito con standard di spettri noti ('librerie'). La spettrometria APGC (Gascromatografia a pressione atmosferica) ed ESI (Electro Spray Ionization) sono le tecniche di spettrometria di massa più utilizzate per l'analisi delle sostanze organiche a basso peso molecolare. La gascromatografia a pressione atmosferica (APGC) Waters integra le funzionalità GC nelle moderne e avanzate tecnologie MS. La ionizzazione è di tipo "soft", ossia il grado di frammentazione osservato per numerosi composti è inferiore rispetto ad altre tecniche, per esempio la ionizzazione EI. La minor frammentazione può incrementare i livelli di sensibilità e specificità e semplificare quindi la selezione degli ioni precursori nelle analisi MS/MS.

La spettrometria ESI è stata la tecnica maggiormente utilizzata per le analisi dei campioni estratti e isolati; è una tecnica usata soprattutto per lo studio di biomolecole molto polari idrosolubili, anche cariche (Seeley and Caprioli, 2008). Il campione viene introdotto come soluzione in un solvente volatile, come acqua, metanolo, cloroformio o loro miscele, talvolta contenenti un po' di acido organico. Questa soluzione è spinta ad alta pressione attraverso un ago capillare, che è caricato ad un potenziale positivo di qualche migliaio di volt, e uscendo dall'ago si suddivide in tante piccole goccioline (1-2 μm), generando uno spray. Dato l'elevato potenziale dell'ago, ogni gocciolina ha un eccesso di carica positiva. A causa delle loro ridotte dimensioni, il solvente evapora rapidamente da ogni gocciolina. La densità di carica della gocciolina quindi aumenta, finché diventa così alta che ioni positivi del soluto possono essere espulsi dalla gocciolina. Questi ioni sono poi spinti da un campo elettrico attraverso una serie di fenditure fino ad entrare nella zona a bassa pressione dello spettrometro di massa, dove sono poi accelerate ed inviate all'analizzatore. Una caratteristica fondamentale dell'electrospray è che, per molecole di massa piuttosto elevata, gli ioni che sono espulsi dalle goccioline hanno carica multipla, si tratta cioè di molecole poliprotonate.

4.1.8 Risonanza magnetica nucleare

Tra le tecniche usate per la determinazione strutturale dei metaboliti isolati, quella di gran lunga più importante è stata la risonanza magnetica nucleare (NMR). In particolare, oltre ai comuni esperimenti ^1H - e ^{13}C -NMR si è fatto un ampio uso di esperimenti NMR bidimensionali, che nella maggior parte dei casi sono stati sufficienti per la completa determinazione strutturale del composto in esame. Gli esperimenti NMR bidimensionali presentano due importanti vantaggi rispetto ai corrispondenti esperimenti monodimensionali, e questi vantaggi diventano sempre più evidenti al crescere della complessità della molecola.

In primo luogo si ha una drastica riduzione del tempo di acquisizione perché da un singolo spettro si possono ricavare informazioni ottenibili solo da un grande numero di spettri monodimensionali. Inoltre, la presenza di due dimensioni rende molto più improbabile la possibilità di sovrapposizione di segnali, il che permette di discernere e attribuire anche nuclei che risuonano in zone molto affollate dello spettro. Qui di seguito sono sommariamente descritti i principali esperimenti NMR bidimensionali usati.

La sequenza COSY (Bax, 1982) (CORrelation SpettroscopY) è stata una delle prime sequenze di impulsi 2D ad essere definita ed è probabilmente, nelle sue varie versioni, ancora oggi, l'esperimento 2D NMR più usato. Il COSY è un esperimento di correlazione chemical shift omonucleare attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin che fornisce preziose informazioni strutturali.

L'HSQC (Davis and Bax, 1986) (Heteronuclear Single Quantum Coherence) è un esperimento di correlazione eteronucleare di chemical shift ^1H - ^{13}C tramite la costante di accoppiamento diretta $^1J_{\text{CH}}$ ed è caratterizzato da una sensibilità notevolmente superiore rispetto a quella dell'HETCOSY. Questo esperimento è usato frequentemente per le molecole organiche. In questo esperimento, il segnale acquisito è quello protonico (reverse detection). La maggiore sensibilità NMR del protone rispetto a quella del ^{13}C rende l'HSQC un esperimento più sensibile e quindi adatto anche a campioni disponibili in quantità limitata.

L'HMBC (Bax et al., 1986) (Heteronuclear Multiple Bond Corelation) è una correlazione eteronucleare long-range che fornisce le stesse informazioni del COLOC, ma l'acquisizione è in reverse detection; questo aspetto comporta tutti i vantaggi di sensibilità che ne derivano, ma anche con il problema della soppressione del segnale dei protoni legati al ^{12}C . Anche in questo caso, la possibilità di utilizzare impulsi di gradiente di campo magnetico ha trasformato questo esperimento in un esperimento di routine.

4.1.9 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Per la seconda parte sperimentale di ricerca su *Raspaciona aculeata*, effettuata successivamente in Italia, presso l'Università di Messina, i pigmenti del campione sono stati identificati comparandoli con gli standard disponibili, in ordine di eluizione, con spettri UV/vis, e i loro spettri APCI-MS, registrati in entrambe le modalità di ionizzazione positiva e negativa, e quando disponibili, mediante informazioni sulla letteratura. La quantificazione è stata effettuata con il metodo standard, utilizzando gli standard disponibili; le curve standard sono state calcolate mediante analisi di regressione lineare e qualsiasi quantificazione è stata stimata come il valore medio di tre misurazioni ripetute. Le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC (Shimadzu, Milano, Italia) dotato di un controllore CBM-20A, due pompe LC-20AD, un autocampionatore SIL-20AC. I dati sono stati elaborati con il software Labsolution ver. 5.10.153 (Shimadzu). Per l'analisi MS è stato utilizzato uno spettrometro di massa (LCMS-2020, Shimadzu) dotato di interfaccia APCI, con modalità di ionizzazione positiva e negativa.

Gli spettri UV-Vis sono stati acquisiti tra 250-600 nm, mentre i cromatogrammi sono stati estratti a 450 nm (frequenza di campionamento: 1.5625 Hz, costante di tempo 0,64 s). I parametri MS APCI +, APCI- sono stati configurati come segue: Modalità di acquisizione, scansione; temperatura dell'interfaccia 350° C; voltaggio dell'interfaccia 4,5 kV; blocco termico, 300° C; tensione CDL 0 V; temperatura CDL, 300° C; gamma m / z, 300-1200; flusso del gas di nebulizzazione (N₂): 4 ml · min; tempo dell'esperimento: 1 sec; tensione del rivelatore: 0,8 kV; Q-array: 0,0 V; RF: 90 V; campionamento: 2 Hz.

4.2. Risultati e discussione

4.2.1 Distribuzione e tassonomia

L'indagine preliminare effettuata nelle zone di basso fondale (1,5 - 10 metri di profondità) del lago di Faro ha evidenziato una distribuzione di poriferi per lo più random, con esemplari isolati. Il substrato che li ospita si estende quasi unicamente nelle aree occidentali poco profonde del lago, che occupa quasi un terzo della superficie totale del bacino, anche se alcune specie sono state osservate, altresì, nelle zone più profonde (10 m), in prossimità della zona anossica, nell'area più centrale del lago. In queste zone, durante il periodo d'indagine del primo anno di ricerca, sono state osservate 9 specie di poriferi, tassonomicamente identificati. Di queste 9 specie, si è deciso di utilizzare una sola (*Raspaciona aculeata*), dopo un'attenta indagine bibliografica, scegliendo una specie, considerata interessante dal punto di vista del metabolismo secondario e dalla quale si pensò estrarre, isolare e caratterizzare metaboliti secondari di possibile interesse.

Sulla base del rilevamento mediante GPS, la posizione di ciascuna specie ed individuo, all'interno delle aree-campione, è stata riportata su immagine satellitare (<https://maps.google.it/>). La distribuzione delle specie di poriferi osservati è stata così ricostruita, con un margine d'errore di 50 cm del dato numerico (coordinate geografiche) e, per motivi di scala, di circa 5 metri nella relativa rappresentazione cartografica (Figura 15 e 16).



Figura 15: Distribuzione dei poriferi studiati nell'area campione, indicata in rosso, del lago di Faro. I simboli verdi indicano i campioni osservati e raccolti.



Figura 16: Ingrandimento dell'area campione nel lago di Faro.

Dalle osservazioni effettuate sul campo è stato suggerito che le specie di poriferi osservati si possono riscontrare su diversi tipi di sedimenti, sabbioso, roccioso o con detrito conchigliare. Ad ogni campione è stato associato un codice identificativo (Tab. 6) corrispondente alle specie identificate successivamente presso l'Università di Genova, Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, ad opera del Dott. Marco Bertolino.

Tabella 6: Specie di poriferi del lago di Faro, campionati e identificati tassonomicamente

Codice Identificativo	Specie
PF01	<i>Raspaciona aculeata</i> (Johnston, 1842)
PF02	<i>Dysidea fragilis</i> (Montagu, 1814)
PF03	<i>Hymeniacidon perlevis</i> (Montagu, 1814)
PF04	<i>Halichondria (Halichondria) panicea</i> (Pallas, 1766)
PF05	<i>Tedania (Tedania) anhelans</i> (Vio in Olivi, 1792)
PF06	<i>Dictyonella marsilii</i> (Topsent, 1893)
PF07	Sp. (non identificata)
PF08	<i>Paraleucilla magna</i> Klautau, Monteiro and Borojevic, 2004
PF09	<i>Haliclona (Reniera) cinerea</i> (Grant, 1826)
PF10	<i>Clathrina coriacea</i> (Montagu, 1814)

In accordo con lo studio di Marra et al. (2016), si è riscontrata una evidente relazione tra le diverse specie di Porifera e le variabili fisico-biologiche delle acque del lago di Faro, tra cui granulometria dei sedimenti, e i differenti tipi di substrato. La profondità è la principale variabile evidente tra le specie di poriferi osservate nel lago di Faro, insieme alle differenze di substrato. La specie *Hymeniacidon perlevis*, *Tedania (Tedania) anhelans* e *Haliclona (Reniera) cinerea* sono state rinvenute in aree del lago con profondità che non superano 1,5 metri, su substrati sabbiosi o detrito conchigliare; *Raspaciona aculeata*, *Halichondria (Halichondria) paniceae*, *Dictyonella marsilii* sono state osservate nei pressi della formazione rocciosa (beach-rock) che attraversa il lago in direzione nord-sud, ad una profondità di 4 metri, per circa 90 metri di lunghezza; mentre le specie *Paraleucilla magna* e *Dysidea fragilis* sono state trovate in substrati sabbiosi più profondi (7 - 10 m). L'unica specie trovata vicino le palizzate di legno, utilizzate per la molluschicoltura nel lago, è stata *Clathrina coriacea*. Di seguito si mostrano le foto (Fig. 17) delle specie fotografate, campionate e identificate tassonomicamente, nel lago di Faro.

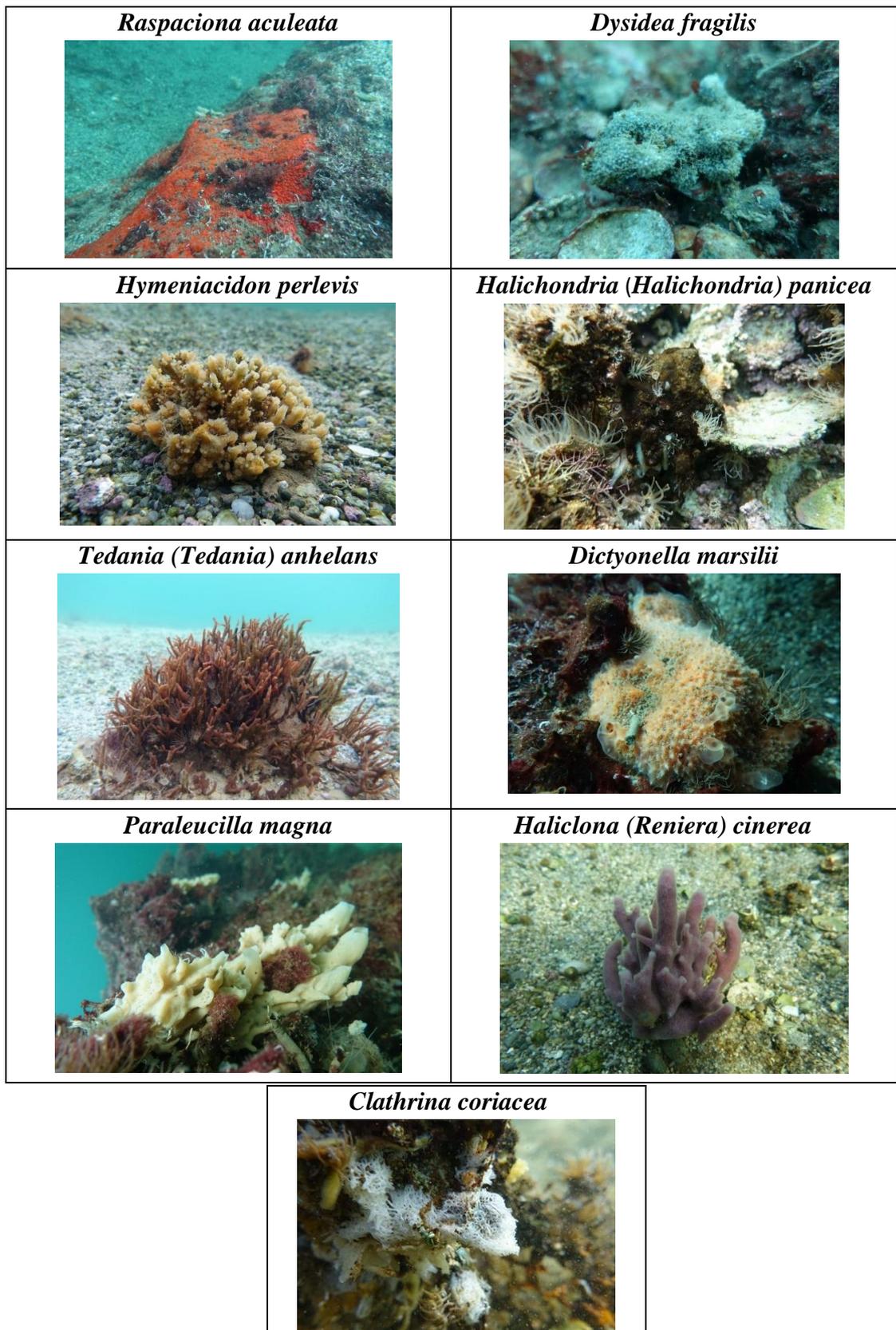


Figura 17: Poriferi fotografati, campionati e identificati tassonomicamente, nel lago di Faro.

Nel lago di Faro sono state identificate 9 specie di poriferi, di cui 8 sono già state segnalate nel più recente lavoro sulla fauna di spugne del lago di Faro, di Marra et al. (2016). 8 specie delle 9 sono Demospongiae e una Calcarea. La classe Calcarea è rappresentata solo da *Paraleucilla magna*, una specie esotica recentemente introdotta nel Mar Mediterraneo (Longo et al., 2007). *Raspaciona aculeata* rappresenta l'unica specie osservata per la prima volta nel lago di Faro e soprattutto identificata tassonomicamente con sicurezza. *R. aculeata* è una specie porosa appartenente alla classe Desmospongiae, specie incrostante e massiccia con una superficie fortemente dentata. Predilige habitat infra-litorali e fondali rocciosi; ad oggi, questa specie non era stata osservata e riportata nel lago di Faro, in cui è stata osservata per la prima volta nel 2016 durante le operazioni di campionamento, rappresentando, quindi, la prima segnalazione della specie nella Riserva Naturale Orientata di Capo Peloro. In accordo con Marra et al. (2016) tutte le specie di spugne presenti nel lago, ad eccezione di *Paraleucilla magna*, appartengono alla fauna delle spugne mediterranee e dell'Atlantico nord-orientale. L'affinità biogeografica predominante delle specie che vivono nel lago di Faro con la fauna del nord Atlantico può essere correlata a una "condizione di tipo atlantico", dovuta alla presenza di acque relativamente più fredde (4 -10 ° C) dell'acqua limitrofa non interessata da fenomeni di risalita che influenzano le acque poco profonde dello Stretto di Messina (tra Taormina e Messina). Inoltre, i nostri dati coincidono con l'analisi biogeografica dei mari italiani di Bianchi (2004), che si riferiva allo Stretto di Messina come a un "microhabitat ricco di reliquie del Pliocene atlantico". Gli studi attualmente riportati, ampliano le nostre conoscenze sulle riserve naturali in termini di biodiversità. Costituiscono, inoltre, un passo simbolico nello studio degli habitat delle lagune del Mediterraneo meridionale.

4.2.2 Prima fase sperimentale: metaboliti secondari in *Raspaciona aculeata*

Le procedure chimiche e le analisi spettroscopiche effettuate presso il Dipartimento di Chimica Organica, Facoltà Scienze Marine ed Ambientali, dell'Università di Cadice, in Spagna, con il supporto della Prof.ssa María Jesús Ortega, hanno permesso l'estrazione e la caratterizzazione chimica di 19 metaboliti secondari, 2 dei quali sono stati isolati per eventuali successivi studi applicati. Dai risultati dell'estrazione e le successive analisi spettroscopiche, è stato possibile caratterizzare le seguenti molecole (Tab. 7) e (Fig.18).

Tabella 7: Metaboliti secondari di *Raspaciona aculeata*, estratti e caratterizzati.

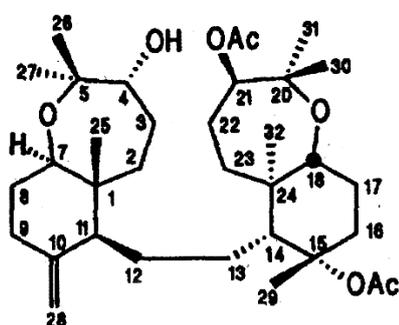
	Composto	Formula molecola	(M+H) ⁺ /(M-H)
1	Raspacionina	C ₃₄ H ₅₆ O ₇	577 4104
2	Raspacionina A	C ₃₄ H ₅₆ O ₈	593 4053
3	Raspacionina B	C ₃₂ H ₅₀ O ₆	531 3686
4	21-Deacetyl-raspacionin	C ₃₂ H ₅₄ O ₆	534 3920
5	10-Acetoxy-21-deacetyl-28-hydroraspacionina	C ₃₄ H ₅₈ O ₈	595 4210
6	10-Acetoxy-21-deacetyl-4-oxo-28-hydroraspacionina	C ₃₄ H ₅₆ O ₈	593 4053
7	10-Acetoxy-15,21-deacetyl-1-4-oxo-28-hydroraspacionina	C ₃₂ H ₅₄ O ₇	551 3948
8	10-Acetoxy-15-deacetyl-4-oxo-28-hydroraspacionina	C ₃₄ H ₅₆ O ₈	569 4053
9	10-Acetoxy-4-acetyl-15-deacetyl-28-hydroraspacionina	C ₃₆ H ₆₀ O ₉	637 4316
10	10-Acetoxy-15-deacetyl-4,21-dioxo-28-hydroraspacionina	C ₃₂ H ₅₂ O ₇	549 3791
11	10-Hydroxy-4,21-dioxo-28-hydroraspacionina	C ₃₂ H ₅₂ O ₇	549 3791
12	21-Deacetyl-21-oxo-raspacionina	C ₃₂ H ₅₂ O ₆	533 3842
		C ₃₂ H ₅₃ O ₆	532 3764
13	4,21-Dioxo-15-deacetyl-raspacionina	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	491 3736
		C ₃₀ H ₅₁ O ₅	490 3658

14	4,21-Dioxo-raspacionina	C ₃₂ H ₅₀ O ₆	531 3686
		C ₃₂ H ₅₁ O ₆	530 3607
15	10-Acetoxy-4,21-dioxo-28-hydroraspacionina	C ₃₄ H ₅₄ O ₈	591 3897
		C ₃₄ H ₅₅ O ₈	590 3819
16	10-Acetoxy-4-acetyl-21-oxo-28-hydroraspacionina	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	635 4159
		C ₃₆ H ₅₉ O ₉	634 4081
17	10-Acetoxy-4-acetyl-28-hydroraspacionina	C ₃₈ H ₆₂ O ₁₀	679 4421
		C ₃₈ H ₆₃ O ₁₀	678 4343
18	10-Acetoxy-28-hydroraspacionina	C ₃₆ H ₆₀ O ₉	637 4316
		C ₃₆ H ₆₁ O ₉	636 4237
19	10-Acetoxy-21-deacetyl-4-acetyl-28-hydroraspacionina	C ₃₆ H ₆₀ O ₉	637 4316
		C ₃₆ H ₆₁ O ₉	636 4237

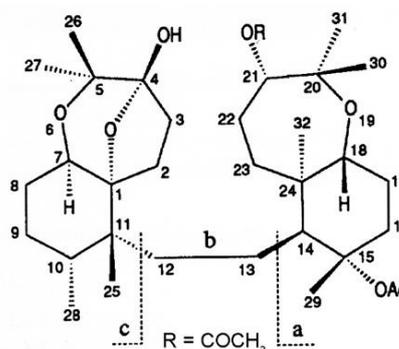
Raspaciona aculeata presenta uno scheletro caratterizzato da due sistemi triterpeni che sono collegati da un ponte di etilene in posizione equatoriale. Questa spugna sembra mostrare attività allelo-chimiche perché è completamente priva di organismi epifiti. La struttura chimica di raspacionina (**1**) è stata suggerita dall'analisi dei dati spettroscopici e relativa stereochimica mediante analisi di diffrazione di raggi X (Cimino et al., 1991), ma la stereochimica assoluta è stata determinata nel 1993 applicando il Metodo Mosher che utilizzano l'estere α -metossi- α -trifluorometilfenilacetico (MTPA), (Cimino et al., 1993a). In *R. aculeata* sono stati studiati altri metaboliti secondari (polieteri), che posseggono lo stesso scheletro di triterpeni che costituisce la raspacionina; questi sono stati isolati successivamente e i più importanti sono la raspacionina A (**2**) (Cimino et al., 1992) la raspacionina B (**3**) (Cimino et al., 1993b) e altri 16 composti minori **4-19** (riassunto da Ciavatta et al., 2002). La differenza principale tra la struttura della raspacionina e la raspacionina A è l'assenza di sistema eso-metilene in C-10-C-28, e la presenza nel sistema peridrobenezooxepina di ossigeno tra C-4 e C-1, generando lo scheletro triterpenico evidenziato nella raspacionina A.

La struttura e la relativa stereochimica della raspacionina B (3) è stata descritta con metodi spettroscopici, principalmente mediante risonanza magnetica nucleare mono e bidimensionale, suggerendo una struttura relazionata con la raspacionina ma con due gruppi chetoni in C-4 e C-21. Questo metabolita è anche caratterizzato dalla presenza di un anello ciclopropano che è stato evidenziato negli esperimenti HOHAHA e HMBC. Per quanto riguarda i prodotti di minoranza, le loro strutture presentano funzionalizzazioni diverse nei carboni C-4, C-10, C-15 e C-21 (Cimino et al., 1994). La caratterizzazione totale mediante NMR ha portato alla razionalizzazione degli effetti di alcuni sostituenti sugli spostamenti chimici degli atomi nel sistema di peridrobzoesepina (Cimino et al., 1993b).

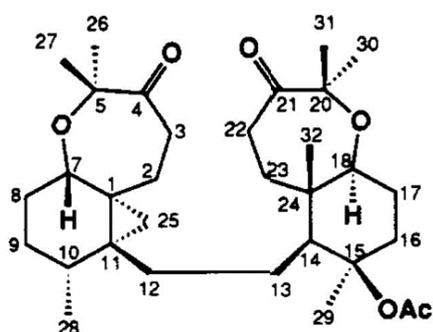
Raspacionina (1)



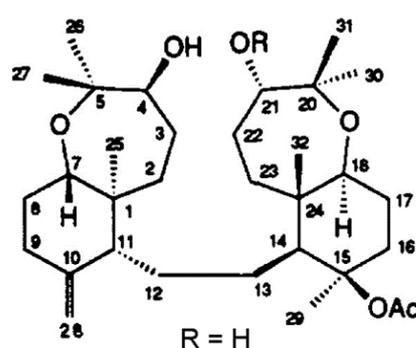
Raspacionina A (2)



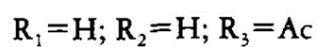
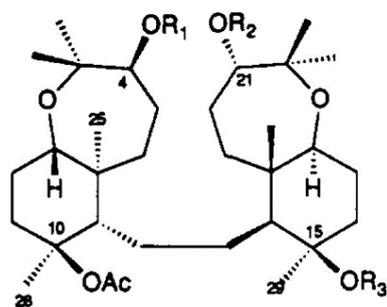
Raspacionina B (3)



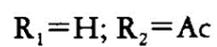
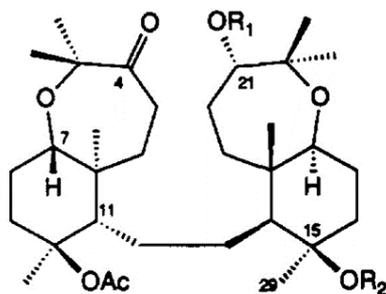
21-Deacetyl-raspacionin (4)



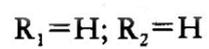
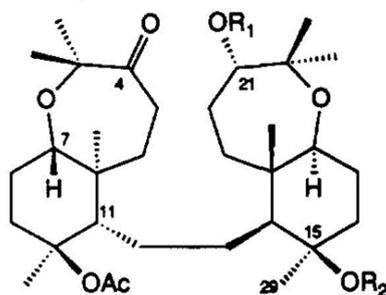
10-Acetoxy-21-deacetyl-28-hydroraspacionina (5)



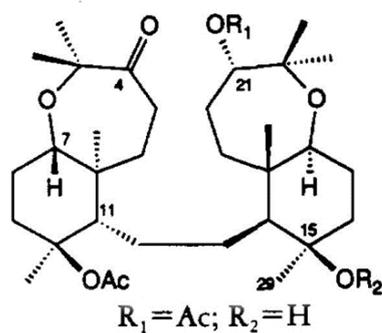
10-Acetoxy-21-deacetyl-4-oxo-28-hydroraspacionina (6)



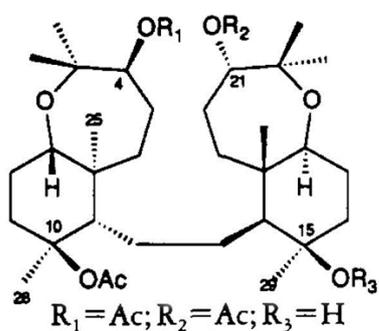
10-Acetoxy-15,21-deacetyl-1-4-oxo-28-hydroraspacionina (7)



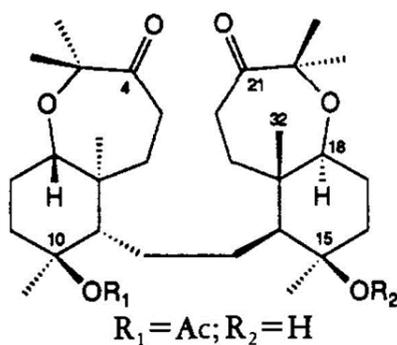
10-Acetoxy-15-deacetyl-4-oxo-28-hydroraspacionina (8)



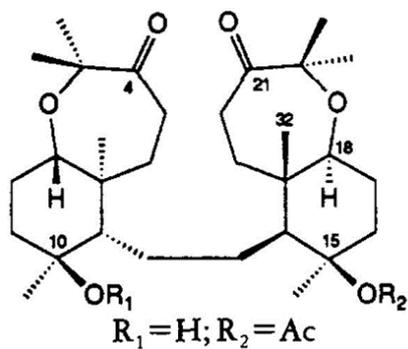
10-Acetoxy-4-acetyl-15-deacetyl-28-hydroraspacionina (9)



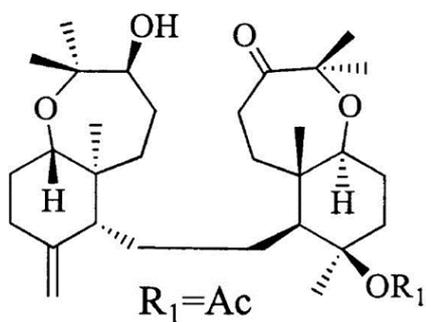
10-Acetoxy-15-deacetyl-4,21-dioxo-28-hydroraspacionina (10)



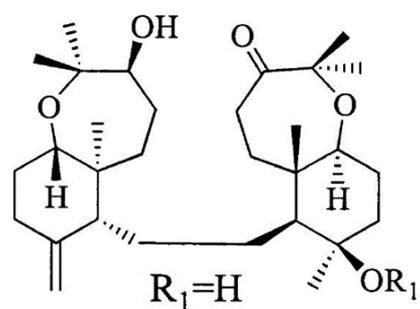
10-Hydroxy-4,21-dioxo-28-hydroraspacionina (11)



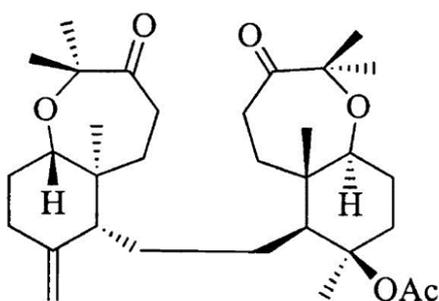
21-Deacetyl-21-oxo-raspacionina (12)



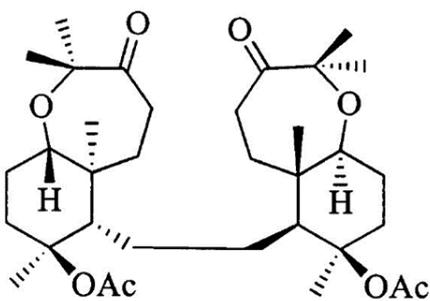
4,21-Dioxo-15-deacetyl-raspacionina (13)



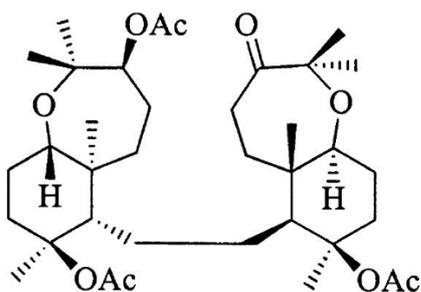
4,21-Dioxo-raspacionina (14)



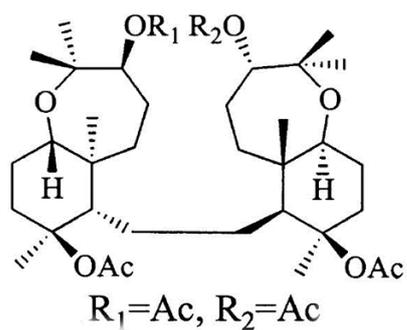
10-Acetoxy-4,21-dioxo-28-hydroraspacionina (15)



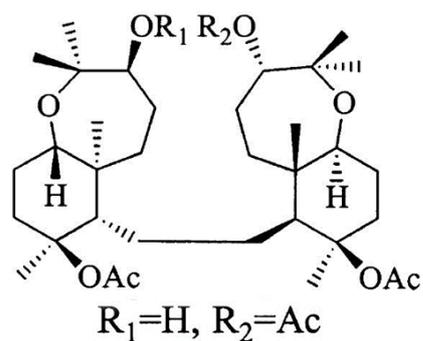
10-Acetoxy-4-acetyl-21-oxo-28-hydroraspacionina (16)



10-Acetoxy-4-acetyl-28-hydroraspacionina (17)



10-Acetoxy-28-hydroraspacionina (18)



10-Acetoxy-21-deacetyl-4-acetyl-28-hydroraspacionina (19)

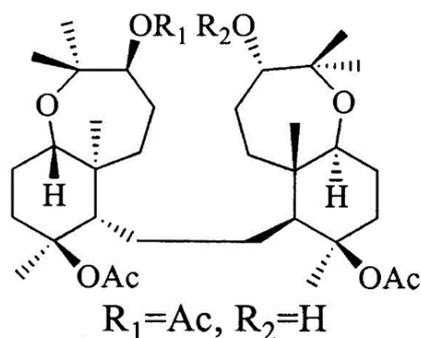


Figura 18: Strutture chimiche dei metaboliti secondati di *Raspaciona aculeata*, estratti e caratterizzati.

I metaboliti secondari isolati da *Raspaciona aculeata* sono stati studiati mediante analisi spettroscopiche, per valutare il grado di purezza dei composti organici estratti e la loro possibile applicazione in futuro. Dai campioni separati nella prima estrazione di *Raspaciona aculeata*, la spettroscopia ha mostrato un alto grado di impurità per molte molecole; per questo motivo, è stato fatto un secondo tentativo per estrarre, isolare e purificare i metaboliti secondari maggiormente prodotti dalla spugna, ottenendo risultati positivi. La cromatografia su colonna ha permesso l'isolamento dei metaboliti secondari maggiormente prodotti dalla spugna, ovvero la raspacionina (1) e la raspacionina A (2). Il primo composto è stato isolato, però, nelle successive analisi spettroscopiche, ha evidenziato un leggero grado di impurità del metabolita che, quindi, non ha consentito la completa purificazione della molecola.

Al contrario, la raspacionina A è stata isolata e purificata dagli altri composti organici presenti nel campione in piccole quantità. La completa purificazione del metabolita ha permesso la caratterizzazione chimica della struttura molecolare.

Di seguito, si mostrano i risultati ottenuti, presentati presso l'Università di Palermo, Italia, 3-5 maggio 2017, nel corso della conferenza "**XIII INCONTRO DEGLI STUDENTI DI DOTTORATO IN ECOLOGIA E SICENZA DEI SISTEMI ACQUATICI**".



XIII INCONTRO DEI DOTTORANDI IN
ECOLOGIA E SCIENZE DEI SISTEMI ACQUATICI



Bioactive Natural Products from Mediterranean Sponge *Raspaciona aculeata*

Andrea Spinelli¹, Maria J. Ortega², Gioele Capillo¹, Marco Bertolino³,

Dyana Vitale¹ and Nunziacarla Spanò¹

¹Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, 98166 Messina, Italy

²Department of Organic Chemistry, Faculty of Marine and Environmental Sciences, University of Cádiz, Spain

³Department of Earth, Environment and Life Sciences, University of Genova, 16132 Genova, Italy

INTRODUCTION: The biodiversity of the marine environment and the associated chemical diversity constitute an enormous source of new substances in the field of the development of bioactive compounds [1]. Marine sponges are considered a very fertile field for the discovery of bioactive natural substances with respect to the diversity of their primary and secondary chemical components and metabolites [2]. Two raspacionins triterpenoids named Raspacionin (1) and Raspacionin A (2) have been isolated from the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata* (Fig. 1) collected from the protected area of "Capo Peloro Lagoon", NE, Sicily (Fig. 2).

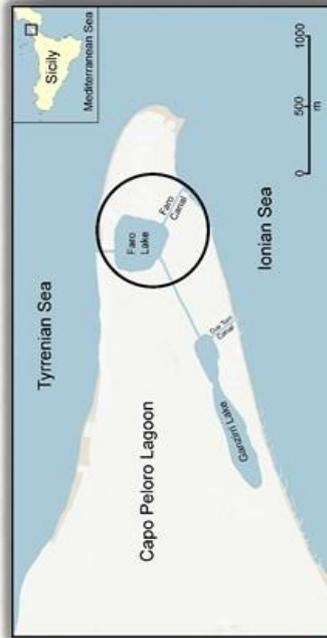


Fig.2: Empty circle indicates the sampling station



Fig. 1: *R. aculeata* photographed in Faro Lake

SAMPLE COLLECTION AND TAXONOMICAL ANALYSIS: Specimens of *Raspaciona aculeata* have been handily collected, by SCUBA diving, from the Faro Lake, at 2 to 5 m depth, during November 2015 to March 2016. Samples preserved in 70% ethanol confirmed the preliminary on field determination thanks to the identification on the basis of spicule preparations at University of Genova. Other samples have been deep frozen and stored at -20°C until extract preparation

CHEMICAL EXTRACTION AND PURIFICATION: Extracts from *R. aculeata* have been obtained by extraction with organic solvents CHCL₃/MeOH (1:1) 500 ml. The marine extracts have been analyzed at University of Cadiz, utilizing Thin Layer Chromatography (TLC) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Column chromatography (CC) has been utilized to select the extracts (Fig. 3). Chemical analysis of fractions and purification of compounds have been obtained with CC and HPLC. Finally, Gas Chromatography and Mass Spectrometry have been utilized for the analysis of extracts.

Compound	Molecular Formula	(M+H) ⁺ /(M-H)
Raspacionin	C ³⁴ H ⁵⁶ O ⁷	577 4104
Raspacionin A	C ³⁴ H ⁵⁶ O ⁸	593 4053

RESULTS AND DISCUSSION: Raspacionin triterpenoids 1-2 (Fig. 4), namely Raspacionin (1), Raspacionins A (2), have been isolated from the Mediterranean sponge *R. aculeata*. These compounds representes the mains metabolites of this sponge species. For the first time the sponge *R. aculeata* from the Capo Peloro Lagoon has has been utilized for extraction of natural products. The obtained triterpenoids are known to exhibit cytotoxicity against a variety of tumor cells, therefore could to be used in the pharmaceutical experiments for test anticancer efficacy in preclinical animal models.

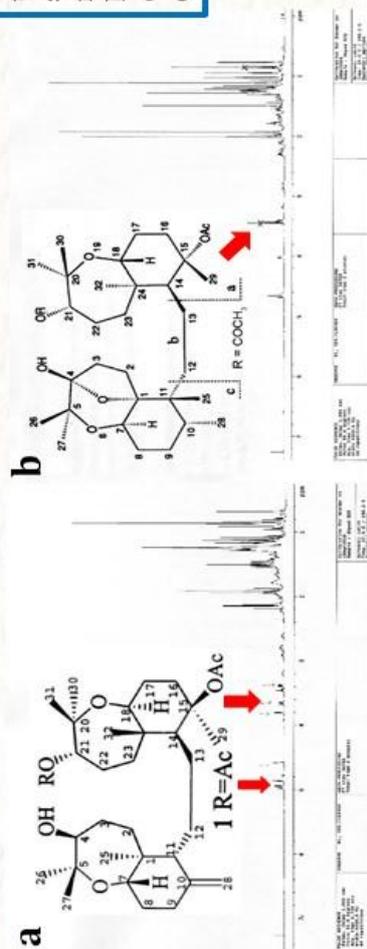


Fig. 4: NMR spectrum of Raspacionin (a) and Raspacionin A (b)

References

- [1] El-Amraoui B, Biard J-F, Uriz MJ, Rifai S, Fassouane A (2010) Antifungal and antibacterial activity of *Porifera* extracts from the Moroccan Atlantic coasts. *Journal de Mycologie Médicale* 20: 70—74.
- [2] Li YX, Kim SK (2015) Triterpenoids as anticancer drugs from marine sponges. Chapter 2. *Marine Bioprocess research Centre, Pukyong National University Busan 608-737, South Korea.*



Fig. 3: Column chromatography (a) and extracts (b)

La completa purificazione del metabolita ha permesso la caratterizzazione chimica della struttura molecolare e, soprattutto, è considerato un ottimo risultato per possibili applicazioni successive. La purificazione di un composto organico rappresenta il primo passo per la caratterizzazione farmacologica e la sperimentazione nel campo dell'applicazione biologica. I metaboliti secondari isolati e purificati sono stati studiati mediante analisi spettroscopica che consente di valutare il grado di purezza dei composti organici estratti e il loro possibile uso applicativo in futuro. Per la prima volta, specie di poriferi della Riserva Naturale Orientata di Capo Peloro sono state utilizzate per scopi chimici e applicati.

4.2.3 Seconda fase sperimentale: Determinazione e quantificazione di carotenoidi in *Raspaciona aculeata*

Le procedure chimiche e le analisi spettroscopiche condotte nel laboratorio del Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali, dell'Università di Messina, hanno consentito l'estrazione e la purificazione chimica di 5 carotenoidi, uno dei quali mai identificato. Dai risultati dell'estrazione e le successive analisi spettroscopiche, è stato possibile analizzarli con HPLC. I cromatogrammi HPLC (a 450 nm) ottenuti per la determinazione dei carotenoidi in *Raspaciona aculeata* sono mostrati in fig. 19. Sono stati evidenziati cinque picchi peculiari; studiati tramite i metodi HPLC-PDA-APCI/MS è stato possibile l'identificazione di quattro di questi picchi che si caratterizzano come mostrato nella tabella 8. I composti identificati sono stati confermati anche confrontando i dati spettrali con gli standard disponibili. I composti α -carotene, β -carotene e renieratene sono stati facilmente caratterizzati in entrambi i campioni di spugna (Fig. 20) e, pertanto, è stata anche possibile una quantificazione specifica (Tab. 8). In particolare, il β -carotene ha mostrato una concentrazione di 6501 ppm e il renieratene di 2570 ppm.

Inoltre, il primo picco principale nel cromatogramma di *R. aculeata* (contrassegnato come 2 in Fig. 19) evidenzia la presenza un composto non identificato che non è mai stato osservato fino ad oggi. Sebbene la quantificazione specifica non è stata possibile, in *R. aculeata*, questo composto è chiaramente molto ben rappresentato all'interno dei pigmenti di questa spugna.

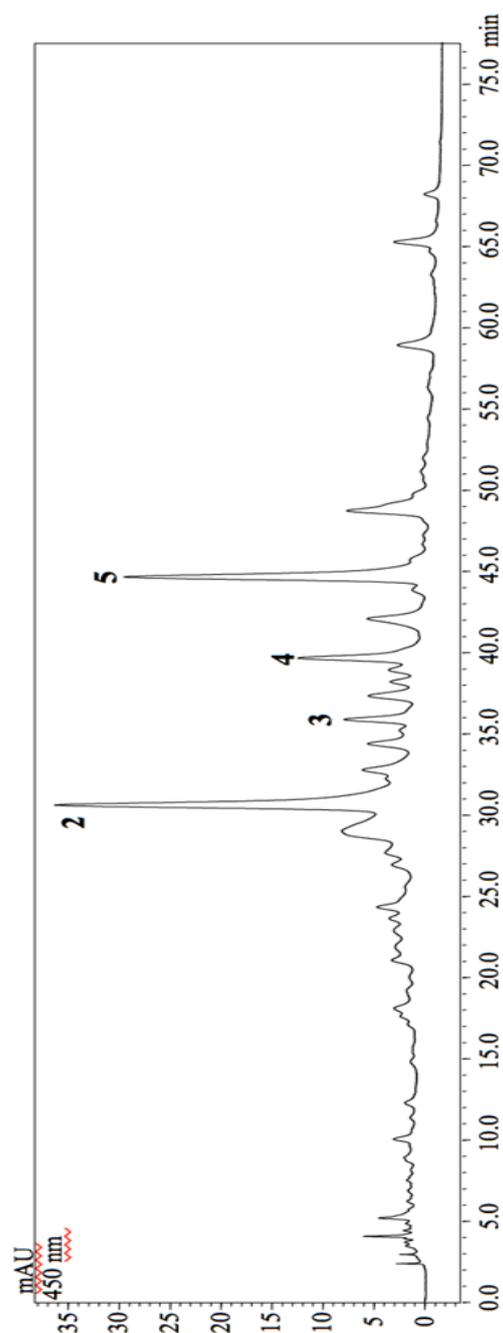


Figura 19: Profilo HPLC dei carotenoidi estratti in *Raspaciona aculeata*.

Per la identificazione dei picchi vedere fig. 20.

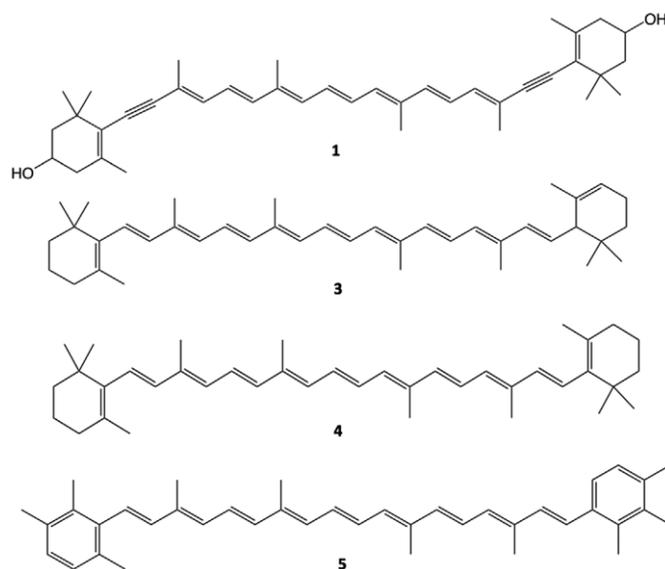


Figura 20: Struttura chimica dei carotenoidi identificati: 1. Alloxantina; 3. α -caroteno; 4. β -caroteno; 5. Renieratene.

Tabella 8: Composti identificati in *Raspaciona aculeata*, con i tempi di ritenzione corrispondenti, dati degli spettri UV-vis e dati APCI (-) / MS, e quantità relative (peso secco)

N.	Composto	Rt (min)	PDA λ max	APCI (-) / MS (m/z)	R.A. ^a (ppm)
1	Alloxanthin	18.51	423, 447, 479	564	n.d.
2	n.i.	30.63	422, 450, 476	596	n.d.
3	α -Carotene	36.04	422, 444, 473	536	304.5
4	β -Carotene	39.79	425, 451, 478	536	650.1
5	Renieratene	44.75	440, 472, 506	528	2570

R. A. = *Raspaciona aculeata*; c n.i. = not identified; d n.d.= not determined

È interessante notare che *Raspaciona aculeata* possiede un pigmento particolare che finora, non è stato caratterizzato. Questo studio fa parte della scienza innovativa il cui obiettivo è quello di trovare pigmenti in matrici viventi insolite e di investigare le fonti nutraceutiche; inoltre, apre la strada alla scoperta di nuovi pigmenti con una struttura molecolare ancora sconosciuta. Questo studio presenta una visione generale sulla presenza di alcuni carotenoidi in *Raspaciona aculeata*. Dopo aver visto che il primo picco (contrassegnato come 2 in Fig. 19) non era mai stato identificato in letteratura, abbiamo proceduto a purificare il campione di spugna, e quindi a eseguire analisi strutturali utili alla caratterizzazione chimica finale.

Tutti i pigmenti separati durante la fase di purificazione sono stati raccolti separatamente in alcune provette. Successivamente, tutte le frazioni raccolte sono state analizzate mediante HPLC al fine di poter identificare il picco sconosciuto. Dai risultati ottenuti, la fase numero 17 sembrava essere il picco del nostro interesse, come si vede nel cromatogramma (Fig. 21).

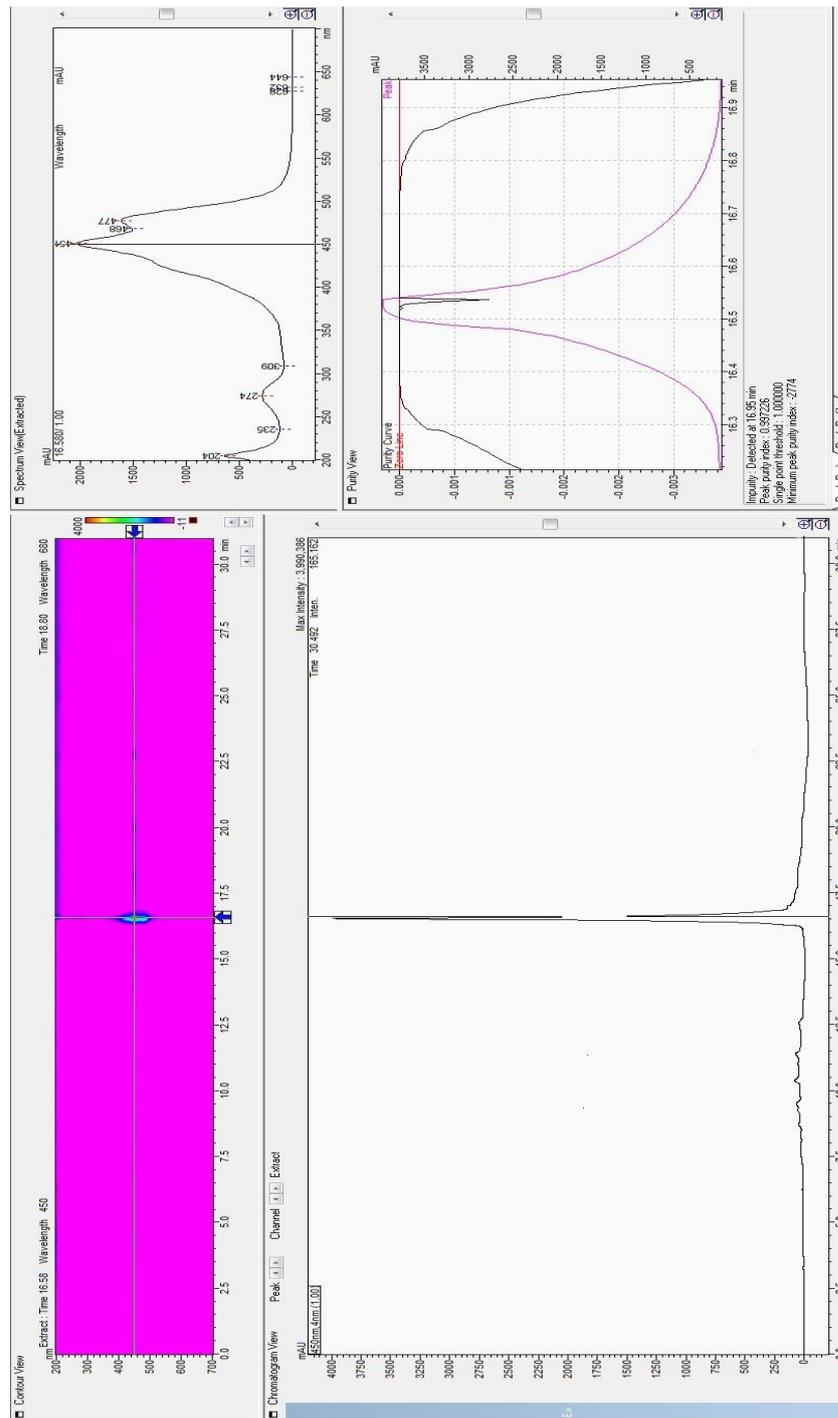


Figura 21: Cromatogramma *Raspaciona aculeata*.

Una volta identificato e purificato il picco, è necessario purificare la più grande quantità possibile di campione per avere circa 2 mg di sostanza in modo che sia possibile caratterizzarlo mediante risonanza magnetica nucleare (NMR). La completa purificazione del nuovo metabolita ancora sconosciuto chimicamente è considerata un ottimo risultato per lo studio sperimentale di dottorato svolto in questi anni di ricerca. Per migliorare la conoscenza e comprendere in dettaglio la struttura chimica del composto, sarebbe utile elaborare molti altri campioni ed eseguire analisi strutturali per la caratterizzazione chimica definitiva mediante risonanza magnetica nucleare (NMR).

4.3 Conclusioni

Raspaciona aculeata non era mai stata osservata, identificata tassonomicamente e segnalata nel lago di Faro, dove è stata rinvenuta per la prima volta nel 2016 durante le operazioni di campionamento, rappresentando, quindi, il “first record” della specie nel lago di Faro e nella Riserva Naturale Orientata di Capo Peloro. Gli studi attualmente riportati, ampliano le nostre conoscenze, in termini di biodiversità, su alcune riserve naturali. Costituiscono, inoltre, un passo “aggiunto” nello studio degli habitat delle lagune del Mediterraneo meridionale. Le indagini oggetto di questa tesi aggiungono informazioni utili all'ecologia e alla chimica di alcune specie di poriferi di interesse scientifico. I metaboliti secondari isolati e purificati che sono stati studiati mediante analisi spettroscopica hanno permesso di valutare il grado di purezza dei composti organici estratti e la loro possibile applicazione in futuro. Per la prima volta, specie di poriferi della riserva di Capo Peloro sono state utilizzate per scopi chimici e applicati. La completa purificazione del metabolita secondario, raspacionina A, ha permesso la caratterizzazione chimica della struttura molecolare e, soprattutto, è considerato un risultato eccellente per possibili applicazioni successive.

La purificazione di un composto organico rappresenta il primo passo per la caratterizzazione farmacologica e la sperimentazione nel campo dell'applicazione biologica. Attraverso la caratterizzazione chimica dei metaboliti secondari, si potrebbe studiare la funzione ecologica del composto organico e le sue applicazioni. Inoltre, i risultati di questo studio si riferiscono a un tentativo di sviluppo scientifico per studiare habitat unici, con caratteristiche chimico-fisiche molto particolari nonostante le difficoltà di un ambiente minacciato dall'impatto antropico. Nella seconda fase sperimentale, per la prima volta, i carotenoidi di *Raspaciona aculeata* sono stati identificati e caratterizzati. Sono stati identificati cinque picchi peculiari associati a carotenoidi specifici; quattro di questi sono stati caratterizzati e uno di loro non è mai stato identificato in letteratura. La scoperta di un nuovo pigmento peculiare, purificato durante la mia ricerca di dottorato, apre la strada allo studio di nuovi pigmenti, con una struttura molecolare sconosciuta in questa spugna, e probabilmente, con un'attività biologica interessante dal punto di vista applicativo. Questo studio presenta una visione generale sulla presenza di alcuni carotenoidi in *Raspaciona aculeata*. Per migliorare la conoscenza e comprendere la differenza e la somiglianza con altri composti, sarebbe utile elaborare molti altri campioni ed eseguire analisi strutturali per la caratterizzazione chimica definitiva.

5. Capitolo III: Accrescimento e composizione biochimica di *A. platensis* in differenti condizioni sperimentali: usi potenziali

5.1 Stato dell'arte e obiettivi

È stato proposto di studiare l'ecologia di *Arthrospira* (ex *Spirulina*) *platensis*, una specie di Cyanobacteria, al fine di valutare la capacità di sintetizzare biomolecole efficienti in condizioni di salinità e pH sperimentali di laboratorio, utili in seguito, in nutraceutica applicativa, conosciuta la sua capacità di produrre proteine, utilizzate come integratori alimentari, in particolare nelle diete per persone in sovrappeso (Miczke et al., 2016). Il suo alto contenuto nutrizionale giustifica la sua produzione in quantità sufficientemente elevate da permetterne la commercializzazione in ambito nazionale ed internazionale (Cohen, 1997). *Arthrospira maxima* contiene tra il 50 e il 60% di proteine grezze; lo spettro dei suoi aminoacidi è simile a quello di altri microrganismi e modelli proteici nutrizionali come uova o latte, anche se è carente in metionina, cisteina e lisina (Ciferri, 1983). *Arthrospira* spp. può essere facilmente coltivata, in bioreattori, sistemi acquosi aperti, naturali e artificiali, in cui il mezzo di coltura liquida contiene sali come bicarbonato di sodio e nitrati, che contribuiscono alla alcalinità del mezzo di coltura, uno dei fattori più determinanti per la produzione (Becker, 1982). Lo scopo di una revisione di opere che includono aspetti farmacologici, è legato alla conoscenza delle varie e possibili applicazioni farmaceutiche di *Arthrospira* spp. e i suoi componenti (Belay, 2002): azione antiallergica (Kim et al., 1998); effetto antianemico (Chamorro et al., 1996); azione anticoagulante (Chamorro et al., 1996); azione antinfiammatoria (Romay, 1998); protezione cardiovascolare (Paredes-Carbajal et al., 2009). Durante il mio studio sono state eseguite ricerche ecologiche e biochimiche su *A. platensis*, isolata nel "Parco Nazionale della Doñana" (Andalusia, Spagna).

Al fine di verificare la possibilità di produzione di massa in ambiente naturale ai fini biotecnologici, è stata studiata la crescita e la composizione biochimica di questa specie in condizioni di laboratorio, con differente salinità e pH, analizzando l'adattabilità dell'alga e il suo potenziale biochimico. La disponibilità di moderne tecniche di analisi per le macromolecole primarie quali proteine, carboidrati e lipidi ha permesso di studiare la possibile variazione dei componenti biochimici come risultato di adattamento generato da mezzi di coltura sperimentali con diversa salinità e pH. La ricerca ecologica su *A. platensis* è stata effettuata con quattro terreni di coltura con salinità crescente, dal 12,11‰ a un massimo di 34,51‰. L'attività di ricerca è stata condotta nel corso di un'esperienza Erasmus interdisciplinare, di sei mesi, presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Cadice (Spagna) utilizzando un protocollo comune, con il supporto della Dott.sa. Ana Bartual Magro e della Dott.sa Carmen Garrido con l'obiettivo di ampliare le conoscenze sulle tecniche di coltura algale, estrazioni e analisi biochimiche. *A. platensis* è un cianobatterio che ha una grande importanza nutrizionale ed economica, industrialmente molto sviluppato in Europa, negli Stati Uniti e in Cina (Khan et al., 2005). I principali limiti attuali sono legati ai costi di produzione, quindi ricercare terreni di crescita più economici potrebbe rappresentare un vantaggio importante per l'uso biotecnologico. Questo cianobatterio cresce naturalmente in acque salmastre e alcaline, in ambienti in cui altre specie di Cyanobacteria difficilmente sopravviverebbero. La possibilità di coltivare questa specie in ambienti salini, costieri o paludosi è stata poco studiata fino ad oggi, ma sarebbe un modo potenzialmente utile per aumentare la produzione di massa. Pertanto, l'obiettivo generale di questo studio è stato analizzare la sua adattabilità e l'accrescimento in condizioni sperimentali di laboratorio con salinità e pH variabile, e determinare l'effetto di questi due fattori, valutando la sopravvivenza, la cinetica di accrescimento e l'adattamento biochimico del cianobatterio in condizioni di laboratorio.

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 Condizioni generali

È stato utilizzato un ceppo di *A. platensis* isolato nel 2015 nelle zone umide del Parco Naturale della Doñana (sud-ovest della penisola iberica). Fino al suo utilizzo negli esperimenti, questo ceppo è stato mantenuto nella “Collezione” del Centro Andaluso della Scienza e la Tecnologia Marina (CACYTMAR), presso l’Università di Cadice, (Spagna). La coltura originale è stata mantenuta a condizioni 14:10 L: D con un'intensità di 60 micromol quanta m⁻² s⁻¹ e una temperatura costante di 20 °C attraverso semina continua (Fig. 21). Il mezzo di coltura utilizzato è quello descritto da Schlösser (1994). Questo terreno è stato leggermente modificato per *A. platensis* da Ogawa e Terui (1970) per evitare la formazione di precipitati (Aiba e Ogawa, 1977; Schlösser, 1994) (Tab. 9). La coltura è stata mantenuta in un recipiente in vetro da 1 litro, sotto luce continua di 60 μmol m⁻² s⁻¹, a 20°C e movimento continuo (Fig. 21).



Figura 21: Fotografia che mostra la coltura “stock” genitoriale di *Arthrospira platensis* mantenuta in movimento continuo.

Tabella 9: Composizione del mezzo utilizzato per la coltura di *A. platensis*, (modificato da Aiba and Ogawa, 1977; Schlösser, 1994)

Componente (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Soluzione	Quantità usata	Concentrazione finale
Soluzione I	500 ml	-	-
NaHCO ₃	-	13.61 g	1.62 x 10 ⁻¹
Na ₂ CO ₃	-	4.03 g	3.80 x 10 ⁻²
K ₂ HPO ₄	-	0.50 g	2.87 x 10 ⁻³
Soluzione II	500 ml	-	-
NaNO ₃	-	2.5 g	2.94 x 10 ⁻²
K ₂ SO ₄	-	1.0 g	5.74 x 10 ⁻³
NaCl	-	1.0 g	1.71 x 10 ⁻²
MgSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.2 g	8.11 x 10 ⁻⁴
CaCl ₂ · 2H ₂ O	-	0.04 g	2.72 x 10 ⁻⁴
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.01 g	3.60 x 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	-	0.08 g	2.15 x 10 ⁻⁴
Soluzione "Trace Metals"		1 ml	-
Soluzione "Vitaminas"		1 ml	-

Per gli esperimenti di fluttuazione, sono stati utilizzati quattro terreni di coltura con salinità compresa tra 12,11 psu e 34,51 psu, pH tra 9,37 e 7,48 (Tab. 10), e con una temperatura costante di 20 °C. Il mezzo di coltura 1 è stato prodotto utilizzando il "mezzo Schlosser" 1994 "con salinità 12.11; Il mezzo 4 è stato ottenuto utilizzando acqua umida della Doñana con salinità 34.51 psu. Il mezzo di coltura 2 si è ottenuto miscelando il mezzo di coltura 1 e il terreno di coltura 4 in concentrazione 90:10 con una salinità finale di 14.83 psu; il terreno di coltura 3 è stato realizzato nello stesso modo, ma con diverse concentrazioni dei terreni di coltura 1 e 4, rispettivamente 50:50, con una salinità finale di 22,57 psu.

Tabella 10: Caratteristiche fisico-chimiche dei mezzi di coltura utilizzati per gli esperimenti.

	Salinità	Conductibilità (mScm ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH
Terreno 1 (controllo)	12.11	20.3	20	9.37
Terreno 2	14.83	23.3	20	9.31
Terreno 3	22.57	35.8	20	8.88
Terreno 4	34.51	52.4	20	7.48

5.2.2 Disegno e studio sperimentale

Il disegno sperimentale è stato necessario per quantificare l'adattabilità e la resistenza di *A. platensis* a diverse condizioni (salinità e pH) ed è stato effettuato sulla base di un'analisi di fluttuazione (Luria e Delbrück, 1953). Così, si può vedere non solo la capacità di adattamento di una specie ad un agente selettivo, ma dedurre se questo adattamento è causa di mutazioni spontanee casuali o indotte dall'agente selettivo durante il processo adattativo (mutazione mirata). Si sono stabiliti due serie di esperimenti che abbiamo chiamato SET 1 e SET 2 in tutto il manoscritto. Nel SET 1, si coltiva un numero basso di tricomi ($n = 100$ in provette da 10 ml in terreni di coltura sperimentali (da 1 a 4). La ragione per la bassa densità delle cellule è assicurata dall'assenza di mutanti resistenti ai cambiamenti di salinità testati inizialmente nell'esperimento. Allo stesso tempo, è anche importante notare che prima dello sviluppo dell'esperimento le cellule devono essere ri-clonate a partire da un singolo tricoma evitando di includere le mutazioni spontanee accumulate. Le colture sono state fatte crescere fino al raggiungimento di 105 tricomi/ml. Durante questo periodo di crescita alcune cellule potrebbero essere mutate spontaneamente e dare origine a un genotipo resistente. Una volta che le colture raggiungono la concentrazione cellulare desiderata di 105 tricomi/ml, viene aggiunto a tutte le colture del SET 1 l'agente selettivo a concentrazione letale, precedentemente determinata (cioè, salinità e pH a differente concentrazione, nel nostro caso). L'agente selettivo (salinità o pH) sarà letale per i genotipi sensibili ma le cellule resistenti potranno continuare a crescere, essendo in grado di ottenere un inoculo di *A. platensis* suscettibile per essere coltivato in maniera massiccia in ambiente salino o con pH dell'ambiente marino. Simultaneamente, si prepara un secondo set (SET 2) inoculando direttamente 105 cellule provenienti dalla stessa popolazione genitoriale di quelle del SET 1, ricordando di averle ottenute mediante clonazione di un singolo tricoma.

Questo secondo set viene inoculato direttamente in presenza dell'agente selettivo alla stessa condizione di salinità letale o pH. Entrambi i set sono cresciuti per circa 15 giorni. Dopo questo tempo, si determina il numero di cellule resistenti in ciascuna delle colture. Nel caso in cui la resistenza all'agente selettivo si sviluppa in risposta diretta alla presenza dell'agente, la probabilità che ogni cianobatterio possa sopravvivere al cambiamento di salinità o pH è costante. Pertanto, ci si aspetta che la proporzione di cellule resistenti si distribuisca secondo una distribuzione di Poisson. In questo caso, la varianza delle repliche sarà uguale al valore medio ($V = M$). Nel caso dell'apparizione della mutazione da un fenomeno casuale, ciascuna coltura parallela presenterà una diversa probabilità di sviluppare resistenza in ogni divisione cellulare. Pertanto, ci saranno terreni dove una resistenza che si verifica presto nel tempo e quindi la maggior parte della progenie sarà resistente. In altre colture, la mutazione che conferisce la resistenza può apparire in una delle ultime divisioni cellulari, risultando in un basso numero di cellule resistenti. Ci saranno culture in cui la mutazione non ha luogo, e quindi tutte le cellule saranno sensibili e non sopravvivranno alla concentrazione letale dell'agente selettivo. Nel caso dell'ipotesi di "mutazione spontanea" la distribuzione di probabilità pertanto non corrisponde ad una distribuzione di Poisson e di conseguenza la varianza di queste repliche sarà superiore alla media ($V > M$). Il SET 2 è considerato come controllo dell'esperimento e misura la varianza della popolazione genitoriale. La variazione tra le provette mostra solo l'errore sperimentale. Nel caso di questo Set, la probabilità che appaiano tante mutazioni preselettive come le post-selettive per l'agente selettivo è alta, perché le colture sono state inoculate con una concentrazione cellulare elevata. Pertanto, la distribuzione di cellule resistenti corrisponderebbe di nuovo ad una distribuzione di Poisson ($V = M$). Il rapporto varianza/media del SET 1 e 2, quindi, viene utilizzato per fare la distinzione tra la comparsa di mutanti casuali (rapporto V/M set 1 $>$ rapporto V/M set 2) o di mutazione diretta (rapporto V/M set 1 $= V/M$ set 2).

Gli esperimenti sono stati avviati con $N_0 = 24.000$ tricomi/ml, ottenuti da un singolo tricoma del terreno di coltura “stock”. Quando è stato inoculato *A. platensis* nel terreno di coltura 1 e raggiunti 42.000 tricomi/ml, i tricomi sono stati trasferiti in diverse provette sterili con 10 ml di coltura per la sperimentazione con altri terreni (dal terreno 1 al terreno 4) (Tab. 10). Come illustrato nella figura 22, sono stati preparati due diversi gruppi di colture sperimentali (SET 1 e SET 2). Nel primo (SET1), sono stati inoculati, in 15 provette, 10 ml di coltura con $N_0 = 24.000$ tricomi/ml di *A. platensis* con un mezzo di Tipo 1 chiamato anche mezzo di controllo (Tab. 10) fino al raggiungimento di $N_t = 63.000$ tricomi/ml e successivamente inoculati nei mezzi sperimentali, mediante filtrazione. Per il secondo esperimento (SET 2) 20 aliquote di *A. platensis* con $N_0 = 42.000$ tricomi/ml provenienti dallo stesso “stock” del SET 1 sono state trasferite separatamente in una serie di 5 provette contenente ognuna un mezzo sperimentale (da 1 al 4) (5 ml). Tutte le colture sono state mantenute in agitazione mediante uno shaker orbitale a velocità costante (Fig. 23). Le colture del SET 1 riseminate sono state osservate per 12 giorni contando le cellule resistenti in ciascuna coltura. Le colture del SET 2 sono state osservate per 15 giorni e successivamente sono state contate le cellule resistenti in ciascuna coltura.

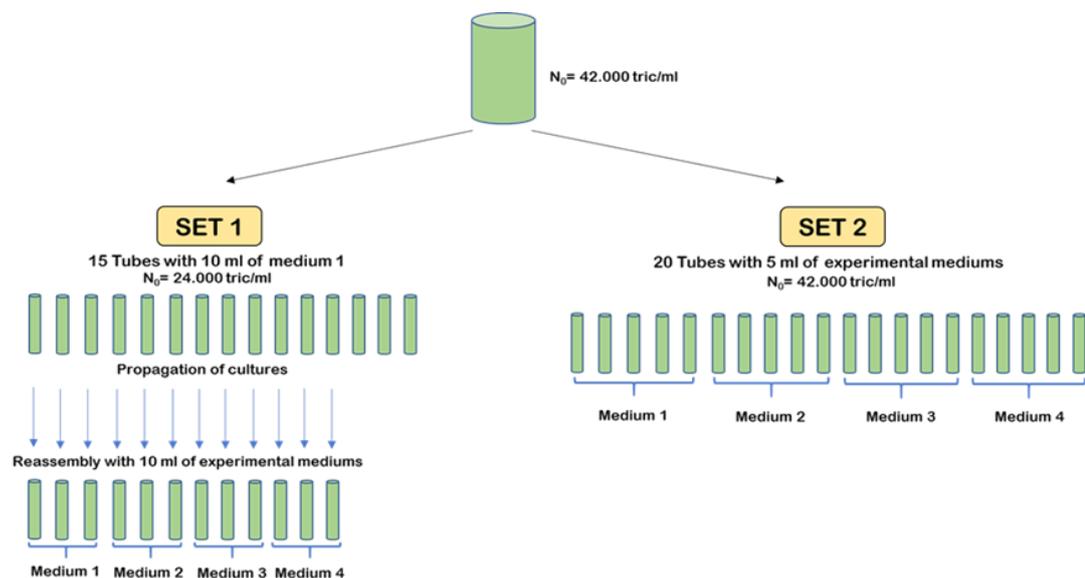


Figura 22: Schema del disegno sperimentale per i SET 1 e SET 2.

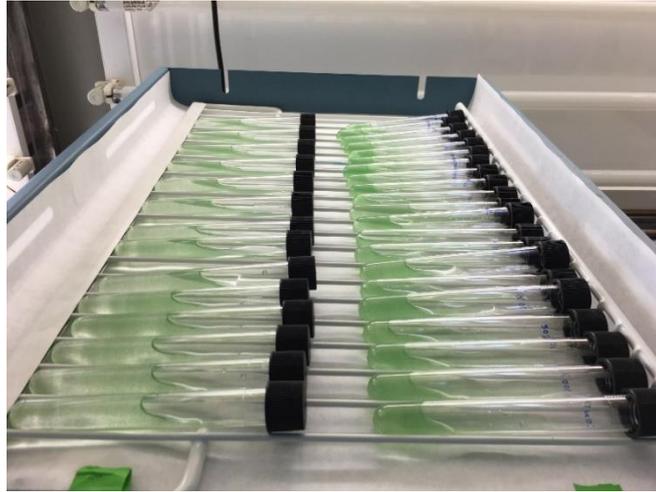


Figura 23: Sets di colture sperimentali di *Artrhospira platensis* in provette.

5.2.3 Calcolo del tasso di mutazione spontanea

Il calcolo del tasso di mutazione spontanea è di notevole interesse in quanto offre elementi per comprendere le capacità evolutive degli organismi (Klug and Cummings, 1997). Nella presente tesi si propone il metodo di López-Rodas et al. (2001) per colture in terreno liquido. Questo metodo si basa sul fatto che il numero di mutazioni in una serie di colture simili deve essere distribuito secondo la distribuzione di Poisson. Pertanto, il numero medio di mutazioni per coltura è calcolato dalla proporzione di colture del SET 1 che non contengono tricomi resistenti al momento del test (P_0):

$$P_0 = e^{-\mu (N_t - N_0)}$$

dove N_t e N_0 corrispondono al numero di cellule finali e iniziali e μ è il tasso di mutazione. Conoscendo il valore P_0 si può ottenere il tasso di mutazione nel seguente modo:

$$\mu = -\text{Loge } P_0 / (N_t - N_0)$$

5.2.4 Quantificazione cellulare

La crescita cellulare è stata misurata ogni 5 giorni seguendo la variazione di assorbanza a 680 nm con uno spettrofotometro (modello 20 Spetronic Bausch e Lomb). Inoltre, il conteggio delle cellule è stato fatto utilizzando un emocitometro Neubauer (Fig. 24). Il peso secco (DW) è stato valutato utilizzando la relazione tra peso secco e assorbanza. Al fine di paragonare i dati di assorbanza relativi alla crescita cellulare con il numero dei tricomi resistenti, presenti nei campioni, è stata utilizzata una curva di calibrazione costruita per ogni terreno di coltura. Di seguito sono riportate le curve di calibrazione dei terreni di coltura utilizzati nell'esperimento (Fig. 25-26-27-28) in cui l'asse x rappresenta l'indice di assorbanza misurato e l'asse y il numero di tricomi contati su ml (tricomi/ml).



Figura 24: Fotografia che mostra la maglia della camera Neubauer utilizzata per il conteggio cellulare dei campioni.

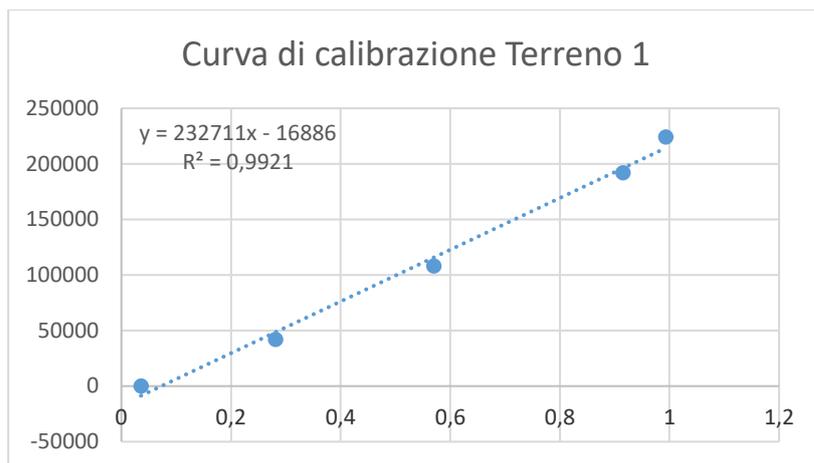


Figura 25: Curva di calibrazione (Terreno 1), tra assorbanza/numero tricomi contati in ml.

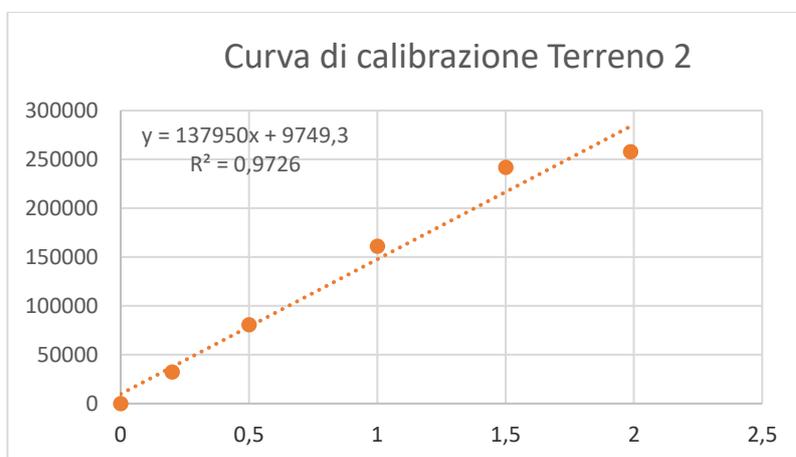


Figura 26: Curva di calibrazione (Terreno 2), tra assorbanza/numero tricomi contati in ml.

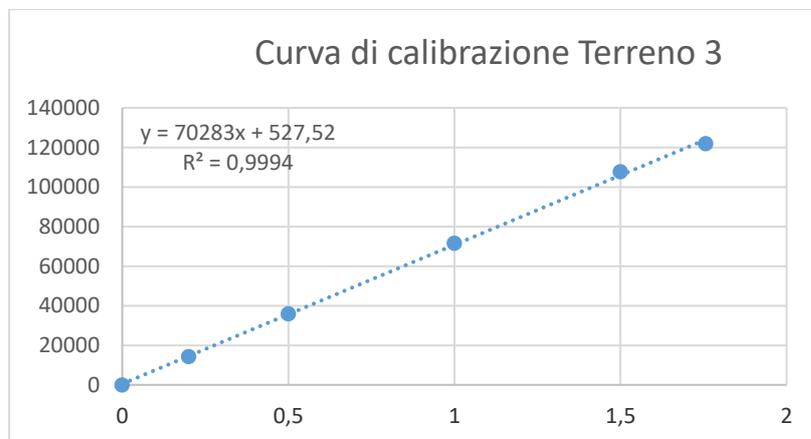


Figura 27: Curva di calibrazione (Terreno 3), tra assorbanza/numero tricomi contati in ml.

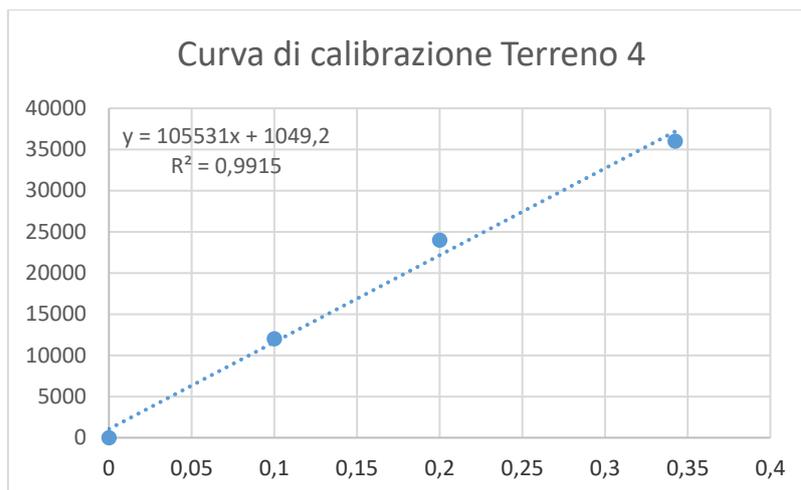


Figura 28: Curva di calibrazione (Terreno 4), tra assorbanza/numero tricomi contati in ml.

Il monitoraggio della crescita delle colture dei rispettivi SET 1 e SET 2 è stato effettuato mediante spettrofotometria, che è il metodo più utilizzato per stimare la concentrazione di solidi sospesi (tricomi di *A. platensis* nel nostro caso) in un campione. Questa metodologia ha una precisione elevata e affidabile, a patto che vengano presi in considerazione elementi quali la dimensione delle cellule, la forma cellulare e la presenza di precipitati. La lettura spettrofotometrica per le colture di *A. platensis* è stata effettuata su una lunghezza di 600 nm (Becker, 1982). Le linee di calibrazione tra assorbanza e numero di tricomi, dei terreni di coltura, hanno permesso di calcolare le curve e i tassi di crescita nei mezzi sperimentali.

5.2.5 Pretrattamento dei campioni

La biomassa dei campioni sperimentali (dal Terreno 1 al 4) del SET 1, che hanno precedentemente evidenziato un tasso di accrescimento positivo, sono stati utilizzati per le analisi analitiche al fine di quantificare le proteine, i carboidrati e i lipidi costituenti. A tal scopo è stato effettuato un pretrattamento dei campioni basicamente riassunto in due tappe: 1) Concentrazione della biomassa mediante centrifugazione. 2) Liofilizzazione della biomassa.

La centrifugazione è stata eseguita con una centrifuga a controllo digitale “Selecta” che permette di analizzare fino a 4 falcon da 50 ml. Tutta la biomassa raccolta è stata concentrata mediante centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato rimosso e la biomassa concentrata è stata risciacquata con acqua distillata. Il processo di risciacquo è stato ripetuto due volte e in entrambi i casi il surnatante è stato rimosso. La biomassa concentrata è stata trasferita in matracci a fondo arrotondato, lavata con acido, sciacquata e asciugata. Questi matracci hanno un collo adattabile ai liofilizzatori usati per questi campioni. Prima della liofilizzazione, la biomassa era stata congelata nei matracci a -80°C per 24-72 ore. Trascorso questo tempo, e tentando di mantenere le condizioni di congelamento, i campioni sono stati trasferiti in un liofilizzatore Lyoalfa 10/15 Telstar. La liofilizzazione è stata eseguita a 0,4 mbar e per 24 ore (Fig. 29). Dopo la liofilizzazione, la biomassa perfettamente liofilizzata visivamente è stata conservata in provette separate di polipropilene, in condizioni di buio e lontano dall'umidità, fino alle successive analisi.



Figura 29: Fotografia che mostra il processo di liofilizzazione nei matracci di fondo rotondo durante 24 h.

5.2.6 Metodi analitici della biomassa (Proteine, lipidi, carboidrati)

Usando i liofilizzati ottenuti sono state effettuate le seguenti analisi:

Composizione elementare della biomassa

Per l'analisi elementare (CN) della biomassa, è stato utilizzato un analizzatore LECO CHNS-932, "Leco Corporation", appartenente ai "Servizi Centrali di Scienza e Tecnologia" dell'Università di Cadice. Ogni campione è stato analizzato in duplicato.

Concentrazione di proteine totali della biomassa

Tutte le estrazioni sono state realizzate in duplicato. Il contenuto proteico totale del campione è stato stimato tramite fattori di conversione azoto-proteina pubblicati in "Summative Mass Analysis of Algal Biomass - Integration of Analytical Procedures Laboratory Analytical Procedure (LAP)" by the NREL: National Renewable Energy Laboratory rivisto in dicembre 2015. Pertanto, il contenuto di proteine è stato calcolato in base all'espressione:

$$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ Nitrogen} \times \text{N_factor}$$

dove % Nitrogen è il contenuto di azoto determinato dall'azoto elementare e N_factor è il fattore di conversione specifico, che per le alghe è 4,78. (Lourencø et al., 2004; Templeton and Laurens, 2015).

Analisi delle proteine solubili della biomassa

Per l'analisi delle proteine solubili della biomassa è stata utilizzata la procedura descritta per il kit di reagenti Lowry di BioRad DC, basato sulla procedura tradizionale di Lowry (1951). L'analisi è un dosaggio colorimetrico che varia per concentrazione di proteine dopo la loro solubilizzazione con il detergente (Sodio Dodecil Solfato, SDS).

Il test si basa sulla reazione della proteina con una soluzione alcalina di tartrato di rame e reagente di Folin. Ci sono due fasi che portano allo sviluppo del colore: la reazione tra proteine e rame in un mezzo alcalino e la conseguente riduzione del reagente di Folin da parte della proteina trattata con rame. Lo sviluppo del colore è dovuto principalmente agli amminoacidi tirosina e triptofano e, in misura minore cisteina, o cisteina e istidina. Le proteine producono una riduzione del reagente di Folin con perdita di 1, 2 o 3 atomi di ossigeno, producendo così una o più delle diverse specie ridotte possibili aventi un caratteristico colore blu con un'assorbanza massima a 750 nm. La lettura di assorbanza è stata realizzata con un lettore multidisco Tecan® Infinite-200 Pro. La retta di calibrazione di questo metodo viene eseguito con BSA, albumina di siero bovino. Tutte le estrazioni sono state eseguite in duplicato (Fig. 30) e le letture di assorbanza in triplicato (Fig. 31).

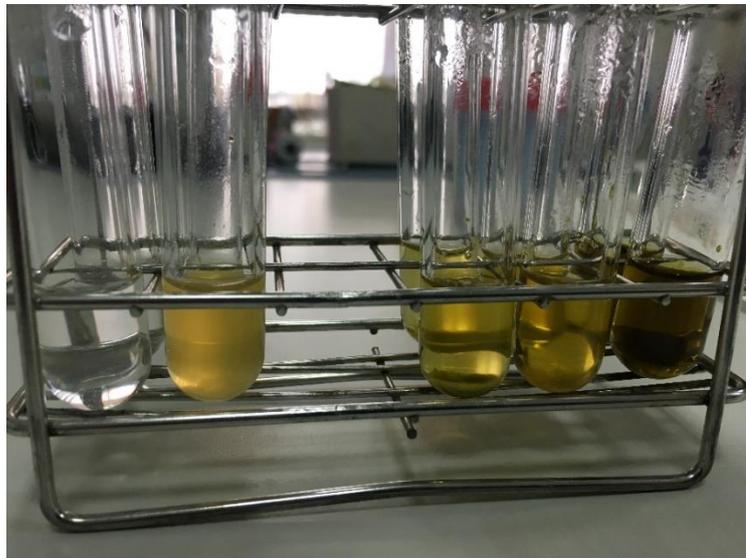


Figura 30: Fotografia che mostra l'aspetto delle proteine solubilizzate dopo un tempo d'incubazione.

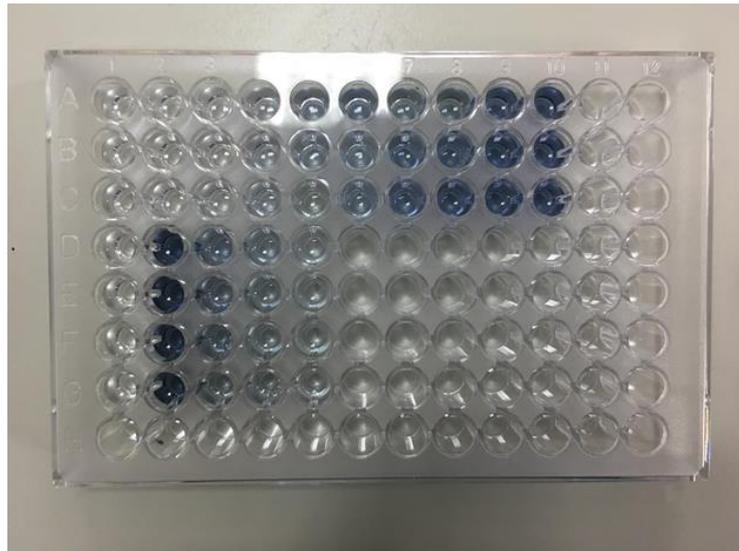


Figura 31: Fotografia che mostra una piastra 96 pollici con curva di calibrazione (fila superiore) e analisi dei campioni in triplicato.

Analisi dei lipidi totali

Per le analisi dei lipidi totali (LT) si è utilizzato il metodo colorimetrico solfo-fosfo-villina (Mishra et al., 2014). Tutte le estrazioni sono state eseguite in duplicato. I lipidi reagiscono con acido solforico e con il calore formando ioni di carbonio. In un secondo stadio, questi, in presenza di fosfo-villina, danno una colorazione rosa che viene determinata a 530-540 nm. L'intensità del colore apparso è proporzionale alla concentrazione dei lipidi totali presenti nel campione analizzato. La linea di calibrazione di questo metodo è fatta con gli standard dell'olio di colza. Il metodo applicato è STATO adattato per la biomassa dei cianobatteri.

Analisi dei carboidrati totali

I carboidrati totali sono stati quantificati con il metodo di Dubois et al. (1956), usando il glucosio come standard. Tutte le estrazioni sono state eseguite in duplicato. Il contenuto totale di carboidrati in mezzi liquidi può essere determinato come zuccheri semplici, oligosaccaridi, polisaccaridi e loro derivati che danno un colore arancio stabile quando reagiscono con il fenolo e in presenza di acido solforico.

Il colore ottimale è misurato a 483 nm. La linea di calibrazione è stata realizzata con modelli di glucosio e con un pattern di amido di mais che è stato incluso per controllare il recupero dei carboidrati nella determinazione colorimetrica.

5.3 Risultati e discussione

5.3.1 Prima fase sperimentale: Crescita e acclimatazione in terreni a salinità crescente

Lo studio di crescita di *A. platensis* durante i primi 12 giorni di inoculazione nei mezzi sperimentali ha permesso di determinare la cinetica del processo nella sua fase di adattamento, fase esponenziale e fase stazionaria, determinando i fattori per la conoscenza dello sviluppo di questo cianobatterio. Le figure 32 e 33 mostrano le curve di crescita ottenute per *A. platensis* nei due SETs sperimentali studiati. Lo sviluppo della coltura ha dimostrato che *A. platensis* è in grado di crescere sotto un'ampia gamma di valori di salinità e pH, sebbene è stato osservato che questi parametri influenzano la produzione di biomassa e quindi il tasso di crescita, poiché sono fattori limitanti, in accordo con studi precedenti (Pelizer, 2002).

Le tabelle 11 e 12 mostrano i dati di assorbanza misurati nei due SETs, nel corso dell'esperimento (12 giorni per il SET 1 riseminato e 15 giorni per il SET 2), analizzati con uno spettrofotometro (modello 20 Spetronic Bausch e Lomb) ad una lunghezza d'onda di 680 nm. Le tabelle 13 e 14 mostrano le concentrazioni dei due SETs espresse in numero di tricoli/ml, ottenute nel corso dell'esperimento (12 giorni per il SET 1 riseminato e 15 giorni per il SET 2) utilizzando un emocitometro Neubauer. Le figure 32 e 33 mostrano le curve di crescita di *A. platensis* in terreni di coltura sperimentali con diversa salinità e pH durante un periodo di 12 giorni per il SET 1 (riseminato) e 15 giorni per il SET 2.

Tabella 11: Dati di assorbanza del SET 1, misurati in 12 giorni, con spettrofotometro (modello 20 Spetronic Bausch e Lomb) a 680 nm.

SET 1	Assorbanza giorno 1 (media)	Assorbanza giorno 5 (media)	Assorbanza giorno 12 (media)
TERRENO 1 (controllo)	0,2825	1,3782	1,7537
TERRENO 2	0,3497	0,9667	1,5528
TERRENO 3	0,2548	0,5304	0,8052
TERRENO 4	0,4153	0,3654	0,3257

Tabella 12: Dati di assorbanza del SET 2, misurati in 15 giorni, con spettrofotometro (modello 20 Spetronic Bausch e Lomb) a 680 nm.

SET 2	Assorbanza giorno 1 (media)	Assorbanza giorno 5 (media)	Assorbanza giorno 10 (media)	Assorbanza giorno 15 (media)
TERRENO 1 (controllo)	0,2972	0,7279	1,4380	0,4189
TERRENO 2	0,3416	0,6668	1,6130	0,6492
TERRENO 3	0,2793	0,6437	1,1845	0,6244
TERRENO 4	0,2520	0,3008	0,2377	0,2247

Tabella 13: Concentrazione (Tricomi/ml) SET 1, studiata in 12 giorni.

SET 1	Concentrazione (Tric/ml) giorno 1	Concentrazione (Tric/ml) giorno 5	Concentrazione (Tric/ml) giorno 12
TERRENO 1 (controllo)	48854	303844	391219
TERRENO 2	57999	143105	223966
TERRENO 3	18437	37810	57121
TERRENO 4	44883	39617	35424

Tabella 14: Concentrazione (Tricomi/ml) SET 2, studiata in 15 giorni.

SET 2	Concentrazione (Tric/ml) giorno 1	Concentrazione (Tric/ml) giorno 5	Concentrazione (Tric/ml) giorno 10	Concentrazione (Tric/ml) giorno 15
TERRENO 1 (controllo)	42000	10800	19200	22400
TERRENO 2	28440	50868	11613	49654
TERRENO 3	10081	22887	41889	22278
TERRENO 4	13824	16400	13071	12384

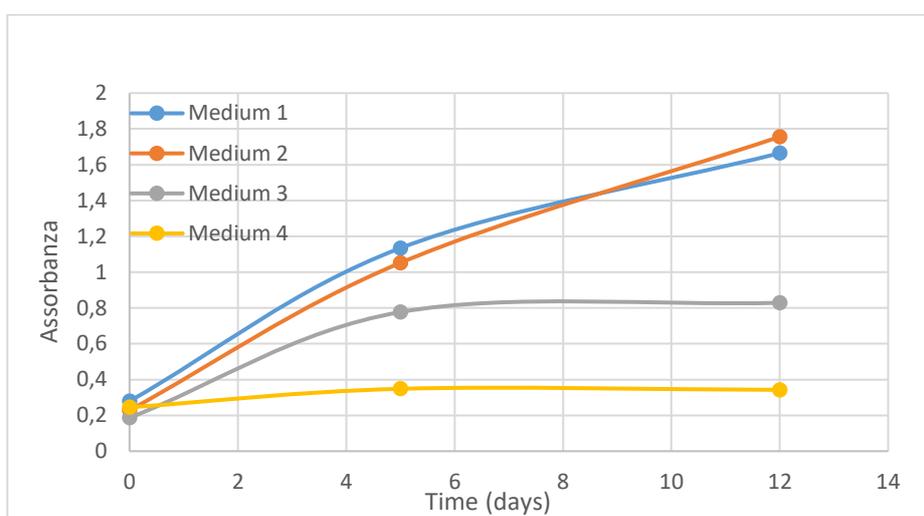


Figura 32: Curva di crescita ottenuta per *A. platensis* nel SET 1, in terreni di coltura sperimentali (denominati Medium 1 a 4: vedere Tab. 10 per le caratteristiche dei terreni).

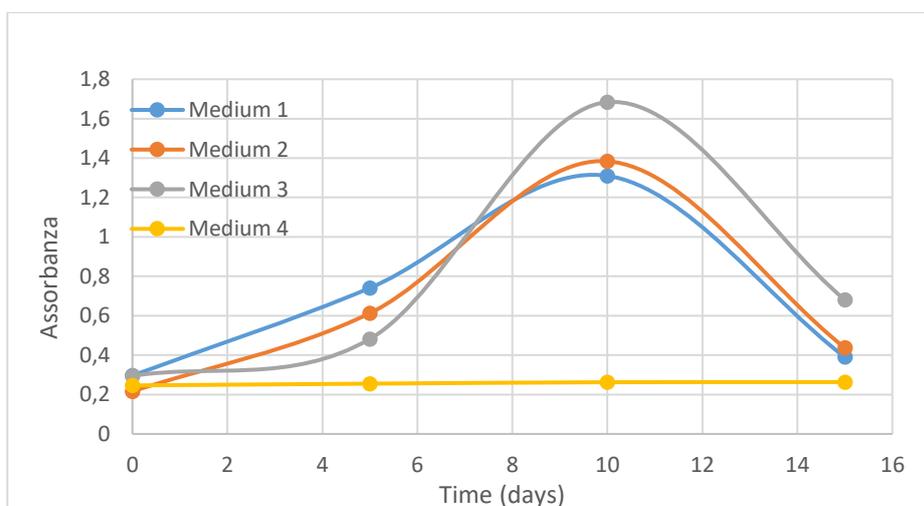


Figura 33: Curva di crescita ottenuta per *A. platensis* nel SET 2, in terreni di coltura sperimentali (denominati Medium 1 a 4: vedere Tab. 10 per le caratteristiche dei terreni).

Come si osserva per il SET1 (Fig. 32), tutte le popolazioni riseminate nei quattro terreni di coltura sperimentali hanno registrato una crescita positiva; il terreno 1 che rappresenta il terreno di coltura con salinità pari a 12.11 e pH 9,37 ha registrato la maggior crescita ottimale (velocità di $1,58 \pm 0,154$ d⁻¹, Tab. 15). Anche la popolazione del terreno n. 2 ha presentato un tasso di crescita elevato ($1,38 \pm 0,388$ d⁻¹). Questi risultati sono coerenti tenendo conto che entrambi i mezzi di coltura sono con pH alcalino, simili a quelli osservati nei sistemi naturali dove questa specie tende a proliferare. In accordo con Monaselidze (2002) è stato confermato che il range di pH ottimale per una buona conservazione della vitalità di *Spirulina* spp. con mezzo di coltura Zarrouk è compreso tra 9.4 e 10.3 come nel nostro esperimento. La popolazione che è cresciuta meno, con un tempo di adattamento più lungo è stata quella nel terreno n. 3, con salinità di 22,57 e pH di 8,88, crescendo con un tasso abbastanza alto di 1,01. Questo risultato è molto importante perché mostra per la prima volta che *A. platensis* riesce ad adattarsi a diverse condizioni di salinità 2 volte più alte dei normali parametri presenti nel suo ambiente naturale, con un pH non superiore a 9 e quindi più vicino a quello osservato nelle acque costiere, in corpi semichiusi o zone intertidali durante i periodi estivi o di emersione. La sperimentazione di terreni di coltura con diversa salinità e pH rappresenta un importante risultato ecologico, poiché mostra che questo ceppo di cianobatteri ha la capacità di adattarsi a diverse condizioni di salinità ad ampia gamma. Inoltre, il disegno sperimentale ci ha permesso di acquisire conoscenze sui meccanismi adattativi di *A. platensis*, distinguendo tra i SET 1 e 2. Negli esperimenti dei SETs (SET 1 e SET 2) si sarebbero potuti ottenere due risultati diversi, ognuno dei quali viene interpretato come la conseguenza di due diversi fenomeni di adattamento. Nel primo caso, la varianza del numero di tricomi per colture avrebbe potuto essere bassa se le cellule resistenti fossero apparse durante la crescita con i diversi parametri del mezzo di coltura (cioè, attraverso adattamento fisiologico).

Poiché ogni cellula ha probabilmente la stessa possibilità di sviluppare resistenza, la variazione tra le colture sarebbe potuta risultare in accordo con il modello di Poisson (cioè, varianza / media = 1). Viceversa, se ci fosse stata una grande variazione nel numero di cellule resistenti (cioè, varianza / media > 1), ciò avrebbe significato che nelle cellule resistenti erano comparse rare mutazioni spontanee avvenute prima dell'inoculo con i mezzi di coltura sperimentali. Pertanto, la variazione tra i campioni del SET 1 e del SET 2 non sarebbe risultata coerente con il modello di Poisson. Se fosse stata riscontrata una diversa varianza tra SET 1 e SET 2, sarebbe stato confermato che le cellule resistenti sono state prodotte da rare mutazioni spontanee prima dell'esposizione ai parametri selettivi. Se si fosse riscontrata una varianza / media simile tra SET 1 e SET 2, sarebbe stato confermato che le cellule resistenti erano comparse dopo l'esposizione all'agente selettivo (ad esempio, per acclimatazione). Inoltre, l'analisi delle fluttuazioni ha permesso di stimare il tasso di comparsa di tricomi resistenti. A causa dei limiti metodologici imposti da un'analisi delle fluttuazioni che utilizzano colture algali liquide, la proporzione per le colture del SET 1 che non mostravano mutanti resistenti (stimatore P_0 , Luria and Delbrück, 1943) dopo l'esposizione a diversi parametri di salinità e pH è stata calcolata come tasso di mutazione (μ):

$$\mu = - \text{Loge } P_0 / (N_t - N_0)$$

Nelle colture del SET 1 è stata evidenziata una mortalità delle cellule molto più bassa rispetto a quelle del SET 2 e, praticamente, tutte le repliche hanno mostrato densità finali > 10⁴ tricomi / ml, resistenti ai cambiamenti dei terreni; confermando, quindi, che le cellule si erano acclimate nel successivo periodo di risemina, e che in ogni terreno sperimentale erano comparse cellule resistenti che sopravvivevano e proliferavano nei mezzi. Al contrario, nel SET 2 è stata registrata un'alta mortalità, osservando il 50% di cellule morte e potendo recuperare solo l'altra metà (50%) di cellule resistenti.

Pertanto, è stata osservata un'importante fluttuazione di tricomi resistenti tra le differenti colture (varianza > media) (Tab. 16) e quindi, è stato confermato che le cellule resistenti sono apparse spontaneamente (mutazioni casuali) prima di entrare in contatto con i mezzi di coltura sperimentali, che hanno agito da agenti selettivi.

Tabella 15: Tassi di mutazione osservati per ciascuno dei terreni selettivi sperimentati (da 1 a 4).

	Medium 1		Medium 2		Medium 3		Medium 4	
	SET 1	SET 2	SET 1	SET 2	SET 1	SET 2	SET 1	SET 2
No of replicate cultures:	3	5	3	5	3	5	3	5
Growth rate (day ⁻¹):	1,58-0,154	0,23-0,124	1,32-0,388	0,42-0,291	1,01-0,244	0,55-0,181	-0,1-0,427	-0,08-0,254
Mutation rate:	$2,9 \times 10^{-6}$	-	$6,2 \times 10^{-6}$	-	$2,6 \times 10^{-5}$	-		
Variance/mean:	5738,61	0,54	4729,29	0	117,75	0	87,68	62,47

Tabella 16: Analisi della fluttuazione della sensibilità di *A. platensis* alle variazioni di salinità e pH nei terreni di coltura sperimentali.

	Set 1	Set 2
No. of replicate cultures	12	20
No. of cultures containing the following no. of resistant cells:		
0	0	10
$1 - 10^3$	0	8
$10^3 - 10^4$	0	2
$> 10^4$	12	0
Variance/mean (of the no. of resistant cells per replicate)	2661.80	15,75
μ (mutants per cell per generation)	11.7×10^{-5}	

I risultati mostrano una capacità di acclimatazione di *A. platensis*, non trascurabile, ai terreni di coltura con salinità un po' più alta di quella che si verifica nell'ambiente naturale.

Inoltre, il modo in cui questa specie si è acclimatata è dovuto a mutazioni casuali, cioè non dipendenti dal cambiamento del mezzo a cui sono state sottoposte, potendo quindi calcolare il tasso di mutazione (Tab. 15) (López-Rodas et al., 2001). Questo risultato è già stato osservato per altre specie di microalghe e cianofiti in presenza di diversi agenti selettivi (Costa et al., 2001; López-Rodas et al., 2008). Ciò implica che *A. platensis* è potenzialmente una specie che può essere selezionata per la crescita e la coltura in ambienti salini, anche se avremmo bisogno di estendere questo acclimatemento a periodi superiori a 15 giorni (effettuato in questo esperimento). In questo modo potremmo ottimizzare il suo tasso di crescita per ottenere biomassa in ambienti costieri e / o salmastri.

5.3.2 Seconda fase sperimentale: Composizione biochimica: proteine, lipidi e carboidrati

In bibliografia è possibile studiare le differenze che esistono tra le diverse specie di *Arthrospira* (ex *Spirulina*) coltivate in diversi terreni di coltura e individuare i fattori per l'ottimizzazione della crescita. Numerosi fattori come quantità e differenti composti dell'azoto (Piorrek et al., 1984; Licet et al., 2014), irradianza (Tedesco and Duerr, 1989; Markou et al., 2013), temperatura (Yilmaz, 2012; Oliveira et al., 1999; Tedesco and Duerr, 1989) e salinità (Hifney et al., 2013; Licet et al., 2014; Zarrouk 1966) influiscono sulla crescita e sulla produzione primaria. La composizione biochimica e pigmentaria di *Arthrospira* è direttamente influenzata dalle condizioni di crescita. Hifney et al. (2013) hanno dimostrato che la produzione di β -carotene si può incrementare, nel corso del tempo, in questo genere, sottoponendola a condizioni di stress abiotico, tra cui l'aumento della salinità.

A. platensis rappresenta una delle fonti di proteine vegetali più utilizzate. Uno studio completo è stato condotto da Paoletti et al. (1980) riguardante la composizione chimica di *A. platensis* coltivata in laboratorio o in vasche aperte. Lo spettro degli aminoacidi delle proteine è simile allo spettro di altri microrganismi (Jones, 1974) e rispetto ad alimenti come uova o latte, ci sono alcuni aminoacidi trovati in concentrazioni inferiori e sono principalmente: metionina e cisteina (Aaronson and Dubinsky, 1982). Tuttavia, diversi autori affermano che, come fonte di proteine, *A. platensis*, anche se al di sotto del livello di proteine alimentari come carne o latte, è superiore a tutte le proteine vegetali, inclusi i legumi. In *A. platensis* gli acidi grassi liberi rappresentano dal 70 all'80% dei lipidi totali, γ -linolenico rappresenta il 40% degli acidi grassi, che è circa il 4% del peso secco. *A. platensis* può essere considerata come una delle migliori fonti di acido γ -linolenico insieme ad alcuni oli vegetali (olio di canapa, borragine e enotera) (Becker, 1982). Il poli- β -idrossibutirrato, una riserva di carbonio e di energia in molti batteri, è stato isolato da *A. platensis* (Campbell et al., 1982). Il composto si accumula durante la crescita esponenziale, raggiungendo, all'inizio della fase stazionaria, una concentrazione corrispondente al 6% del peso secco. Sono anche presenti altri acidi grassi essenziali come l'acido palmitico che rappresenta il 25% dei lipidi (Sanchez et al., 2003). Numerosi studi hanno dimostrato che la spirulina ha un ruolo importante nelle attività biologiche come antiossidante, immunomodulatore, antinfiammatorio, antitumorale, antibatterico e antivirale; *A. platensis* ha anche effetti positivi contro l'obesità, la malnutrizione, diabete, l'anemia indotta da metalli pesanti e da sostanze chimiche tossiche (Gershwin and Belay, 2007; Henrikson, 2009). La biomassa dei campioni sperimentali (dal Terreno 1 al 4) del SET 1, che hanno precedentemente evidenziato un tasso di accrescimento positivo sono stati utilizzati per le analisi elementari della biomassa e analisi analitiche al fine di quantificare proteine, carboidrati e lipidi costituenti.

La tabella 17 mostra i risultati ottenuti dall'analisi elementare (CN) della biomassa, osservati nelle colture del SET 1 coltivate con i terreni di coltura sperimentali (Terreni 1-2-3-4). Ogni campione è stato analizzato in duplicato.

Tabella 17: Analisi elementare della biomassa (Azoto N % e Carbonio C %) dei 4 terreni di coltura sperimentali denominati M1-M2-M3-M4.

Pos	(N) %	(C) %
SPIRULINA M1	7.305	32.701
SPIRULINA M1	7.206	31.989
SPIRULINA M2	3.050	23.364
SPIRULINA M2	3.050	23.338
SPIRULINA M3	2.549	19.718
SPIRULINA M3	2.551	19.836
SPIRULINA M4	1.697	5.960
SPIRULINA M4	1.641	5.781

È evidente che le percentuali di composti costituiti da azoto e carbonio tendono a decrescere, in proporzione alla salinità crescente nei terreni utilizzati. Probabilmente questa specie di Cyanophyta riesce ad adattarsi a condizioni di salinità e pH sperimentali, però non è in grado di mantenere inalterate le proporzioni di prodotti primari. Nella tabella 18 sono mostrati i risultati della variazione nella composizione biochimica osservati nei campioni sperimentali del SET 1, che precedentemente avevano evidenziato un tasso di accrescimento positivo.

Tabella 18: Variazione biochimica in percentuale di proteine, carboidrati e lipidi, in *A. platensis* coltivata in condizioni sperimentali.

Colture sperimentali di <i>A. platensis</i>	Proteine %	Carboidrati %	Lipidi %
TEERENO 1 (controllo)	40,58	21,63	4,24
TERRENO 2	16,14	33,85	2,88
TERRENO 3	11,19	27,34	2,80
TERRENO 4	6,27	16,65	2,19

Nella figura 34 viene mostrata la variazione nella composizione biochimica osservata nelle colture del SET1 coltivate con i terreni di coltura sperimentali. È evidente una drastica riduzione del contenuto proteico, dal 40,58% al 6,27%, proporzionale alla salinità crescente nei terreni, mantenendo, invece, i valori dei lipidi intorno al 2%.

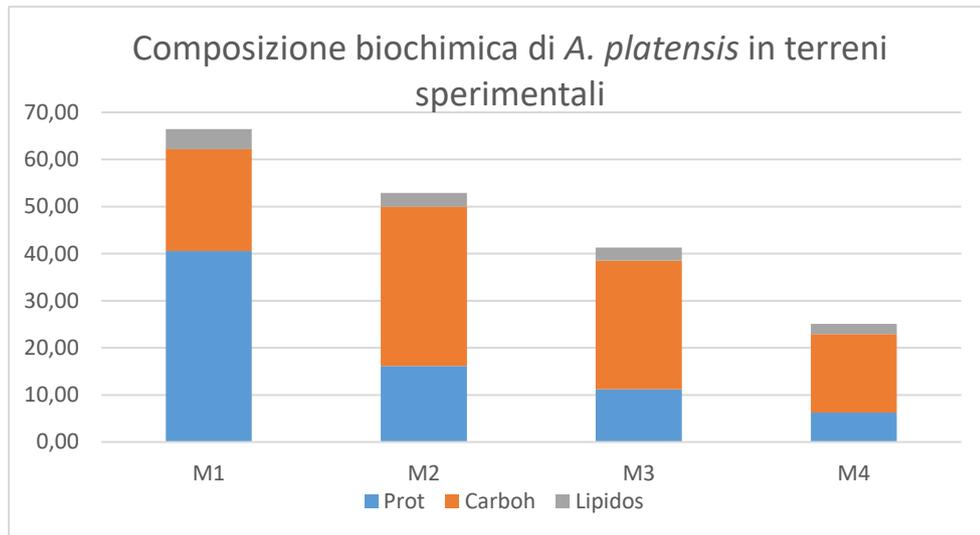


Figura 34: Grafico che mostra la variazione biochimica di proteine, carboidrati e lipidi in *A. platensis* coltivata in condizioni sperimentali (Terreni 1-2-3-4) denominati con M.

Questi risultati mostrano pochissima efficienza nella produzione di *A. platensis* come alimento, in colture di ambiente marino, perché è proprio il suo contenuto proteico a renderlo un prodotto prezioso. Questo dimostra che questa specie di Cyanophyta è in grado di adattarsi a terreni di coltura con condizioni di salinità e pH sperimentali, mediante meccanismi di mutazione spontanea, con un'alta adattabilità, però senza riuscire a mantenere inalterate le proporzioni dei composti primari quali proteine, carboidrati e lipidi.

5.4 Conclusioni

In questa secondo studio di tesi, ci siamo concentrati, non tanto sull'analisi di quali elementi potrebbero essere sfruttati tramite colture di *A. platensis* con diversi terreni sperimentali, ma quali meccanismi adattativi utilizza questa Cyanophyta per sopravvivere e, in parte, sulla sua possibile coltivazione e ridimensionamento in ambiente marino. Al fine di valutare il potenziale del sistema di coltura in sistemi costieri e salini, è stata studiata la sua adattabilità a diversi mezzi salini e con differente pH, quantificando la capacità di sintetizzare biomolecole efficienti, possibilmente utili in termini nutraceutici. Numerosi parametri influenzano la crescita e il contenuto proteico dei cianobatteri: luce, temperatura, salinità, aggiunta di CO₂, aggiunta di nutrienti, dimensioni di inoculazione, agitazione, pH, ecc. (Zarrouk, 1966; Richmond, 1988; Chojnacka and Noworita, 2004). Quindi, è stato dimostrato che questa specie si adatta a terreni di coltura con condizioni di salinità e pH sperimentali, attraverso i meccanismi di mutazione spontanea, che gli conferiscono un'alta adattabilità. *A. platensis* rappresenta una specie potenziale, che può essere selezionata per la crescita e la coltura in ambienti salini, anche se avremmo bisogno di estendere questo acclimatemento a periodi superiori a 15 giorni. Si apre, quindi, la possibilità della sua coltivazione in ambiente marino, anche se, sarebbe necessario continuare l'indagine per sapere quale prodotto d'interesse (probabilmente il β -carotene) potrebbe essere sfruttato.

Bibliografia

Andersen R.A. 2005. Algal culturing techniques. Burlington, Mass: Elsevier/Academic Press, pp. 596.

Aaronson S., Dubinsky Z. 1982. Mass production of microalgae. *Experientia*, 38, 36-40.

Abruzzese D., Genovese S. 1952. Osservazioni geomorfologiche e fisicochimiche sui laghi di Ganzirri e di Faro. *Ball. Pesca. Pisc. Idrobiol.*, 28, 75-92.

Aiba S., Ogawa T. 1977. Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis* in axenic and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 102, 179–82.

Bax A. 1982. Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids, Delft University Press, Dordrecht, pp. 200.

Bax A., Aszalos Z., Dinya K., Sudo J. 1986. Structure elucidation of the antibiotic desertomycin through the use of new two-dimensional NMR techniques. *Am. Chem. Soc.*, 108(25), 8056–8063.

Becker E.W. 1978. The legislative background for utilization of microalgae and other types of single cell protein. *Arch. Hydrobiol.*, 11:56-64.

Becker E.W. 1982. Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit - German Agency for Technical Cooperation, pp. 216.

Becker E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Journal of Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210.

Becker M.I., Arancibia S., Salazar F., Del Campo M. and De Ioannes A. 2014. Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications. *Immune Response Activation*, pp. 72.

Belay A. 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5, 27-48.

Bergbauer M., Humberg B. 2000. La vie sous-marine en Mediterranee, Guide Vigot, ed. Vigot, pp. 318.

Bianchi C.N. 2004. Proposta di suddivisione dei mari italiani in settori biogeografici. *Notiziario della Società Italiana di Biologia Marina*, 46, 57–59.

Boury-Esnault N., Ruetzler K. (Eds). 1997. Thesaurus of sponge morphology. Smithsonian. *Contributions to Zoology*, 596, 1-55.

Boyd C.E. 1973. Amino acid composition of freshwater algae. *Arch. Hydrobiol.* 72, 1-9.

Campbell J., Stevens S.E., Balkwill Jr D.L. 1982. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. *J. Bacteriol.*, 149, 361-363.

Capon R.J. 2001. Marine Bioprospecting. *European Journal of Organic Chemistry*, 4, 633-645.

Carrie M. 2008. Nutricosmetics: Decoding the convergence of beauty and healthcare (presentation). In: In-Cosmetics Conference, Amsterdam, April 15–17, 2008.

Chamorro G., Salazar M., Favila L., Bourges H. 1996. Pharmacology and toxicology of the alga *Spirulina*. *Revista de Investigacion Clinica*, 48(5), 389–399.

Chojnacka K., Noworita A. 2004. Evaluation of *Spirulina sp* growth in phototrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb. Technol.*, 34, 461–465.

Ciavatta M.L., Scognamiglio G., Trivellone E., Bisogno T., Cimino G. 2002. New additional triterpenoids from the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*. *Tetrahedron*, 58, 4943–4948.

Ciferri O. 1983. *Spirulina*, the Edible Microorganism. *Microbiological reviews*, 47(4), 551-578.

Cimino G., Crispino A., Mattia C.A, Mazzarella L., Puliti R., Trivellone E., Uriz M.J. 1990. Chemical diversity in the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*: Structure and absolute stereochemistry of blanesin. *Tetrahedron Lett.*, 31, 6565-6568.

Cimino G., Crispino A., Epifanio R.D.A., Madaio A., Mattia C.A., Mazzarella L., Puliti R., Trivellone E., Uriz M. 1992. Raspacionin-A: A novel rearranged triterpenoid from the mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*. *Tetrahedron*, 48, 9013-9022.

Cimino G., Epifanio R.D.A., Madaio A., Puliti R., Trivellone E. 1993a. Absolute stereochemistry of raspacionin, the main triterpenoid from the marine sponge *Raspaciona aculeata*. *J. Nat. Prod.*, 56, 1622–1626.

Cimino G., Crispino A., Madaio A., Trivellone E. 1993b. Raspacionin B, a further triterpenoid from the mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*. *J. Nat. Prod.*, 56, 534–538.

Cimino G., Madaio A., Trivellone E. 1994. Minor triterpenoids from the mediterranean sponge, *Raspaciona aculeata*. *J. Nat. Prod.*, 57, 784–790.

Cimino G., Gavagnin M.T. 2006. Molluscs from chemo-ecological study to Biotechnological Application. Springer Eds, pp. 387.

Cimino G., Ghiselin M.T. 2009. Chemical Defense and the Evolution of Opisthobranch Gastropods. *Processings of the California Academy of Sciences*, 10(60), 175–422.

Cohen Z. 1997. The Chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak, A, (Ed) *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell biology and biotechnology*. Taylor and Franers, U.K, pp. 213-216.

Costa J.A.V., Cozza K.L., Oliveira L., Magagnin G. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 439-442.

Costa J.A.V., Barbieri Moro G. M., Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira, Corsini E., Elita Bertolin T. 2017. The Potential of *Spirulina* and Its Bioactive Metabolites as Ingested Agents for Skin Care. *Industrial Biotechnology*, 13(5), 244-252.

Cragg, G.M., Newman, D.J. 2000. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9, 2783-2797.

D'Ancona U., Battaglia B. 1962. Le lagune salmastre dell'Alto Adriatico, ambiente di popolamento e selezione. *Pubbl. Staz. Zoo. Napoli*, 32 suppl., 315-355.

Davis D.G., Bax A. 1986. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 108 (8), 2093–2094.

De Vos L., Rutzler K., Boury-Esnault N., Donadey C., Vacelet J. 1991. Atlas of sponge morphology. Smithsonian Institution, pp. 129.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.*, 28, 350-356.

Fernández J.J., Souto M.L., Norte M. 2000. Marine polyether triterpenes. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 235–246.

Genovese S. 1962. Sulle condizioni fisico-chimiche dello stagno di Faro in seguito all'apertura di un nuovo canale. *Atti Soc. Pelorit. Sci. Fis. Mat. Nat.*, 8, 67-72.

Genovese S. 1963. The distribution of the H₂S in the Lake of Faro (Messina) with Particular Regard to the Presence of "Red Water". in: Oppenheimer C.H. (ed.), Symp. on marine microbiology, pp. 193-204.

Gershwin A., Belay A. 2007. *Spirulina* in Human Nutrition and Health. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 328.

Giacobbe S., Spinelli A., De Matteo S., Kovačić M. 2016. First record of the large-headed goby, *Millerigobius macrocephalus* (Actinopterygii: Perciformes: Gobiidae), from Italy. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 46(1), 49–52.

Giacobbe S., Spinelli A., De Matteo S., Kovačić M. 2017. First record of the Bath's goby, *Pomatoschistus bathi* (Miller 1982), from central-south Italy: a southern proof of fragmented distribution restricted to the north? *Marine Biodiversity*, 1-6.

Gilli A., Maillard P. 2000. Plonge dans le monde des spongiaires, FFESS Commission nationale de Biologie, pp. 114.

Hartman W.D. 1982. Porifera. In: Parker, S.P. (ed.) *Synopsis and Classification of Living Organisms*. New York: McGraw-Hill, 1, 640-666.

Helfman G. 1983. Underwater methods. In: Nielsen L.A., Johnson D.L. & Lampton, S.S., ed *Fisheries techniques*. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 349–370.

Henrikson R. 2009. Earth Food Spirulina. Hawaii: Ronore Enterprises, pp. 187.

Hifney A.F., Issa A.A., Fawzy M.A. 2013. Abiotic stress induced production of b-carotene, allophycocyanin and total lipids in *Spirulina sp.* *J. Biol. Earth. Sci.*, 3(B), 54–64.

Hooper J.N.A., Van Soest R.W. 2002. Systema Porifera: A guide to classification of sponges Vol 1: Introduction and Demospongiae, Kluwer Academic / Plenum Publ., 1, pp. 1100.

International Food Policy Research Institute. 2016. Global Nutrition Report 2016: From Promise to Impact: Ending Malnutrition by 2030. Washington, DC, pp. 182.
<http://ebrary.ifpri.org/utills/getfile/collection/p15738coll2/id/130354/filename/130565.pdf>.

Jarisoa T., Charpy L., Vicente N., Langlade M.J. 2003. Culture de Spiruline en eau de mer à Toliara (Madagascar). Colloque d'Ecologie Microbienne, Carry Le Rouet, France.

Johnston G. 1842. A history of British sponges and Lithophytes, W.H. Lizars, Edinburgh, pl I-XXV, pp. 264.

Jones A. 1974. World protein resources, MTP Publishers, Lancaster, U.K, pp. 305-306.

Joshi G., Rajandeeep. 2015. Pharmacologically important natural products from marine sponges. *European Journal of Biomedical AND Pharmaceutical sciences*, 2(6), 110-118.

Khan Z., Bhadouria P., Bisen P. 2005. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 6, 373–379.

Kim H.M., Lee E.H., Cho H.H., Moon Y.H. 1998. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by spirulina. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1071–1076.

Klug W., Cummings M.R. 1997. Concepts of Genetics, 5th edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 896.

Krebs, C.J. 1989. Ecological methodology. New York: Harpercollins Publishers, pp. 654.

Le Granché P., Vacelet J. 2014. In: DORIS: *Raspaciona aculeata* (Johnston, 1842), <http://doris.ffessm.fr/ref/specie/2751>.

Leonardi M., Azzaro F., Caruso G., Mancuso M., Monticelli L.S., Maimone G., La Ferla., Raffa F., Zaccone R. 2009. A multidisciplinary study of the Capo Peloro brackish area (Messina, Italy): characterization of the trophic conditions, microbial abundances and activities. *Marine Ecology*, 30, 33-42.

Lewin R. A. 1980. Uncoiled variants of *Spirulina platensis* (cyanophyceae: oscillatoriaceae). *Arch. Hydrobiol.*, 60(suppl), Algol. Stud. 26, 48–52.

Licata P., Trombetta D., Cristiani M., Martino D., Naccari F. 2004. Organochlorine compounds and heavy metals in the soft tissue of the mussel *Mytilus galloprovincialis* collected from lake Faro (Sicily Italy). *Environment Internacional*, 30, 805-881.

Licet B., Guevara M., Lemus N., Freites L., Romero L., Lodeiros C., Arredondo-Vega, B. 2014. Crecimiento y composición bioquímica de *Arthrospira platensis* (División Cyanophyta) cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 53(1), 3-13.

Longo C., Mastrototaro F., Corriero G. 2007. Occurrence of *Paraleucilla magna* (Porifera: Calcarea) in the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 87, 1749–1755.

López-Rodas V., Agrelo M., Carrillo E., Ferrero L.M., Larrauri A., Martín-Otero L., Costas E. 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology*, 36, 179-190.

López-Rodas V., Maneiro E., Lanzarot M.P., Perdignes N., Costas E. 2008. Mass wildlife mortality due to cyanobacteria in the Doñana National Park, Spain. *Veterinary Record*, 162, 317-318.

Lourenço S.O., Barbarino E., Lavin P.L., Lanfer Marquez U.M., Aida E. 2004. "Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors." *Eur. J. Phycol.*, 39, 17–32.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Luria S.E. and Delbrück M. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28, 491-511.

Markl J. 2013. Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochim. Biophys. Acta*, 1834, 1840-1852.

Markou G., Angelidaki I., Georgakakis D. 2013. Bioethanol production by carbohydrate-enriched *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies*, 6, 3937-3950.

Marra M.V., Bertolino M., Pansini M., Giacobbe S., Manconi R., Pronzato R. 2016. Long-term turnover of the sponge fauna in Faro Lake (northeast Sicily, Mediterranean Sea). *Italian Journal of Zoology* 83(4), 579–588.

Miczke A., Szulinska M., Hansdorfer-Korzon R., Kregielska-Narozna M., Suliburska J., Walkowiak J., Bogdanski P. 2016. Effects of *Spirulina* consumption on body weight, blood pressure, and endothelial function in overweight hypertensive Caucasians: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 20, 150–156.

Mimieux Vaske Y. and Crews P. 2014. An Update on the Biomedical Prospects of Marine-derived Small Molecules with Fascinating Atom and Stereochemical Diversity. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*, First Edition, pp. 26.

Mishra S.K., Suh W.I., Farooq W., Moon M., Shrivastav A., Park M.S., Yang J.W. 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330-303.

Monaselidze J., Barbakadze S., Kvirikashvili S., Majagaladze G., Khachidze D., Topchishvili, L. 2002. Termal characteristics of *Spirulina platensis* cells under nongrowing conditions at various values of pH medium. *Biomacromolecules*, 3, 783-786.

Morais M.G., Vaz B.S., Morais E.G., Costa, J.A.V. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Bio. Med. Res. Int.*, 1–15.

Moro G.M.B. 2013. Potencial nutricosmético da microalga *Spirulina* em ensaios biológicos in vitro e in vivo. Dissertações (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande, pp. 120.

Mosulishvili L.M., Kirkesali E.I., Belokobylsky A.I., Khizanishvili A.I., Frontasyeva M.V., Pavlov S.S., Gundorina S.F. 2002. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium-and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 30(1), 87-97.

Newman D.J., Cragg, G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75, 311–335.

Ogawa T., Terui G. 1970. Studies on the growth of *Spirulina platensis* (I) On the pure culture of *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Technol.*, 48, 361–7.

Parisi G. 2009. Composti citossici ed antiblastici recentemente derivati da organismi marini. *Atti Accademia Pontaniana*, 8, 7-32.

Oliveira J.T.A., Silveira S.B., Vasconcelos I.M., Cavada B.S., Moreira R.A. 1999. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. *J. Sci. Food Agric.*, 79(6), 815-820.

Paoletti C., Vincenzini M., Bocci F., Materassi R. 1980. Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *S. maxima*, In R. Materassi (ed.), *Prospettive della coltura di Spirulina in Italia*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome. pp. 111-125.

Paredes-Carbajal M.C., Juarez-Oropeza M.A., Mascher D., Torres-Duran P.V., Farias J.M. 2009. Effects of *Spirulina* on vascular reactivity. *J. Med. Food*, 12(1), 15-20.

Pelizer L.H., Carvalho J.C.M., Sato S., Moraes I.D.O. 2002. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivation conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(3), 251-257.

Piorreck M., Baasch K.H., Pohl P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23, 207-216.

Puliti R., Trivellone E., Crispino A., Cimino G. 1991. *Acta Crystallogr.*, 47, 2609-2612.

Richmond A. 1988. in Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J., Borowitzka L.J. (eds) (Cambridge University Press, Cambridge, UK), pp. 85–121.

Riesgo Gil A. 2007. Sexual reproduction in demosponges: ecological and evolutive implications / Reproducción sexual en demosponjas: implicaciones ecológicas y evolutivas. Thèse, Departamento de Biología Celular, Universidad de Barcelona, 148-168.

Romay C., Armesto J., Ramirez D., González R., Ledon N., García I. 1998. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflamm Res.*, 47, 36–41.

Saccà A., Guglielmo L., Bruni V. 2008. Vertical and temporal microbial community patterns in a meromictic coastal lake influenced by the Straits of Messina upwelling system. *Hydrobiologia*, 600, 89-104.

Schlösser U.G. 1994. SAG—Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen catalogue of strains 1994. *Bot. Acta*, 107, 111–86.

Sánchez M., Bernal-Castillo J., Rozo C., Rodríguez I. 2003. *Spirulina (Arthrospira): An Edible Microorganism. A Review. Revista Universitas Scientiarum*, 8 (1), 7-24.

Santillan C. 1982. Mass production of *Spirulina*. *Experientia*, 38, 40-43.

Seeley E.H., Caprioli R.M. 2008. Molecular Imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(47),18126-18131.

Simmons T.L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P., Gerwick W.H. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), 333-342.

Slocombe S.P., Benemann J.R. 2016. *Microalgal Production for Biomass and High-Value Products*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 91-116.

Spinelli A., Giacobbe S., Costagliola A., De Matteo S., Kovačić M. 2017. First record from Sicily of the Adriatic dwarf goby, *Knipowitschia panizzae* (Osteichthyes, Gobiidae), a threatened species or threat for conservation? *Marine Biodiversity*, 47, 237–242.

Taeymans J., Clarys P., Barel A.O. 2014. Use of Food Supplements as Nutricosmetics in Health and Fitness. In: Barel A.O., Paye M., Maibach H.I., ed. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014, 583–596.

Tascedda F., Malagoli D., Accorsi A., Rigillo G., Blom J.M.C. and Ottaviani E. 2015. Molluscs as Models for Translational Medicine. *Med. Sci. Monit. Basic. Res.*, 21, 96–99.

Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. 2007. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(2), 295-347.

Tedesco M., Duerr E. 1989. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina* UTEX 1928. *J. Appl. Phycol.*, 1, 201-209.

Templeton D.W., Laurens L.M.L. 2015. “Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel.” *Algal Research*, 11, 359-367.

Tonolli V. 1964. Introduzione allo studio della limnologia. Ist. Ital. Idrobiologico. Verbania Pallanza, pp. 390.

Turpin P.J.F. 1827. *Spirulina oscillarioide*. Dictionnaire des sciences naturelles, Levrault, Paris, 50, 309-310.

US FDA. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127. CFSAN/Office of Food Additive Safety. 2003. Available at: <https://fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm267267.pdf> (Last accessed December 2016).

US FDA. Food Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN000424. 2012. Available at: <http://fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm335743.htm> (Last accessed December 2016).

Vacelet J. 1961. Spongiaires (Démospouges) de la région de Bonifacio (Corse). *Recueil des Travaux de la Station marine d'Endoume*, 22(36), 21-45.

Van Eykelenburg C. 1978. A glucan from the cell wall of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 44, 321-327.

Van Soest R.W.M., Boury-Esnault N., Hooper J.N.A., Rützler K., de Voogd N.J., Alvarez B., Hajdu E., Pisera A.B., Manconi R., Schönberg C., Klautau M., Picton B., Kelly M., Vacelet J., Dohrmann M., Díaz M-C., Cárdenas P., Carballo J.L., Ríos P., Downey R. 2018. World Porifera database. *Raspaciona aculeata* (Johnston, 1842). Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=133139> on 2018-07-05.

Vatova A. 1962. Rapporti tra concentrazione dei sali nutritivi e produttività delle acque lagunari. *Ric. sci.* 32(11-B), 44-51.

Vonshak A. 1997. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: A. Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor and Francis, London, pp. 233.

Wang Z.P., Zhao Y. 2005. Morphological reversion of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyta): from linear to helical. *Journal of Phycology*, 41, 622–628.

Wiley J., Sons J. 1992. *Encyclopedia of Food Science Tecnology*. Frederick J. Francis (Ed.), pp. 2816.

Williams D.H., Stone M.J., Hauck P.R., Rahman S.K. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J. Nat. Prod.*, 52, 1189–208.

Yilmaz H.K. 2012. The Proximate Composition and Growth of *Spirulina platensis* Biomass (*Arthrospira platensis*) at Different Temperatures. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11, 1135-1138.

Yates J.R. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom*, 33, 1-19.

Yong-Xin Li, Himaya S.W.A., Se-Kwon Kim. 2013. Triterpenoids of Marine Origin as Anti-Cancer Agent. *Molecules*, 18, 7886-7909.

Zarrouk C. 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setchell Gardner) Geitler. PhD Thesis. University of Paris.