



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

# UIBM

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102021000028496</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>10/11/2021</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>10/05/2023</b>

#### Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	P	19	60

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	5	04

#### Titolo

Linee cellulari indifferenziate coltivate in vitro di Actinidia deliciosa e Actinidia chinensis per la produzione di glicosidi di quercetina ed il loro processo di preparazione - Undifferentiated in vitro cultured Actinidia deliciosa and Actinidia chinensis cell lines as cell factory for the production of quercetin glycosides and process for the preparation thereof

LINEE CELLULARI INDIFFERENZIATE DI *ACTINIDIA DELICIOSA*  
E *ACTINIDIA CHINENSIS* COLTIVATE *IN VITRO* COME  
PIATTAFORME CELLULARI PER LA PRODUZIONE DI GLICOSIDI  
DELLA QUERCETINA E PROCESSO PER LA LORO PREPARAZIONE

-----

La presente invenzione riguarda linee cellulari di *Actinidia deliciosa* e *Actinidia chinensis* coltivate *in vitro* come piattaforme biotecnologiche per la produzione di glicosidi della quercetina e il processo per la loro preparazione. In particolare, la presente invenzione riguarda linee cellulari di *Actinidia deliciosa* e *Actinidia chinensis* coltivate *in vitro* per la produzione di glicosidi della quercetina, un processo per la preparazione delle linee cellulari indifferenziate e un processo per la produzione di glicosidi della quercetina e di loro derivati, quali la quercetina, ottenuti dai suddetti glicosidi.

È noto che le piante terrestri producono un vasto arsenale di metaboliti specializzati e che molti di essi mostrano interessanti attività biologiche nell'uomo. Infatti, le piante rappresentano la più ricca fonte di prodotti naturali bioattivi per lo sviluppo di nuovi farmaci, integratori, cosmetici e prodotti agrochimici. Le piante producono diversi metaboliti secondari, o specializzati, per far fronte a stress biotici e abiotici e per comunicare con gli altri organismi. Molti di questi metaboliti possiedono attività benefiche che sono molto importanti per gli esseri umani. Le piante rappresentano quindi una ricca fonte di piccole e preziose molecole bioattive. Ciò

rispecchia l'immensa e ineguagliata diversità chimica delle piante, frutto delle complesse vie di biosintesi e dell'alta selettività (regio e stereo selettività) tipica dei loro enzimi.

I potenziali vantaggi sociali ed economici di questo variegato arsenale chimico sono molto alti, in modo particolare nel contesto degli integratori alimentari, dei nutraceutici, dello sviluppo di farmaci, nell'industria della salute e del benessere e in campo agricolo.

Cellule e tessuti vegetali indifferenziati coltivati *in vitro* mantengono molte delle capacità biosintetiche degli espianti originari e possono crescere rapidamente per produrre elevate quantità di biomassa in poco tempo in mezzi sintetici semplici contenenti sali, zuccheri, vitamine e fitormoni, soprattutto auxine e citochinine. Questa tecnologia, comunemente denominata "coltura di cellule e tessuti vegetali" (dall'inglese "plant cell and tissue culture", PCTC) offre una piattaforma attraente e sostenibile per la produzione di metaboliti specializzati vegetali in bioreattori.

I suoi principali vantaggi comprendono i seguenti punti: i) crescita della biomassa in modo indipendente dalla stagione; ii) risparmio di risorse idriche; iii) svincolo dall'uso di erbicidi e pesticidi [1].

Inoltre, la PCTC è la sola alternativa per la produzione di metaboliti specializzati da piante rare o in via di estinzione, specialmente quando la domanda del mercato eccede la disponibilità di materiale vegetale o quando la sintesi per via chimica è

difficile da ottenere. L'esempio classico è quello del paclitaxel (taxolo), un metabolita accumulato a basse concentrazioni nella corteccia di alberi adulti di *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata* e specie affini. Una volta dimostrata l'efficacia del paclitaxel verso il cancro alle ovaie, ci fu un repentino incremento della domanda di taxolo, sollevando problematiche circa il possibile impatto ecologico dell'utilizzo intensivo degli alberi di tasso e causando la cosiddetta *taxol supply crisis*, ovvero la crisi di approvvigionamento del taxolo [2].

Dal momento che le colture cellulari possono essere generate partendo da quantità molto basse di materiale vivente, queste possono essere considerate una tecnica sostenibile che riduce i problemi ecologici causati dal campionamento estensivo di piante selvatiche. Inoltre, consentono di evitare il consumo di terre coltivabili, che devono essere riservate alla coltivazione di colture alimentari.

Molti tipi di metaboliti sono stati osservati nelle colture cellulari, inclusi i polifenoli. Questi composti, dai ben noti effetti benefici sulla salute umana, sono ampiamente distribuiti nel regno vegetale e sono organizzati nelle seguenti sottoclassi: flavonoli, flavan-3-oli (flavanoli) e procianidine, flavanoni, flavoni, isoflavoni, antociani, stilbeni, acidi idrossicinnamici, calconi, diidrocalconi, acido ellagico ed ellagitannini, acidi fenolici, cumarine e lignani [3]. I loro effetti benefici sulla salute riguardano soprattutto la prevenzione verso le malattie

cardiovascolari e il mantenimento di uno stato di salute del sistema cardiovascolare [4,5], la prevenzione verso vari tipi di cancro [6] e persino effetti sulle capacità cognitive [7].

La PCTC è stata utilizzata per la produzione industriale di acido caffeico, echinacoside, verbascoside, teupoloside e acido rosmarinico (tutti derivati di acidi idrossicinnamici), antociani e i polifenoli del cacao [1,8,9].

I flavonoidi, una sottoclasse di polifenoli che include i flavonoli, i flavan-3-oli, i flavanoni, i flavoni e gli isoflavoni possiedono 2 anelli aromatici (detti anelli A e B) uniti da un anello eterociclico (anello C) contenente ossigeno. I tre anelli possono essere diversamente caratterizzati dalla presenza, per esempio, di gruppi metilici o ossidrilici che, a loro volta, possono essere ulteriormente coniugati a zuccheri o zuccheri acilati. Il flavonolo quercetina presenta un gruppo ossidrilico legato al carbonio 3 dell'anello C e quattro altri gruppi ossidrilici legati agli anelli A e B e, ad oggi, gli si riconoscono svariate proprietà benefiche. Le colture cellulari vegetali non accumulano solitamente grandi quantità di flavonoidi ma producono più facilmente antociani e acidi idrossicinnamici. Ciò si riflette nella produzione industriale via PCTC, che include attualmente acidi idrossicinnamici e antociani ma nessun flavonoide [1,8,9]. Sebbene piuttosto frequente nelle piante, incluse specie eduli come le bacche di sambuco e altre bacche, capperi, chiodi di garofano,

origano messicano (*Lippia graveolens*), cipolle e scalogno, tè, vino, prugne, olive nere, asparagi, grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*) [10-12], la quercetina si accumula a quantità piuttosto basse rispetto ad altri metaboliti specializzati, come gli antociani e gli acidi idrossicinnamici. Inoltre, i flavonoidi si accumulano generalmente in basse quantità anche nelle colture cellulari vegetali. Probabilmente per questo motivo per la quercetina non è ancora stata avviata una produzione industriale mediante PCTC, a differenza degli antociani e degli acidi idrossicinnamici.

L'interesse verso la produzione industriale di flavonoidi è giustificato dalle crescenti evidenze scientifiche che collegano i loro effetti benefici sulla salute alla prevenzione e al trattamento di specifiche malattie, rendendoli interessanti sia per finalità nutraceutiche che farmaceutiche.

Data la larga presenza, seppur a bassi livelli, della quercetina e dei suoi derivati nel regno vegetale, incluse specie eduli, la biodisponibilità e le attività biologiche di questi flavonoidi sono state ampiamente investigate tramite approcci *in vitro* e *in vivo* [13,14].

Principalmente a causa della sua elevata attività antiossidante, delle sue abilità di *scavenging* di specie radicaliche dell'ossigeno e della capacità di modulare sia specifici pathways pro e anti-infiammatori che specifici mediatori del processo infiammatorio *in vivo* [15,16], la quercetina contribuisce a controbilanciare i processi ossidativi che sono alla

base di numerose malattie legate ad uno stato infiammatorio, incluse le malattie cardiovascolari [17], le malattie neurodegenerative [18] e vari tipi di cancro [19].

Le funzioni cardioprotettive della quercetina riflettono le sue attività antipertensiva, anti-aterosclerotica, anti-ischemica e antiobesità che si espletano, soprattutto, tramite il mantenimento di un buono stato dell'endotelio dei vasi sanguigni e di un profilo salutare del colesterolo nel sangue [17]. Attenuando le disfunzioni mitocondriali, la quercetina protegge i neuroni dal danno ossidativo, che potrebbe causare severi danni tissutali portando a disordini neurodegenerativi, incluso l'Alzheimer [20]. In questo caso, l'abilità della quercetina di attenuare le manifestazioni della malattia a livello cognitivo, incluso un miglioramento delle funzioni di memoria e apprendimento, è ben riportato in vari modelli animali [21]. Inoltre, esercitando una diretta attività pro-apoptotica sulle cellule tumorali, la quercetina è in grado di inibire la crescita di diversi tipi di tumore (inclusi quello del seno e del colon), rappresentando, pertanto, un utile trattamento sinergico in combinazione alla chemioterapia [19]. Infine, sono riportate altre attività di protezione della quercetina verso ulcere, allergie, diabete e infezioni virali e batteriche [22,23]. Di recente, nel contesto della pandemia da COVID-19, evidenze *in vitro* e *in silico* hanno confermato la potente attività inibitoria della quercetina verso 3CLPro, la principale proteasi virale

del virus Sars-CoV-2, e rhACE2, il recettore umano che rappresenta la chiave di accesso del virus alle cellule ospiti [24,25]. Diversi autori hanno pertanto sostenuto l'utilizzo di questo flavonolo, assieme ad altri prodotti naturali che hanno mostrato attività inibitoria verso Sars-CoV-2, come complemento alla terapia di riferimento contro il COVID-19 [26,27]. Ciò ha permesso di avviare diversi trial clinici per testare l'efficacia della somministrazione per via orale di quercetina, da sola o in combinazione con altri presunti composti sinergici (come ad esempio l'acido ascorbico [28]), in pazienti trattati per l'infezione da COVID-19. Attualmente, uno studio ha dimostrato che pazienti ai quali sono stati somministrati, agli stadi precoci dell'infezione, dosi giornaliere da 1000 mg di *Quercetin Phytosome*® per un periodo di 30 giorni assieme alla terapia di riferimento, hanno sviluppato sintomi respiratori meno gravi, presentando anche una riduzione del tempo di negativizzazione del tampone molecolare [29].

In generale, gli interventi terapeutici basati sull'utilizzo di quercetina (per il trattamento del COVID-19, per esempio, o dell'ipertensione) richiedono una quantità giornaliera tra i 200 e i 1200 mg, che è ben oltre la quantità di quercetina che possiamo introdurre nell'organismo tramite la dieta. Il consumo giornaliero di vegetali e frutti che presentano moderati livelli di quercetina consente di introdurre circa 10-30 mg, una quantità che è compatibile più con gli effetti benefici di una prevenzione sul lungo

periodo che quelli di un trattamento intensivo [30]. Pertanto, se da un lato le piante che sono in grado di accumulare la quercetina, come ad esempio *Sophora japonica*, rappresentano ancora una delle principali fonti da cui estrarre e purificare questo metabolita per la produzione di integratori, dall'altro, nuove piattaforme devono essere sviluppate per coprire la crescente richiesta di quercetina per il suo utilizzo terapeutico. In questo scenario, la PCTC e la produzione eterologa in microrganismi ingegnerizzati (come *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Streptomyces* spp. [31-34]) rappresentano gli approcci biotecnologici più promettenti.

I report sulla produzione di quercetina e dei suoi derivati tramite PCTC testimoniano grandi differenze a livello di resa, variando a seconda della specie utilizzata per la produzione della coltura cellulare. In generale, si possono distinguere due tipi di evidenze sperimentali: quelle che riportano la capacità basilare di una coltura cellulare di produrre metaboliti specializzati e quelle che mostrano i risultati dopo l'applicazione di un processo di ottimizzazione. Le prime dimostrano l'attitudine alla produzione di metaboliti specializzati della specie stessa, che è posta sotto controllo genetico; le seconde esplorano la possibilità di elevare il potenziale della specie al suo massimo.

All'interno del primo gruppo le quantità di quercetina variano da 6.6 e 7.4 mg/100g peso secco, riportati rispettivamente in sospensioni cellulari di

*Tilia americana* [35] e *Clinacanthus nutans* [36], ai 14.6 e 23 mg/100g peso secco trovati nei calli di *Pluchea lanceolata* [37] e *Centella asiatica* [38], fino ai 125 mg/100g peso secco delle colture di *Helicteres angustifolia* [39]. Cisnero-Torres e colleghi hanno investigato anche la quantità di quercetina negli espianti utilizzati per generare i rispettivi calli, trovando livelli di quercetina nelle foglie di *C. nutans* leggermente più alti che nei calli (12 contro 7.4 mg/100g peso secco) [35].

All'interno del secondo gruppo, come atteso, sono stati trovati livelli più elevati di quercetina, indicando che, come anche per altri polifenoli, il suo accumulo in colture cellulari vegetali può essere fortemente incrementato modulando le condizioni di coltura. In questo gruppo, i livelli di quercetina variano da 42.9, 45.5, 47 e 80 mg/100g peso secco in calli di *Gardenia jasmonides* [40], sospensioni cellulari di *Polygonum multiflorum* [41] e calli di *Abutilon indicum* [42] e *Allium cepa* [43] a 300, 725, 1650 e 1730 mg/100g peso secco nei calli di *Dyosma pleiantha* [44] e *Citrullus colocynthis* [45], nelle sospensioni cellulari di *Caesalpinia pulcherrima* [46] e nei calli di *Capparis spinosa* [47]. I trattamenti utilizzati per incrementare la produzione di quercetina includono il *feeding* di precursori, come la fenilalanina [40,42,45], l'utilizzo di elicitori come l'acido salicilico, il metiljasmonato ed elicitori fungini [40,41,43,46,47] e l'utilizzo di nutrienti del mezzo di coltura come saccarosio, glutammina,

idrolisato di caseina, acqua di cocco ed estratto di peptone [41,44,46].

Ciononostante, questo passaggio di elicitazione rappresenterebbe un ulteriore processo, con relativi costi, da includere nel settaggio su scala industriale della produzione della coltura cellulare. Inoltre, l'elicitazione può attivare la produzione di altre molecole coinvolte nella risposta agli stress, modificando la specificità del profilo metabolico della coltura cellulare e inficiando il passaggio a valle di purificazione dei metaboliti di interesse.

Alla luce di quanto descritto, è pertanto evidente l'esigenza di mettere a punto nuove colture cellulari e tissutali vegetali e nuovi processi per la produzione biotecnologica di quercetina, in grado di superare gli svantaggi delle colture vegetali e dei processi attuali.

Secondo la presente invenzione, sono state generate varie linee cellulari di *Actinidia deliciosa* (kiwi) e *Actinidia chinensis* (kiwi giallo) in grado di produrre quantità rilevanti di quercetina e suoi derivati. In particolare, sei linee di calli friabili in grado di crescere velocemente sono state ottenute delle specie *Actinidia deliciosa* (kiwi verde) e *Actinidia chinensis* (kiwi giallo). Dal momento che i calli friabili si disaggregano facilmente in coltura liquida, essi sono stati scelti come candidati promettenti per la coltivazione in bioreattore e sono stati ulteriormente caratterizzati nel dettaglio. Le sei linee cellulari hanno generato sospensioni cellulari

omogenee in coltura liquida (dati non mostrati). Il metaboloma dei loro estratti metanolici è stato analizzato con un approccio *untargeted*. In particolare, le linee cellulari di *A. deliciosa* sono state caratterizzate con tecniche di metabolomica *targeted* e *untargeted* per definire a livello qualitativo e quantitativo il loro profilo di derivati della quercetina.

Sorprendentemente, è stato dimostrato che le linee Ad-2,3,4 accumulano vari derivati della quercetina in un range compreso tra 5.14 mg/100g peso fresco per Ad-4 a 13.26 mg/100g peso fresco per Ad-2 (corrispondenti a 146.38 e 419.76 mg/100g peso secco). Questi risultati sono stati ottenuti senza l'applicazione di alcune tecniche per incrementare il contenuto di metaboliti specializzati. In aggiunta, le determinazioni sono state effettuate sul peso fresco e non sul peso secco. La determinazione del peso secco delle linee cellulari ha mostrato, nella linea Ad-2 per esempio, un contenuto di acqua del 96.84%, e una perdita di peso di 31 volte (peso fresco / peso secco) quando i calli di 30 giorni cresciuti su mezzo A descritto nell'esempio 1 sono stati disidratati. Pertanto, il dato normalizzato mostra un contenuto di quercetina di 419.76 mg/100 g peso secco. Queste stime non riflettono precisamente il contenuto del materiale fresco, principalmente per via della possibile degradazione di alcuni dei metaboliti durante il processo di disidratazione. Tuttavia, anche se i metodi non sono direttamente confrontabili, la quantità di quercetine osservate nelle linee cellulari

della presente invenzione, e in particolare nella linea Ad-2, la rendono un promettente ed interessante biosistema per la produzione industriale di quercetina.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un procedimento per la preparazione di una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* che produce glicosidi della quercetina, detto processo comprendendo o essendo consistente nelle seguenti fasi:

a) coltivare un espianto tissutale di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* su un mezzo solido al fine di indurre la formazione di un callo, detto mezzo solido comprendendo una o più auxine e una o più citochinine, in cui la concentrazione di ciascuna auxina di dette una o più auxine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.5 a 1.5 mg/l, più preferibilmente 1 mg/l e la concentrazione di ciascuna citochinina di dette una o più citochinine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.25 a 0.75 mg/l, più preferibilmente 0.5 mg/l; e

b) selezionare una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis*.

La concentrazione di auxine o citochinine nella fase a) è espressa in mg per litro di mezzo solido. La linea cellulare può essere mantenuta vitale trasferendola su nuovo mezzo solido ogni 10 fino a 90 giorni, preferibilmente ogni 30 giorni.

Il procedimento secondo la presente invenzione può comprendere ulteriormente a') sterilizzare l'espianto tissutale prima della fase a).

Secondo la presente invenzione, la fase b) può essere effettuata ripetendo le seguenti fasi consecutive:

b') selezionare un callo ottenuto nella fase a), o una sua porzione, che possiede caratteristiche morfologiche omogenee, quali colore verde brillante e struttura friabile, e

b'') trasferire tale callo o una sua porzione su un mezzo solido fresco, detto mezzo solido comprendendo una o più auxine e una o più citochinine, in cui la concentrazione di ciascuna auxina di dette una o più auxine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.5 a 1.5 mg/l, più preferibilmente 1 mg/l e la concentrazione di ciascuna citochinina di dette una o più citochinine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.25 a 0.75 mg/l, più preferibilmente 0.5 mg/l,

dette fasi b') e b'') essendo ripetute fino all'ottenimento di una linea cellulare indifferenziata con caratteristiche morfologiche omogenee e ciclo vitale stabile.

Le caratteristiche morfologiche omogenee possono essere osservate, per esempio, tramite uno stereomicroscopio. Una linea cellulare ha caratteristiche morfologiche omogenee quando il callo consiste di aggregati cellulari con lo stesso colore verde, privi di imbrunimento, che rappresenta uno stato ossidato.

Una linea cellulare ha un ciclo vitale stabile quando le caratteristiche morfologiche e la crescita in massa del callo (dovuta alla proliferazione cellulare)

nella coltura *in vitro* sono costanti ad ogni ciclo di subcoltura, cioè ad ogni trasferimento di una parte del callo in un nuovo mezzo di coltura secondo i tempi sopra indicati, per esempio ogni 30 giorni.

Secondo la presente invenzione, dette una o più auxine possono essere selezionate dal gruppo consistente in acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), acido  $\alpha$ -naftalenacetico ( $\alpha$ -NAA), acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico (tordon o picloram), acido indol-3-butirrico (IBA), acido 3-indolacetico (IAA), preferibilmente acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e acido indol-3-butirrico (IBA).

Secondo la presente invenzione, le citochinine possono essere selezionate dal gruppo consistente in 6-benzilaminopurina (6-BAP), trans-zeatina, kinetina, isopenteniladenina, tidiazuron, preferibilmente 6-benzilaminopurina (6-BAP).

Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, il mezzo solido può comprendere acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), acido indol-3-butirrico (IBA) e 6-benzilaminopurina (6-BAP) nelle concentrazioni sopracitate.

Il mezzo solido può ulteriormente comprendere altri ingredienti come per esempio sali, come MS o Gamborg B5, zucchero come saccarosio o una fonte di saccarosio, per esempio tra 15 e 35 g/l, e vitamine. La concentrazione è espressa in g per litro di mezzo solido.

Generalmente, il pH del mezzo solido varia da 4 a 7.

Il mezzo di coltura contiene uno o più agenti addensanti che rendono solido il mezzo, come per esempio agar, pectine, carragenina, psillio, farina di semi di carrube, per esempio in percentuale dallo 0.2 al 5%.

La fase a') di sterilizzare l'espianto tissutale può essere effettuato trattando l'espianto tissutale con una soluzione acquosa di un detergente, un alcol e/o sodio ipoclorito. Per esempio, la sterilizzazione può essere svolta trattando il tessuto espantato con etanolo dal 50 al 90% v/v, più preferibilmente 70% v/v, per un tempo dai 30 secondi ai 10 minuti, trattando poi con sodio ipoclorito da 0.5 a 5% v/v, più preferibilmente 1.5% v/v, per un tempo dai 5 ai 50 minuti.

Secondo la presente invenzione, l'espianto tissutale può essere un espianto di un tessuto scelto dal gruppo consistente in gemma apicale, giovane internodo, giovane nodo con meristema laterale e giovani foglie, preferibilmente giovane nodo.

Secondo una realizzazione della presente invenzione, *Actinidia deliciosa* può essere *Actinidia deliciosa* cv. Hayward e *Actinidia chinensis* può essere *Actinidia chinensis* cv. Hort16A.

Secondo il procedimento della presente invenzione, i glicosidi della quercetina possono essere scelti dal gruppo che consiste in quercetina-O-esoside, diidroquercetina-O-esoside (taxifolina esoside), quercetina-O-diesoside, quercetina-O-esoside desossiesoside O-esoside, quercetina-O-esoside-O-

desossiesoside, metilquercetina-0-diesoside  
 (isohramnetina-0-diesoside), quercetina-0-esoside-0-  
 esoside-desossiesoside, quercetina-0-diesoside,  
 quercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-3-0-  
 rutinoside, quercetina-3-0-esoside, quercetina-3-0-  
 glucoside, quercetina-0-didesossiesoside,  
 metilquercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-0-  
 desossiesoside, quercetina-0-glucuronide, quercetina-0-  
 esoside, preferibilmente quercetina-3-0-glucoside e  
 quercetina-3-0 rutinoside.

La presente invenzione concerne anche una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* che produce glicosidi della quercetina, detta linea cellulare indifferenziata essendo ottenibile mediante il processo come definito sopra e nelle rivendicazioni.

Secondo la presente invenzione, la linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* può essere una linea cellulare caratterizzata da un metaboloma che comprende:

a) i seguenti glicosidi della quercetina:

quercetina-0-esoside, diidroquercetina-0-esoside  
 (taxifolina esoside), quercetina-0-diesoside,  
 quercetina-0-esoside desossiesoside 0-esoside,  
 quercetina-0-esoside-0-desossiesoside, metilquercetina-  
 0-diesoside (isohramnetina-0-diesoside), quercetina-0-  
 esoside-0-esoside-desossiesoside, quercetina-0-  
 diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside,  
 quercetina-3-0-rutinoside, quercetina-3-0-esoside,  
 quercetina-3-0-glucoside, quercetina-0-

didesossiesoside, metilquercetina-O-esoside  
 desossiesoside, quercetina-O-desossiesoside,  
 quercetina-O-glucuronide, quercetina-O-esoside, e

b) i seguenti composti:

acido cumarico-acido aspartico, procianidina tipo  
 P2, epicatechina, kanferolo-O-esoside,  
 trihidrossiflavanone-O-esoside (naringenina),  
 diidrokanferolo-O-esoside.

Secondo la presente invenzione, la linea cellulare indifferenziata può essere caratterizzata dal fatto che il suo metaboloma comprende:

da 50 a 250 mg/100g peso secco di quercetin-3-O-rutinoside;

da 10 a 250 mg/100g peso secco di quercetin-3-O-glucoside;

da 10 a 200 mg/100g peso secco di altri glicosidi della quercetina;

da 70 a 700 mg/100g peso secco di glicosidi della quercetina totali.

Per esempio, una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* secondo la presente invenzione può essere caratterizzata dal fatto che il suo metaboloma contiene

94.48 mg/100g peso secco  $\pm$ 4.88 di quercetin-3-O-rutinoside;

181.99 mg/100g peso secco  $\pm$ 6.52 di quercetin-3-O-glucoside;

139.29 mg/100g peso secco  $\pm$  5.72 di altri glicosidi della quercetina;

419.76 mg/100g peso secco  $\pm$  7.37 di glicosidi

della quercetina totali.

Secondo un'altra forma di realizzazione della presente invenzione la linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* è caratterizzata dal fatto che il suo metaboloma comprende:

140.54 mg/100g peso secco  $\pm 6.50$  di quercetin-3-O-rutinoside;

23.58 mg/100g peso secco  $\pm 0.31$  di quercetin-3-O-glucoside;

121.14 mg/100g peso secco  $\pm 3.62$  di altri glicosidi della quercetina;

285.26 mg/100g peso secco  $\pm 10.44$  di glicosidi della quercetina totali.

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione, la linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* è caratterizzata dal fatto che il suo metaboloma comprende:

76.01 mg/100g peso secco  $\pm 4.12$  di quercetin-3-O-rutinoside;

19.77 mg/100g peso secco  $\pm 2.46$  di quercetin-3-O-glucoside;

50.60 mg/100g peso secco  $\pm 24.93$  di altri glicosidi della quercetina;

146.38 mg/100g peso secco  $\pm 18.35$  di glicosidi della quercetina totali.

Secondo la presente invenzione, la dicitura mg/100g sopracitata indica i mg di glicoside della quercetina in 100 g di colture cellulari secche, cioè peso secco. L'acqua può essere rimossa per evaporazione in una stufa a 80°C per 18 ore.

La presente invenzione riguarda anche l'uso di una linea cellulare indifferenziata come definita sopra e nelle rivendicazioni, per la produzione di glicosidi della quercetina e di qualsiasi composto non glicosilato (agliconi) che possa essere ottenuto a valle di detti glicosidi prodotti dalla linea cellulare, per esempio tramite idrolisi che può essere una idrolisi chimica o una idrolisi enzimatica. In particolare, detti composti non glicosilati possono essere una quercetina ottenuta da detti glicosidi della quercetina o un derivato della quercetina. Per esempio, un derivato della quercetina può essere la diidroquercetina ottenuta dalla diidroquercetina-O-esoside o la metilquercetina ottenuta dalla metilquercetina-O-diesoside e dalla metilquercetina-O-esoside desossiesoside.

I glicosidi della quercetina che possono essere prodotti tramite l'uso di linee cellulari indifferenziate come definito sopra possono essere scelti dal gruppo che consiste in

quercetina-O-esoside, diidroquercetina-O-esoside (taxifolina esoside), quercetina-O-diesoside, quercetina-O-esoside desossiesoside O-esoside, quercetina-O-esoside-O-desossiesoside, metilquercetina-O-diesoside (isohramnetina-O-diesoside), quercetina-O-esoside-O-esoside-desossiesoside, quercetina-O-diesoside, quercetina-O-esoside desossiesoside, quercetina-3-O-rutinoside, quercetina-3-O-esoside, quercetina-3-O-glucoside, quercetina-O-didesossiesoside, metilquercetina-O-esoside

desossiesoside, quercetina-O-desossiesoside,  
quercetina-O-glucuronide, quercetina-O-esoside,  
preferibilmente quercetina-3-O-glucoside e quercetina-  
3-O-rutinoside.

Come menzionato sopra, secondo la presente invenzione, il procedimento può includere anche la produzione di qualsiasi composto non glicosilato, come quercetina o derivati, che possa essere ottenuto a valle di detti glicosidi della quercetina tramite idrolisi. Secondo la presente invenzione, l'idrolisi può essere un'idrolisi chimica e/o un'idrolisi enzimatica.

Conformemente, la presente invenzione riguarda anche un procedimento per la produzione di glicosidi della quercetina e/o composti non glicosilati ottenuti da detti glicosidi, come le quercetine, detto procedimento comprendendo o essendo consistente in:

A) coltivare una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* come definito sopra o

A') preparare una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* tramite il procedimento come definito sopra e coltivare la linea cellulare indifferenziata ottenuta; e

B) estrarre i glicosidi della quercetina.

Secondo la presente invenzione, il procedimento può ulteriormente includere C) ottenere un composto non glicosilato, come la quercetina, da detti glicosidi della quercetina mediante idrolisi di detti glicosidi della quercetina. Secondo la presente invenzione,

l'idrolisi può essere un'idrolisi chimica e/o un'idrolisi enzimatica.

I glicosidi della quercetina che possono essere prodotti secondo il procedimento della presente invenzione possono essere scelti dal gruppo che consiste in:

quercetina-0-esoside, diidroquercetina-0-esoside (taxifolina esoside), quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside 0-esoside, quercetina-0-esoside-0-desossiesoside, metilquercetina-0-diesoside (isohramnetina-0-diesoside), quercetina-0-esoside-0-esoside-desossiesoside, quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-3-0-rutinoside, quercetina-3-0-esoside, quercetina-3-0-glucoside, quercetina-0-didesossiesoside, metilquercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-0-desossiesoside, quercetina-0-glucuronide, quercetina-0-esoside, preferibilmente quercetina-3-0-glucoside e quercetina-3-0-rutinoside.

La presente invenzione sarà ora descritta in modo illustrativo ma non limitativo, conformemente alle forme di realizzazione preferite della stessa, con particolare riferimento agli esempi e ai disegni allegati, in cui:

La **Figura 1** mostra linee cellulari di *Actinidia deliciosa* (Ad) e *Actinidia chinensis* (Ac); l'organo vegetale da cui ogni coltura cellulare è stata realizzata è raffigurato;

la **Figura 2** mostra i "Base Peak Chromatograms"

(BPC) di calli di 30 giorni delle linee cellulari Ac-7, Ac-8 e Ac-9, ottenuti mediante UPLC-PDA-ESI-QqTOF; questi profili sono stati ottenuti dall'iniezione nello strumento di differenti volumi di estratti metanolici (1  $\mu$ l per Ac-7 e 2  $\mu$ l per Ac-8 e Ac-9);

la **Figura 3** mostra il cromatogramma registrato a 355 nm di lunghezza d'onda e i "Base Peak Chromatograms" (BPC) di calli di 30 giorni delle linee cellulari Ad-2, Ad-3 e Ad-4, ottenuti mediante UPLC-PDA; UA=Unità di assorbanza;

la **Figura 4** mostra il confronto tra i cromatogrammi da 1  $\mu$ l di estratto metanolico di Ad-2 e 2  $\mu$ l di Ac-9, usando la stessa scala sull'asse Y (intensità, espressa come percentuale rispetto al picco più intenso di Ad-2);

la **Figura 5** mostra la curva di calibrazione della quercetina-3-O-glucoside e della quercetina-3-O-rutinoside; i valori sono medie di due misure indipendenti, +/- deviazione standard; sono riportati l'equazione di regressione lineare e il relativo R<sup>2</sup>; UA=Unità di assorbanza.

#### **ESEMPIO 1:**

#### **Materiali e Metodi**

##### Generazione di linee cellulari di *Actinidia*

Allo scopo di generare linee cellulari da *Actinidia deliciosa* cv. Hayward (Paese d'origine: Italia) e *Actinidia chinensis* cv. Hort16A (Paese d'origine: Italia), sono state utilizzate piante di 1 anno (Paese d'origine: Italia) generate tramite micropropagazione e cresciute in serra. Quattro tipi di

espianti (gemma apicale, giovane internodo, giovane nodo con meristema laterale e giovani foglie) sono stati escissi dalla porzione superiore delle piante. Gli espianti sono stati trattati con etanolo 70% (v/v) per 1 min, seguiti da 20 min in ipoclorito di sodio 1.5% (v/v). Sono stati risciacquati 5 volte con acqua sterile, tagliati in frammenti o strisce di circa 0.5 cm e posizionati su due terreni solidi, A e B, per favorire l'induzione del callo (**Tabella 3**). I calli così generati sono stati trasferiti ogni 30 giorni su nuovo mezzo. Per la determinazione del peso secco, 500 mg di calli di 30 giorni sono stati campionati in triplicato dalle linee Ad-2, 3 e 4 ed essiccati per 20 ore in una stufa a 80°C.

**Tabella 3. Composizione dei mezzi di coltura**

<b>Ingredienti</b>	<b>Mezzo A</b>	<b>Mezzo B</b>	<b>Mezzo C</b>
sali	MS	MS	MS
Saccarosio	25 g/l	25 g/l	25 g/l
2.4 D	1 mg/l	-	-
6-BAP	0.5 mg/l	0.5 mg/l	0.25 mg/L
IBA	-	1 mg/l	0.5 mg/l
Agar	0.7%	0.7%	0.7%
pH	5.8	5.8	5.8

*Estrazione dei metaboliti*

Calli di 30 giorni sono stati campionati e polverizzati in azoto liquido usando mortaio e pestello. Circa 150 mg di polvere congelata sono stati

estratti in 900  $\mu$ l di metanolo LC-MS (Honeywell, Seezle, Germania). I campioni sono stati miscelati con vortex per 30 s e sonicate in un bagno di acqua e ghiaccio a 40 kHz nel bagno ultrasonico Sonica Ultrasonic Cleaner (SOLTEC, Milano, Italia) per 15 min. I campioni sono stati poi centrifugati a 14000x g per 10 min e il surnatante è stato recuperato. Per la quantificazione dei glicosidi della quercetina nelle line di *A. deliciosa*, la procedura di estrazione descritta è stata ripetuta sullo stesso pellet altre due volte, unendo alla fine i tre surnatanti metanolici recuperati. Per l'analisi, gli estratti sono stati diluiti 1:10 (v/v) con acqua LC-MS e filtrati attraverso filtri Minisart RC4 con pori da 0.2  $\mu$ m (Sartorius, Göttingen, Germania) e 1 o 2  $\mu$ l (come indicato in Fig. 2 e 3) sono stati iniettati nel sistema UPLC-PDA-ESI-QqTOF per l'analisi metabolomica *untargeted*, mentre 4  $\mu$ l sono stati iniettati per la quantificazione dei metaboliti.

Analisi dei metaboliti tramite UPLC-PDA-ESI-QqTOF

Gli estratti diluiti di *Actinidia* sono stati analizzati con UPLC-PDA-ESI-QqTOF. L'UPLC consiste di un sistema ACQUITY I CLASS (Waters, Milford, MA, USA) equipaggiato con una colonna a fase inversa BEH C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) termostata a 30°C. Il metodo cromatografico è durato 20 min e ha previsto i seguenti passaggi: i) condizione iniziale all'1% di B; ii) condizione isocratica all'1% di B per 1 min; iii) gradiente dal 40% di B a 10 min; iv) gradiente al 70% di B a 13.5 min; v) gradiente al 99% di B a 14 min; vi)

condizione isocratica al 99% di B per 2 min; vii) gradiente all'1% di B a 16.10 min; viii) condizione isocratica all'1% di B (riequilibrio per ripristinare la condizione iniziale) per 3.9 min. I solventi utilizzati sono: A) acqua acidificata con 0.1% (v/v) di acido formico e B) acetonitrile. Il flusso è stato impostato a 0.350 ml/min. I campioni sono stati posizionati all'interno di un Sistema autocampionatore FTN Autosampler e mantenuti a 8°C. Il Sistema UPLC era collegato a un detector Acquity PDA (Waters) seguito da uno spettrometro di massa Xevo G2-XS qTOF (Waters). Il PDA montava un detector eLambda in grado di acquisire da 190 a 800 nm. Lo spettrometro di massa era equipaggiato con una sorgente di ionizzazione electrospray (ESI) operante in modalità di ionizzazione negativa e positiva. Sono stati utilizzati gli stessi parametri della sorgente di quelli descritti in una precedente pubblicazione [48]. Lo spettrometro di massa QqTOF è stato impostato per acquisire i dati in continuo in modalità *sensitivity*. Il range di scansione è stato impostato a 50-2000 m/z e il tempo di scansione a 0.3 s. L'argon è stato usato come gas per la *CID* (*collision induced fragmentation*) e l'energia di collisione è stata fissata a 35 V. Il software Masslynx v4.1 (Waters) è stato utilizzato per gestire tutte le funzioni del sistema UPLC, PDA e ESI/QqTOF. Al fine di controllare l'accuratezza dello spettrometro di massa, una soluzione di 100 pg/ $\mu$ l di leucina-enkefalina è stata iniettata con un flusso di 10  $\mu$ l /min generando un segnale di 556.2771 in modalità di ionizzazione

positiva e 554.2615 in modalità negativa. I dati grezzi di massa sono stati processati usando Masslynx v4.1 software (Waters).

#### Quantificazione dei metaboliti

I dettagli delle identificazioni dei glicosidi della quercetina sono riportati nella sezione dei Risultati. I metaboliti sono stati identificati tramite confronto del tempo di ritenzione, dell' $m/z$ , del pattern isotopico e di quello di frammentazione con quelli di un database interno di standard autentici, o tramite il confronto di  $m/z$  e pattern isotopico con quello di database pubblici.

Per la quantificazione, le aree dei picchi dei glicosidi della quercetina sono stati ottenuti dai dati UPLC-PDA-QqTOF, usando i cromatogrammi registrati a 355 nm di lunghezza d'onda e la funzione di integrazione automatica disponibile nel software Masslynx v4.1, con controllo manuale per ogni picco. I composti quercetina-3-O-glucoside e quercetina-3-O-rutinoside sono stati utilizzati come standard esterni.

### **Risultati**

#### Generazione di linee cellulari di *Actinidia*

Per la generazione delle linee cellulari sono stati espantati su mezzo solido A le gemme apicali, giovani internodi, giovani nodi con meristema laterale e giovani foglie di *Actinidia deliciosa* (Ad) e *A. chinensis* (Ac). I giovani internodi di entrambe le specie sono stati espantati anche sul mezzo solido B, differente per la composizione ormonale (si veda la Tabella 3 della sezione Materiali e metodi).

Due settimane dopo l'inizio della coltura, tutti gli espianti apparivano rigonfi e avevano generato piccole quantità di callo. A questo stadio, gli espianti sono stati tagliati in 3-4 pezzi in modo da stimolare ulteriormente la formazione di callo.

Tre mesi dopo l'inizio della coltura, tutti gli espianti hanno formato calli in abbondante proliferazione. Nel mezzo A, gli espianti di entrambe le specie, ad eccezione di quelli originati dalle giovani foglie, hanno formato calli verdi friabili in grado di crescere velocemente. Diversamente, gli espianti delle giovani foglie hanno formato calli eterogenei, duri di colore verde scuro o soffici di colore verde brillante. Sul mezzo B, tutti i calli mostravano aspetto verde scuro e duro, manifestando frequente imbrunimento. A questo stadio, il mezzo B è stato sostituito con il mezzo C ed è stata quindi effettuata la continua selezione manuale di porzioni verdi e friabili dai calli eterogenei. Nove mesi dopo l'inizio della coltura, sono state ottenute varie linee cellulari di *Actinidia* in grado di crescere velocemente. I calli ottenuti su mezzo A erano tutti friabili, mentre quelli su mezzo B tutti duri. Sei calli friabili sono stati selezionati per ulteriori caratterizzazioni (**Figura 1**). I calli delle linee Ad-2,3,4 e Ac-7,8,9 sono stati anche trasferiti in mezzo di coltura liquido (mezzo A senza agar), all'interno del quale si sono disaggregati rapidamente generando una fine sospensione cellulare.

Analisi metabolomica untargeted

I calli di aspetto verde brillante e friabile di *A. deliciosa* (Ad-2,3,4) e *A. chinensis* (Ac-7,8,9) sono stati analizzati con un approccio di metabolomica *untargeted*. Gli estratti metanolici sono stati preparati, diluiti e analizzati tramite Ultra Performance Liquid Chromatography- PhotoDiode Array Detector-ElectroSpray ionization-Quadrupole quadrupole Time Of Flight (UPLC-PDA-ESI-QqTOF) come descritto nella sezione Materiali e metodi. Dal momento che i calli duri non sono idonei per lo sviluppo di una coltura liquida in bioreattore, le linee cellulari ottenute sul mezzo B non sono state ulteriormente caratterizzate.

I profili cromatografici degli estratti metanolici delle sei linee cellulari di *Actinidia* cresciuti su mezzo A sono mostrati nelle **Figure 2, 3 e 4**. Sorprendentemente, la loro caratterizzazione ha rivelato che i glicosidi della quercetina rappresentavano i principali metaboliti nelle linee Ad. La quercetina-3-O-glucoside e la quercetina-3-O-rutinoside sono state identificate in modo univoco tramite comparazione del tempo di ritenzione, del rapporto massa su carica ( $m/z$ ), del profilo isotopico, del profilo di frammentazione (MS/MS) e dello spettro di assorbimento UV/Vis con quelli di standard autentici. Gli altri derivati della quercetina sono stati identificati in modo putativo sulla base del loro  $m/z$ , del picco di assorbimento a 355 nm di lunghezza d'onda e della presenza dei seguenti frammenti diagnostici dell'aglicone della quercetina: 301.0340,

299.0190, 151.0030 and 178.9970.

Le linee cellulari di *A. chinensis* (Ac) hanno mostrato profili cromatografici complessi, caratterizzati da molti picchi (**Figura 2**). Al contrario, i profili cromatografici di *A. deliciosa* (Ad) erano più semplici, caratterizzati da pochi e intensi picchi (**Figura 3**). Le intensità di questi segnali non erano comparabili con quelli presenti nelle linee Ac, persino quando 2 µl dei campioni di queste linee Ac sono stati iniettati (**Figura 4**).

Caratterizzazione e quantificazione dei glicosidi della quercetina

Dati i pochi e intensi picchi riscontrati nelle linee cellulari Ad, queste sono state considerate come le migliori candidate per progettare uno sviluppo su scala industriale della produzione di quercetina. Infatti, la presenza di poche ma abbondanti molecole semplifica fortemente i processi a valle di estrazione e purificazione dei metaboliti. Per tali ragioni, le linee cellulari Ad sono state ulteriormente caratterizzate. Nella **Tabella 1**, i segnali rilevati tramite analisi UPLC-PDA-ESI-QqTOF sono stati putativamente identificati e attribuiti ad almeno quindici differenti glicosidi della quercetina. La quantificazione dei vari glicosidi della quercetina nelle colture Ad è stata effettuata utilizzando solo il sistema UPLC-PDA e iniettando differenti quantità dei due standard commerciali quercetina-3-O-glucoside e quercetina-3-O-rutinoside. Le aree dei picchi misurate a 355 nm di lunghezza d'onda sono state utilizzate per

la costruzione di una curva di calibrazione (**Figura 5**).

La tabella 1 mostra il tempo di ritenzione ( $R_t$ , in minuti), l'assorbimento massimo ( $\lambda_{max}$ ), l' $m/z$  rilevato e quello teorico, entrambi in modalità di ionizzazione negativa, la formula elementare, la putativa identificazione e i principali frammenti (ms/ms). \*Questi metaboliti sono stati identificati in modo univoco con l'ausilio di standard autentici. *N.i., non identificato.*

Tabella 1

<b><i>Rt</i></b> <b><i>(min)</i></b>	<b><i>λ max</i></b> <b><i>(nm)</i></b>	<b><i>m/z (-)</i></b> <b><i>rilevato</i></b>	<b><i>m/z (-)</i></b> <b><i>teorico</i></b>	<b><i>Formula</i></b> <b><i>elementar</i></b>	<b><i>Identificazione putativa</i></b>	<b><i>Framme</i></b> <b><i>nti</i></b> <b><i>MS/MS</i></b>
4.64	284	463.088	463.088	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Quercetina-O-esoside	301.034
	355					
4.64	284	465.103	465.103	$C_{21}H_{22}O_{12}$	Diidroquercetina-O-esoside (taxifolina-O-esoside)	285.036 303.050
	355					
4.73	249	625.140	625.140	$C_{27}H_{30}O_{17}$	Quercetina-O-diesoside	301.034
	355					
4.74	253	771.1976	771.198	$C_{33}H_{40}O_{21}$	Quercetina-O-esoside desossiesoside-O-esoside	299.019 301.034 463.086 609.145 625.140
	354					
4.74	253	817.204	817.204	$C_{33}H_{40}O_{21}+$	Quercetina-O-esoside- HCOOH desossiesoside-O-esoside, addotto formico	301.034 463.086 609.145 625.140
	354					
4.83		278.066	278.066	$C_{13}H_{13}NO_6$	Acido cumarico-acido aspartico	163.038
5.06		278.066	278.066	$C_{13}H_{13}NO_6$	Acido cumarico-acido aspartico	-
5.13	249	609.143	609.146	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Quercetina-O-esoside-O- desossiesoside	299.019 301.034 463.084
	355					
5.13	249	577.134	577.134	$C_{30}H_{25}O_{12}$	Procianidina tipo P2	289.070

	355						
5.21	284	449.109	449.108	$C_{21}H_{22}O_{11}$	Diidrokanferolo-O-esoside	287.055	
	355						301.071
5.21	249	639.156	639.156	$C_{28}H_{32}O_{17}$	Metilquercetina-O-diesoside	315.050	
	355				(isoramnetina-O-diesoside)		463.087
5.45		289.071	289.071	$C_{15}H_{14}O_6$	Epicatechina*	-	
5.55		461.165			N.i.	-	
5.62	249	771.974	771.198	$C_{33}H_{40}O_{21}$	Quercetina-O-esoside-O-	301.034	
	355				esoside-desossiesoside		463.086
							609.454
5.712	249	625.140	625.140	$C_{27}H_{30}O_{17}$	Quercetina-O-diesoside	299.019	
	355						300.026
							301.034
							463.086
6.29	249	609.147	609.146	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Quercetina-O-esoside	300.026	
	354				desossiesoside		301.033
6.35	253	609.147	609.146	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Quercetina-3-O-rutinoside*	151.003	
	355						178.997
							299.019
							300.027
							301.033
							609.145
6.51	249	463.088	463.088	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Quercetina-3-O-esoside	300.026	
	355						301.033
6.57	254	463.088	463.088	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Quercetina-3-O-glucoside*	151.003	
	355						178.997
							299.019
							300.027
							301.033
6.82	248	593.151	593.150	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Quercetina-O-di desossiesoside	285.038,	
	355						301.032
6.93	249	623.160	623.161	$C_{28}H_{32}O_{16}$	Metilquercetina-O-esoside	299.019	
	355				desossiesoside		315.049
7.09	249	447.092	447.092	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Kanferolo-O-esoside	255.029	
	355						284.031

						285.038
7.15	253	447.093	447.092	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercetina-O-desossiesoside	151.003
	355					178.997
						299.019
						300.026
						301.033
7.19	249	477.103	477.066	$C_{21}H_{18}O_{13}$	Quercetina-O-glucuronide	300.026
	330					301.033
	355					314.042
						315.047
7.19	249	709.380			N.i.	300.026
	330					301.033
	355					314.042
						315.047
7.32	327	515.072			N.i.	160.956
						162.950
7.38	249	433.113	433.113	$C_{20}H_{18}O_{11}$	Triidrossiflavanone-O-esoside	271.060
	355				(naringenina)	301.034
7.38	249	463.088			Quercetina-O-esoside	151.003
	355					178.997
						301.034
7.38	249	415.073			N.i.	271.060
	355					301.034
7.67		663.373			N.i.	160.956
		709.379				162.950
						439.320
8.14		663.373			N.i.	160.956
		709.379				162.950
						439.320
8.24		711.395	711.408	$C_{34}H_{65}O_{13}P$	PI(25,0)	503.366
8.28		711.395	711.408	$C_{34}H_{65}O_{13}P$	PI(25,0)	503.367

Le curve di calibrazione hanno mostrato un buon coefficiente di linearità ( $R^2= 0.9982$  per la quercetina-3-O-glucoside e  $R^2= 0.9983$  per la

quercetina-3-O-rutinoside). Le aree dei picchi dei glicosidi della quercetina registrati a 355 nm di lunghezza d'onda sono state misurate e i valori sono stati interpolati con la curva di calibrazione. I due principali glicosidi della quercetina, cioè la quercetina-3-O-glucoside e la quercetina-3-O-rutinoside, sono stati quantificati mediante i rispettivi standard autentici mentre gli altri glicosidi sono stati espressi come equivalenti di quercetina-3-O-glucoside (**Tabella 2**).

La Tabella 2 mostra la quantificazione dei glicosidi della quercetina nelle linee cellulari Ad, espressi come mg/100g di peso fresco (a) e, dopo normalizzazione per la perdita di peso in seguito ad essiccazione, come mg/100g di peso secco (b). Ogni valore rappresenta la media di due repliche tecniche +/- deviazione standard.

Tabella 2

a)

<b>mg/100g peso fresco</b>			
<b>Metabolita</b>	<b>Ad-2</b>	<b>Ad-3</b>	<b>Ad-4</b>
<i>Quercetina-3-O-rutinoside</i>	$3.11 \pm 0.15$	$4.87 \pm 0.23$	$2.67 \pm 0.14$
<i>Quercetina-3-O-glucoside</i>	$5.75 \pm 0.21$	$0.81 \pm 0.01$	$0.69 \pm 0.09$
<i>Altri glicosidi della quercetina</i>	$4.40 \pm 0.18$	$4.20 \pm 0.13$	$1.78 \pm 0.87$
<i>Glicosidi della quercetina totali</i>	$13.26 \pm 0.23$	$9.90 \pm 0.36$	$5.14 \pm 0.64$

b)

<b>mg/100g peso secco</b>			
<b>Metabolita</b>	<b>Ad-2</b>	<b>Ad-3</b>	<b>Ad-4</b>
<i>Quercetina-3-O-rutinoside</i>	$94.48 \pm 4.88$	$140.54 \pm 6.50$	$76.01 \pm 4.12$
<i>Quercetina-3-O-glucoside</i>	$181.99 \pm 6.52$	$23.58 \pm 0.31$	$19.77 \pm 2.46$

<i>Altri glicosidi della quercetina</i>	$139.29 \pm 5.72$	$121.14 \pm 3.62$	$50.60 \pm 24.93$
<i>Glicosidi della quercetina totali</i>	$419.76 \pm 7.37$	$285.26 \pm 10.44$	$146.38 \pm 18.35$

### Referenze

1. Bianconi, M.; Ceriotti, L.; Cuzzocrea, S.; Esposito, E.; Pressi, G.; Sgaravatti, E.; Bertaiola, O.; Guarnerio, C.; Barbieri, E.; Semenzato, A.; et al. Red carrot cells cultured in vitro are effective, stable, and safe ingredients for skin care, nutraceutical, and food applications. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*.
2. Cragg, G.M.; Schepartz, S.A.; Suffness, M.; Grever, M.R. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J Nat Prod* **1993**, *56*, 1657-1668.
3. Fraga, C.G.; Croft, K.D.; Kennedy, D.O.; Tomás-Barberán, F.A. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* **2019**, *10*, 514-528.
4. Ciumărnean, L.; Milaciu, M.V.; Runcan, O.; Vesa, Ş.C.; Răchişan, A.L.; Negrean, V.; Perné, M.-G.; Donca, V.I.; Alexescu, T.-G.; Para, I. The effects of flavonoids in cardiovascular diseases. *Molecules* **2020**, *25*, 4320.
5. Hollman, P.C.; Geelen, A.; Kromhout, D.J.T.J.o.n. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr* **2010**, *140*, 600-604.
6. Briguglio, G.; Costa, C.; Pollicino, M.; Giambò, F.; Catania, S.; Fenga, C. Polyphenols in cancer

prevention: New insights. *Int J Funct Nutr* **2020**, 1, 1-1.

7. Ammar, A.; Trabelsi, K.; Boukhris, O.; Bouaziz, B.; Müller, P.; M Glenn, J.; Bott, N.T.; Müller, N.; Chtourou, H.; Driss, T. Effects of polyphenol-rich interventions on cognition and brain health in healthy young and middle-aged adults: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Med* **2020**, 9, 1598.

8. Gubser, G.; Vollenweider, S.; Eibl, D.; Eibl, R. Food ingredients and food made with plant cell and tissue cultures: State-of-the art and future trends. *Eng Life Sci* **2021**, 21, 87-98.

9. Pressi, G.; Bertaiola, O.; Guarnerio, C.; Barbieri, E.; Guzzo, F.; Durand, C.; Peno-Mazzarino, L.; Cocetta, V.; Giacomini, I.; Semenzato, A. In Vitro Cultured *Melissa officinalis* Cells as Effective Ingredient to Protect Skin Against Oxidative Stress, Blue Light, and Infrared Irradiations Damages. *Cosmetics* **2021**, 8, 23.

10. Neveu, V.; Perez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**, 2010.

11. Rothwell, J.; Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Medina-Ramon, A.; M'Hiri, N.; Garcia Lobato, P.; Manach, C.; Knox, K.; Eisner, R.; Wishart, D. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database* **2013**, 2013,

doi:10.1093/database/bat070

12. Rothwell, J.A.; Urpi-Sarda, M.; Boto-Ordóñez, M.; Knox, C.; Llorach, R.; Eisner, R.; Cruz, J.; Neveu, V.; Wishart, D.; Manach, C. Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database* **2012**, 2012.

13. Batiha, G.E.-S.; Beshbishy, A.M.; Ikram, M.; Mulla, Z.S.; El-Hack, M.E.A.; Taha, A.E.; Algammal, A.M.; Elewa, Y.H.A. The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: quercetin. *Foods* **2020**, 9, 374.

14. Kleemann, R.; Verschuren, L.; Morrison, M.; Zadelaar, S.; van Erk, M.J.; Wielinga, P.Y.; Kooistra, T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis* **2011**, 218, 44-52.

15. Li, Y.; Yao, J.; Han, C.; Yang, J.; Chaudhry, M.T.; Wang, S.; Liu, H.; Yin, Y. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* **2016**, 8, 167.

16. Wang, W.; Sun, C.; Mao, L.; Ma, P.; Liu, F.; Yang, J.; Gao, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Fu Sci Tech* **2016**, 56, 21-38.

17. Patel, R.V.; Mistry, B.M.; Shinde, S.K.; Syed, R.; Singh, V.; Shin, H.-S. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *Eur J Med Chem* **2018**, 155, 889-904.

18. Elumalai, P.; Lakshmi, S. Role of quercetin benefits in neurodegeneration. In *The Benefits of Natural Products for Neurodegenerative Diseases*; Springer: 2016; pp. 229–245.
19. Rauf, A.; Imran, M.; Khan, I.A.; ur-Rehman, M.; Gilani, S.A.; Mehmood, Z.; Mubarak, M.S. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytotherapy Res* **2018**, 32, 2109–2130.
20. Khan, H.; Ullah, H.; Aschner, M.; Cheang, W.S.; Akkol, E.K. Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease. *Biomolecules* **2020**, 10, 59.
21. Zhang, X.-W.; Chen, J.-Y.; Ouyang, D.; Lu, J.-H. Quercetin in animal models of Alzheimer's disease: a systematic review of preclinical studies. *Int J Mol Sci* **2020**, 21, 493.
22. David, A.V.A.; Arulmoli, R.; Parasuraman, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn Rev* **2016**, 10, 84.
23. Shi, G.-J.; Li, Y.; Cao, Q.-H.; Wu, H.-X.; Tang, X.-Y.; Gao, X.-H.; Yu, J.-Q.; Chen, Z.; Yang, Y. In vitro and in vivo evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. *Biomed Pharmacother* **2019**, 109, 1085–1099.
24. Abian, O.; Ortega-Alarcon, D.; Jimenez-Alesanco, A.; Ceballos-Laita, L.; Vega, S.; Reyburn, H.T.; Rizzuti, B.; Velazquez-Campoy, A. Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening. *Int J Biol Macromol* **2020**, 164, 1693–1703.

25. Liu, X.; Raghuvanshi, R.; Ceylan, F.D.; Bolling, B.W. Quercetin and its metabolites inhibit recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activity. *J Agric Food Chem* **2020**, *68*, 13982–13989.
26. Aucoin, M.; Cooley, K.; Saunders, P.R.; Cardozo, V.; Remy, D.; Cramer, H.; Abad, C.N.; Hannan, N. The effect of quercetin on the prevention or treatment of COVID-19 and other respiratory tract infections in humans: A rapid review. *Adv Integr Med* **2020**, *7*, 247–251.
27. Derosa, G.; Maffioli, P.; D'Angelo, A.; Di Pierro, F. A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Phytother Res* **2021**, *35*, 1230–1236.
28. Colunga Biancatelli, R.M.L.; Berrill, M.; Catravas, J.D.; Marik, P.E. Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). *Front Immunol* **2020**, *11*, 1451.
29. Di Pierro, F.; Derosa, G.; Maffioli, P.; Bertuccioli, A.; Togni, S.; Riva, A.; Allegrini, P.; Khan, A.; Khan, S.; Khan, B.A. Possible Therapeutic Effects of Adjuvant Quercetin Supplementation Against Early-Stage COVID-19 Infection: A Prospective, Randomized, Controlled, and Open-Label Study. *Int J Gen Med* **2021**, *14*, 2359.
30. Boots, A.W.; Haenen, G.R.; Bast, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* **2008**, *585*, 325–337.
31. De Bruyn, F.; Van Brempt, M.; Maertens, J.; Van Bellegem, W.; Duchi, D.; De Mey, M. Metabolic

- engineering of *Escherichia coli* into a versatile glycosylation platform: production of bio-active quercetin glycosides. *Microb Cell Fact* **2015**, 14, 1–12.
32. Marín, L.; Gutiérrez-del-Río, I.; Entrialgo-Cadierno, R.; Villar, C.J.; Lombó, F. De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* **2018**, 13, e0207278.
33. Rodriguez, A.; Strucko, T.; Stahlhut, S.G.; Kristensen, M.; Svenssen, D.K.; Forster, J.; Nielsen, J.; Borodina, I. Metabolic engineering of yeast for fermentative production of flavonoids. *Bioresour Technol* **2017**, 245, 1645–1654.
34. Xia, T.; Eiteman, M.A. Quercetin glucoside production by engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* **2017**, 182, 1358–1370.
35. Cisneros-Torres, D.; Cruz-Sosa, F.; González-Cortazar, M.; Martínez-Trujillo, A.; Nicasio-Torres, P. Enhancing the production of scopoletin and quercetin 3-O- $\beta$ -d-glucoside from cell suspension cultures of *Tilia americana* var. *mexicana* by modulating the copper and nitrate concentrations. *PCTOC* **2019**, 139, 305–316.
36. Bong, F.J.; Chear, N.J.Y.; Ramanathan, S.; Mohana-Kumaran, N.; Subramaniam, S.; Chew, B.L. The development of callus and cell suspension cultures of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*) for the production of flavonoids and phenolics. *Biocatalysis Agricultural Biotechnology* **2021**, 33, 101977.
37. Arya, D.; Patni, V.; Kant, U. In vitro propagation and quercetin quantification in callus cultures of

Rasna (*Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern.). *Indian J Biotechnol* **2008**, 7, 383-387.

38. Tan, S.; Radzali, M.; Arbakariya, A.; Mahmood, M. Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *Am J Biochem Biotechnol* **2010**, 6, 284-299.

39. Yang, X.; Lei, Z.; Yu, Y.; Xiao, L.; Cheng, D.; Zhang, Z. Phytochemical characteristics of callus suspension culture of *Helicteres angustifolia* L. and its in vitro antioxidant, antidiabetic and immunomodulatory activities. *S Afr J Bot* **2019**, 121, 178-185.

40. El-Ashry, A.A.E.-L.; Gabr, A.M.M.; Arafa, N.M.; El-Bahr, M.K. Rutin accumulation in gardenia calli cultures as a response to phenyl alanine and salicylic acid. *Bull Natl Res Cent* **2019**, 43, 1-14.

41. Thiruvengadam, M.; Rekha, K.; Rajakumar, G.; Lee, T.-J.; Kim, S.-H.; Chung, I.-M. Enhanced production of anthraquinones and phenolic compounds and biological activities in the cell suspension cultures of *Polygonum multiflorum*. *Int J Mol Sci* **2016**, 17, 1912.

42. Sajjalaguddam, R.R.; Paladugu, A. Phenylalanine enhances Quercetin content in In vitro cultures of *Abutilon indicum* L. *J App Pharm Sci* **2015**, 5, 080-084.

43. Iqbal, M.S.; Iqbal, Z.; Ansari, M.I. Enhancement of total antioxidants and flavonoid (quercetin) by methyl jasmonate elicitation in tissue cultures of onion (*Allium cepa* L.). *Acta Agrobot* **2019**, 72.

44. Karuppaiya, P.; Tsay, H.S. Enhanced production of

podophyllotoxin, kaempferol, and quercetin from callus culture of *Dyosma pleiantha* (Hance) Woodson: An endangered medicinal plant. *Biotechnol Appl Biochem* **2020**, 67, 95-104.

45. Meena, M.C.; Meena, R.K.; Patni, V. Effect of elicitor on quercetin production in cell cultures of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Pharma Innov* **2014**, 3, 18.

46. Madanakumar, A.J.; Murukan, G.; Lawrence, B.; Kumaraswamy, M. Isolation, Purification of Quercetin from in vitro Cell Suspension Culture of *Caesalpinia pulcherrima* and its Analysis by HPLC-DAD and NMR. *Pharmacogn J* **2017**, 9.

47. Goda, S.; Ahmed, S.; El Sherif, F.; Hassanean, H.; Ibrahim, A. Genetically stable plants with boosted flavonoids content after in vitro regeneration of the endangered *Capparis spinosa* L. *Global Drugs and Therapeutics* **2017**, 2, 1-7.

48. Comisso, M.; Negri, S.; Bianconi, M.; Gambini, S.; Avesani, S.; Ceoldo, S.; Avesani, L.; Guzzo, F. Untargeted and targeted metabolomics and tryptophan decarboxylase in vivo characterization provide novel insight on the development of kiwifruits (*Actinidia deliciosa*). *Int J Mol Sci* **2019**, 20, 897.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

## RIVENDICAZIONI

1) Procedimento per la preparazione di una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* che produce glicosidi della quercetina, detto processo comprendendo o essendo consistente nelle seguenti fasi:

a) coltivare un espianto tissutale di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* su un mezzo solido al fine di indurre la formazione di un callo, detto mezzo solido comprendendo una o più auxine e una o più citochinine, in cui la concentrazione di ciascuna auxina di dette una o più auxine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.5 a 1.5 mg/l, più preferibilmente 1 mg/l e la concentrazione di ciascuna citochinina di dette una o più citochinine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.25 a 0.75 mg/l, più preferibilmente 0.5 mg/l; e

b) selezionare una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis*.

2) Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto procedimento comprende ulteriormente a') sterilizzare l'espianto tissutale prima della fase a).

3) Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui la fase b) è effettuata ripetendo le seguenti fasi:

b') selezionare un callo ottenuto nella fase a), o una sua porzione, che abbia caratteristiche morfologiche omogenee, quali colore verde brillante e struttura friabile, e

b'') trasferire detto callo o una sua porzione su

un mezzo solido fresco, detto mezzo solido comprendendo una o più auxine e una o più citochinine, in cui la concentrazione di ciascuna auxina di dette una o più auxine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.5 a 1.5 mg/l, più preferibilmente 1 mg/l, e la concentrazione di ciascuna citochinina di dette una o più citochinine varia da 0.01 a 5 mg/l, preferibilmente da 0.25 a 0.75 mg/l, più preferibilmente 0.5 mg/l,

dette fasi b') e b'') essendo ripetute fino all'ottenimento di una linea cellulare indifferenziata con caratteristiche morfologiche omogenee e ciclo vitale stabile.

4) Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui dette una o più auxine sono selezionate dal gruppo che consiste in acido 2,4-diclorofenossiacetico, acido  $\alpha$ -naftalenacetico, acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico, acido indol-3-butirrico, acido 3-indolacetico, preferibilmente acido 2,4-diclorofenossiacetico e acido indol-3-butirrico.

5) Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui le citochinine sono scelte dal gruppo che consiste in 6-benzilaminopurina (6-BAP), trans-zeatina, kinetina, isopenteniladenina, tidiazuron, preferibilmente 6-benzilaminopurina (6-BAP).

6) Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui il mezzo solido comprende acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), acido indol-3-butirrico (IBA) e 6-benzilaminopurina (6-BAP).

7) Procedimento secondo una qualsiasi delle

rivendicazioni 1-6, in cui l'espianto tissutale è l'espianto di un tessuto scelto dal gruppo consistente in gemma apicale, giovane internodo, giovane nodo con meristema laterale e giovani foglie, preferibilmente giovane nodo.

8) Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui *Actinidia deliciosa* è *Actinidia deliciosa* cv. Hayward e *Actinidia chinensis* è *Actinidia chinensis* cv. Hort16A.

9) Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui i glicosidi della quercetina sono scelti dal gruppo consistente in quercetina-O-esoside, diidroquercetina-O-esoside (taxifolina esoside), quercetina-O-diesoside, quercetina-O-esoside desossiesoside O-esoside, quercetina-O-esoside-O-desossiesoside, metilquercetina-O-diesoside (isohramnetina-O-diesoside), quercetina-O-esoside-O-esoside-desossiesoside, quercetina-O-diesoside, quercetina-O-esoside desossiesoside, quercetina-3-O-rutinoside, quercetina-3-O-esoside, quercetina-3-O-glucoside, quercetina-O-didesossiesoside, metilquercetina-O-esoside desossiesoside, quercetina-O-desossiesoside, quercetina-O-glucuronide, quercetina-O-esoside, preferibilmente quercetina-3-O-glucoside e quercetina-3-O rutinoside.

10) Linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* che produce glicosidi della quercetina, detta linea cellulare indifferenziata essendo ottenibile mediante il procedimento come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9.

11) Linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* secondo la rivendicazione 10, detta linea cellulare essendo caratterizzata dal fatto che il suo metaboloma comprende:

a) i seguenti glicosidi della quercetina:

quercetina-0-esoside, diidroquercetina-0-esoside (taxifolina esoside), quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside 0-esoside, quercetina-0-esoside-0-desossiesoside, metilquercetina-0-diesoside (isohramnetina-0-diesoside), quercetina-0-esoside-0-esoside-desossiesoside, quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-3-0-rutinoside, quercetina-3-0-esoside, quercetina-3-0-glucoside, quercetina-0-didesossiesoside, metilquercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-0-desossiesoside, quercetina-0-glucuronide, quercetina-0-esoside, e

b) i seguenti composti:

acido cumarico-acido aspartico, procianidina tipo P2, epicatechina, kanferolo-0-esoside, triidrossiflavanone-0-esoside (naringenina), diidrokanferolo-0-esoside.

12) Linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10-11, detta linea cellulare indifferenziata essendo caratterizzata dal fatto che il suo metaboloma comprende

da 50 a 250 mg/100g peso secco di quercetina-3-0-rutinoside;

da 10 a 250 mg/100g peso secco di quercetin-3-0-

glucoside;

da 10 a 200 mg/100g peso secco di altri glicosidi della quercetina;

da 70 a 700 mg/100g peso secco di glicosidi della quercetina totali.

13) Uso di una linea cellulare indifferenziata come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni 10-12, per la produzione di glicosidi della quercetina e/o di composti non glicosilati ottenuti da detti glicosidi della quercetina.

14) Uso secondo la rivendicazione 13, in cui i glicosidi della quercetina sono scelti dal gruppo consistente in

quercetina-0-esoside, diidroquercetina-0-esoside (taxifolina esoside), quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside 0-esoside, quercetina-0-esoside-0-desossiesoside, metilquercetina-0-diesoside (isohramnetina-0-diesoside), quercetina-0-esoside-0-esoside-desossiesoside, quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-3-0-rutinoside, quercetina-3-0-esoside, quercetina-3-0-glucoside, quercetina-0-didesossiesoside, metilquercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-0-desossiesoside, quercetina-0-glucuronide, quercetina-0-esoside, preferibilmente quercetina-3-0-glucoside e quercetina-3-0 rutinoside.

15) Procedimento per la produzione di glicosidi della quercetina e/o di composti non glicosilati ottenuti da detti glicosidi della quercetina, come ad

esempio la quercetina, detto processo comprendendo o essendo consistente in:

A) coltivare una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 10-12 o

A') preparare una linea cellulare indifferenziata di *Actinidia deliciosa* o *Actinidia chinensis* mediante il processo come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9 e coltivare la linea cellulare indifferenziata ottenuta; e

B) estrarre i glicosidi della quercetina.

16) Procedimento secondo la rivendicazione 15, detto procedimento comprendendo ulteriormente C) ottenere un composto non glicosilato, come la quercetina, tramite idrolisi di detti glicosidi della quercetina.

17) Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15-16, in cui i glicosidi della quercetina sono scelti dal gruppo consistente in

quercetina-0-esoside, diidroquercetina-0-esoside (taxifolina esoside), quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside 0-esoside, quercetina-0-esoside-0-desossiesoside, metilquercetina-0-diesoside (isohramnetina-0-diesoside), quercetina-0-esoside-0-esoside-desossiesoside, quercetina-0-diesoside, quercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-3-0-rutinoside, quercetina-3-0-esoside, quercetina-3-0-glucoside, quercetina-0-didesossiesoside, metilquercetina-0-esoside desossiesoside, quercetina-0-desossiesoside,

quercetina-0-glucuronide, quercetina-0-esoside,  
preferibilmente quercetina-3-0-glucoside e quercetina-  
3-0 rutinoside.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

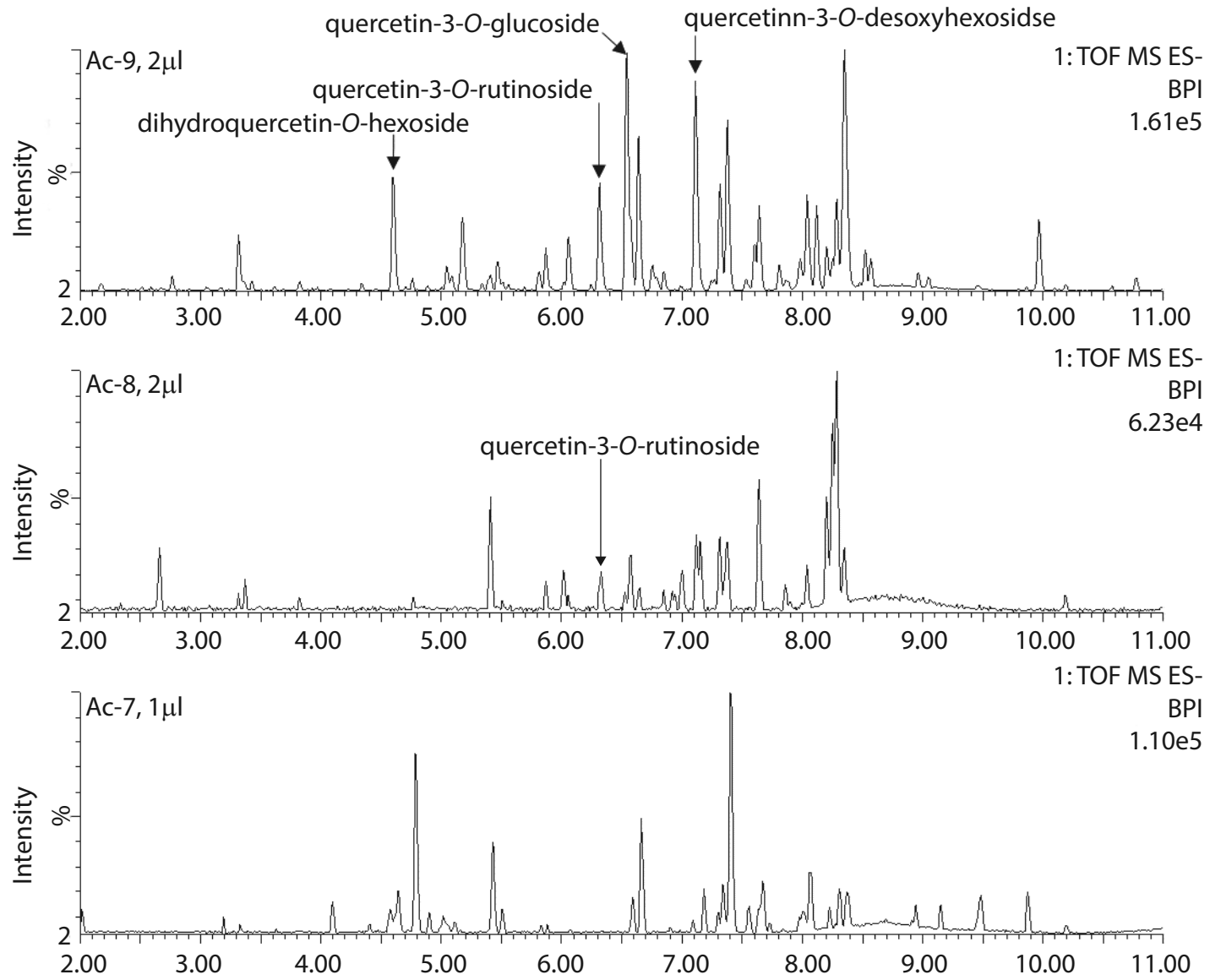


Fig. 2

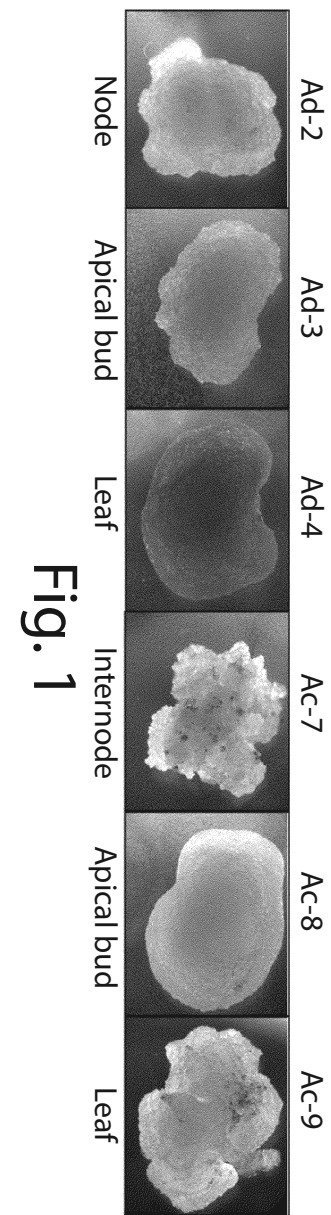


Fig. 1

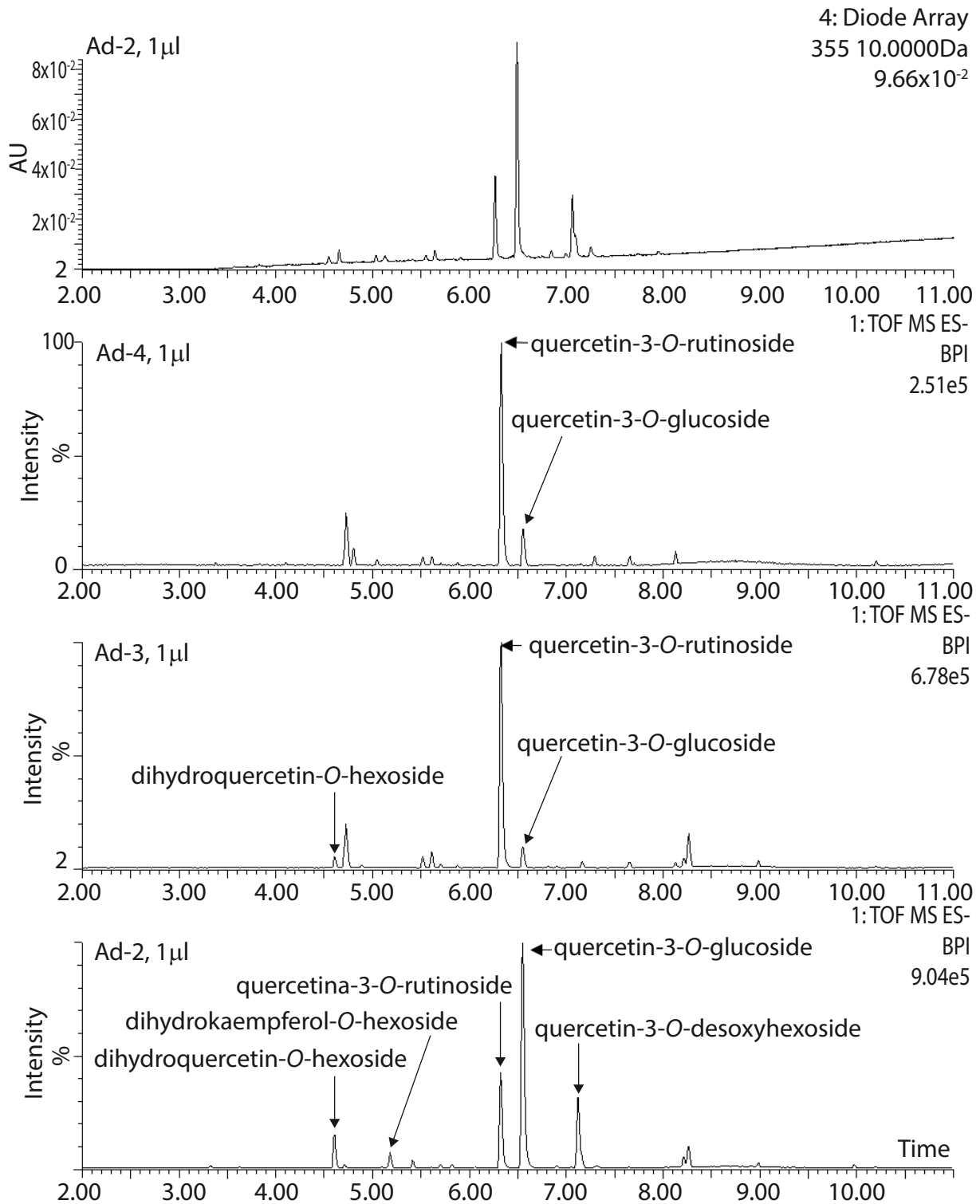


Fig. 3

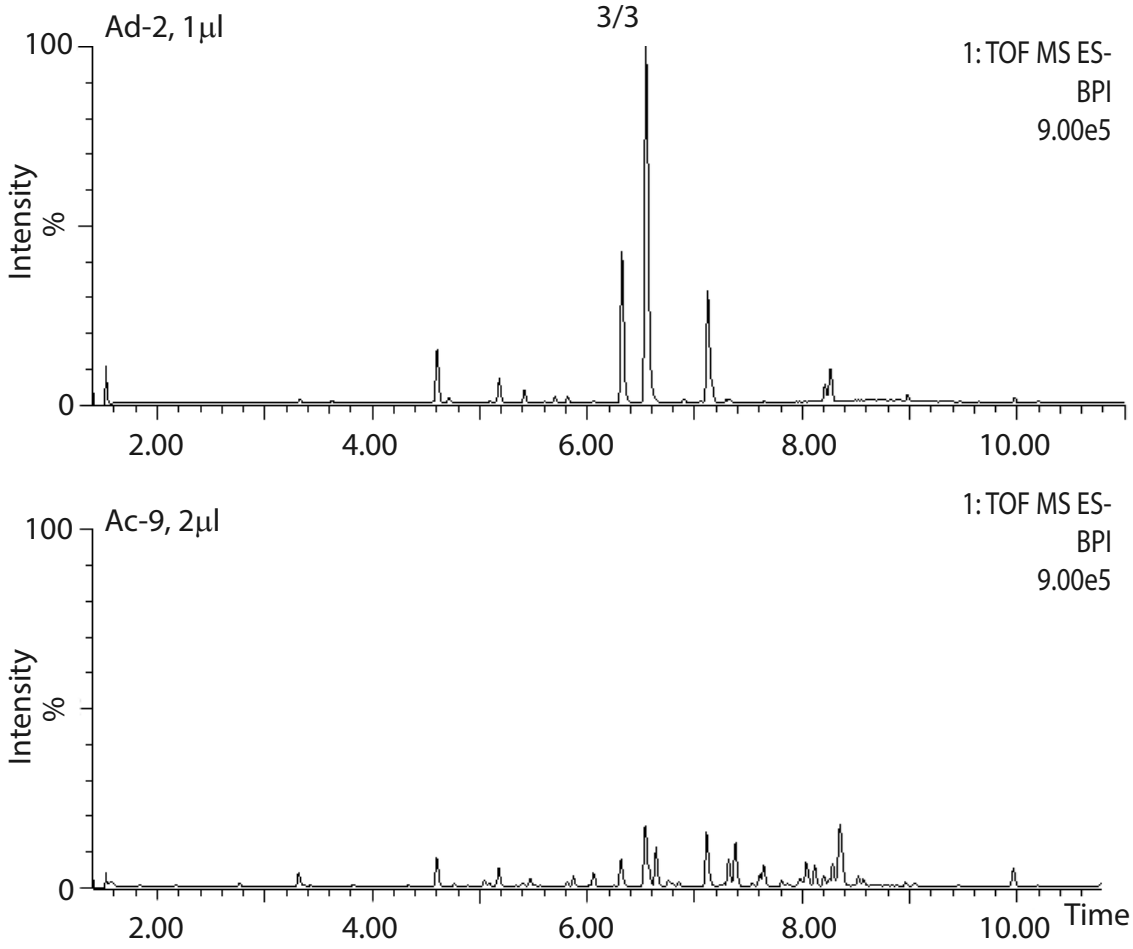


Fig. 4

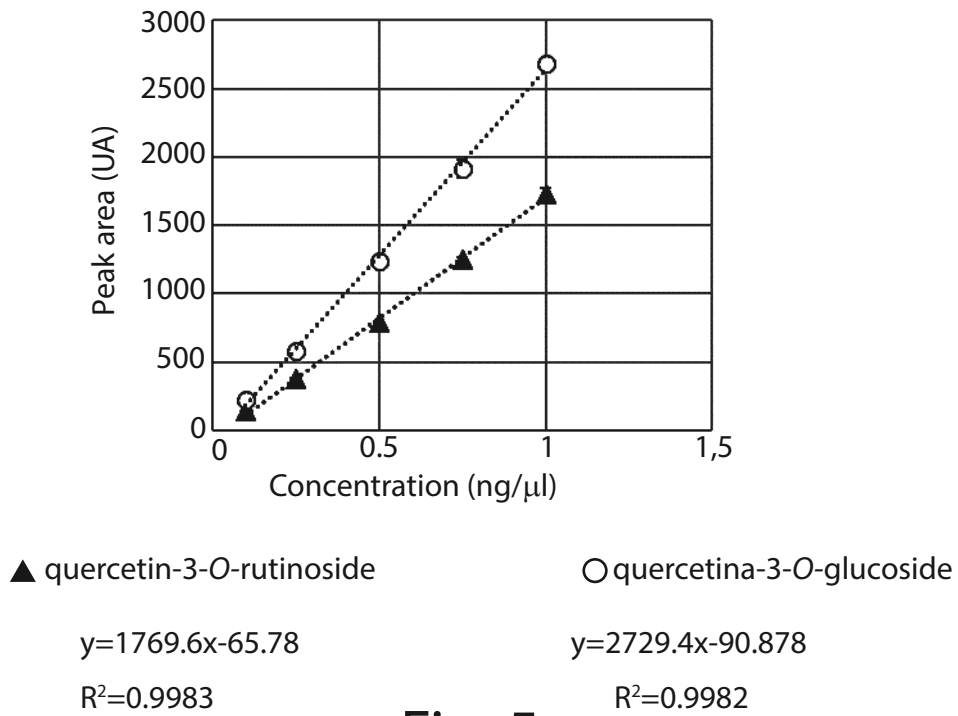


Fig. 5