

Programma di Sviluppo Rurale Regione Calabria 2014 - 2020

Misura 19 - Sostegno Allo Sviluppo Locale Leader

Piano Azione Locale Area Grecanica 2014 - 2020 - Misura 16 - Cooperazione - Operazione 16.2.1.2

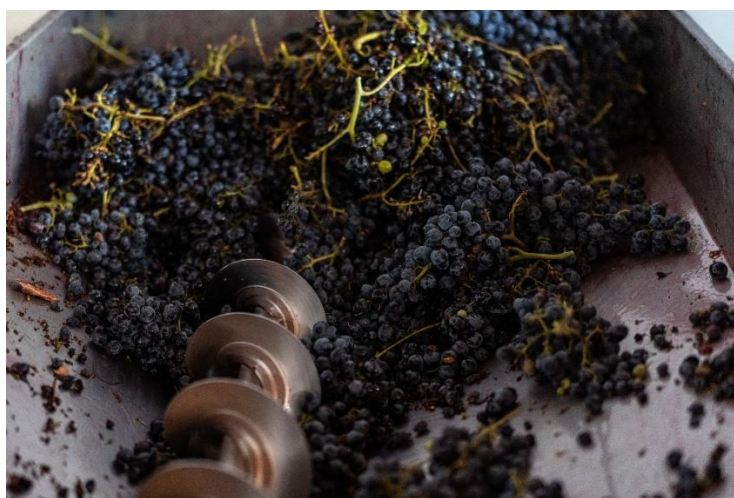
GRECANICA
AGENZIA DI SVILUPPO LOCALE


PAL 2014
2022
Piano di Azione Locale
AREA GRECANICA

Progetto Pilota "La Vigna del Padre"

AZIONE B - ECONOMIA CIRCOLARE NELLA FILIERA VITIVINICOLA DELL'IGT PALIZZI
VALORIZZAZIONE DELLE VINACCE

<https://lavignadelpadre.it/>



RAPPORTO DI RICERCA

Giugno 2025

PARTNER DEL PROGETTO

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
2. MATERIALI E METODI	7
2.1 PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO	7
2.1.1 Raccolta delle vinacce	7
2.1.2 Essiccazione	7
2.1.3 Estrazione della vinaccia per infusione	7
2.1.4 Estrazione della vinaccia assistita da ultrasuoni (UAE).....	7
2.1.5 Risospensione dell'estratto.....	8
2.2 CONTENUTO FENOLICO TOTALE (TPC)	8
2.3 VALUTAZIONE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI	8
2.4 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO TOTALE DI ANTOCIANI	9
2.5 ATTIVITÀ DI SCAVENGER DELL'OSSIDO NITRICO	9
2.6 PROFILAZIONE FITOCHIMICA TRAMITE ANALISI UHPLC	9
2.7 COLTURE CELLULARI E CONDIZIONI DI CRESCITA	9
2.8 TEST DI VITALITÀ E CITOTOSSICITÀ CELLULARE	10
2.9 VALUTAZIONE DEI LIVELLI INTRACELLULARI DI ROS	10
2.10 HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST (H-CLAT)	10
2.11 ESTRAZIONE DELL'RNA	11
2.12 MIRNA PCR	11
2.13 ANALISI BIOINFORMATICA	11
2.14 ELISA IL-6 E VEGF-A	11
2.15 MEZZO CONDIZIONATO	11
2.16 TUBE FORMATION	12

2.17 FORMULAZIONE E PREPARAZIONE DELLA CREMA	12
2.17.1 Formulazione	12
2.17.2 Preparazione.....	13
2.18 ANALISI STATISTICA	13
3. RISULTATI.....	14
3.1 CONTENUTO TOTALE IN POLIFENOLI	14
3.2 DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE	14
3.3 ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA	15
3.4 PROFILO FITOCHIMICO DEGLI ESTRATTI DI VINO ROSATO E ROSSO	16
3.5 VALUTAZIONE DELLA BIOCAMPATIBILITÀ E CITOTOSSICITÀ.....	18
3.6 EFFETTI SULLA PRODUZIONE DI ROS	19
3.7 POTENZIALE SENSIBILIZZANTE E APPLICAZIONI COSMETICHE	20
3.8 TRANSIZIONE AI MODELLI UMANI PER IL POTENZIALE ANTI-INFIAMMAZIONE CUTANEA 	20
3.9 EFFETTO PROLIFERATIVO DEGLI ESTRATTI SU BJ E HACAT	20
3.10 CARATTERIZZAZIONE DELLE PROPRIETÀ ANTINFIAMMATORIE E ANTIANGIOGENICHE DELL'ESTRATTO DEL ROSATO.....	22
3.11 IL TRATTAMENTO CON ROSATO AUMENTA IL MIR-30C-5P.....	23
3.12 ANALISI DI GENE ONTOLOGY (GO) DEL MIR-30C-5P	24
3.13 ANALISI DELL'ARRICCHIMENTO FUNZIONALE DEI PERCORSI KEGG	25
3.14 ARRICCHIMENTO DEI PERCORSI DI MIR-30C-5P E RETI DI INTERAZIONE PROTEINA-PROTEINA (PPI) SU REACTOME	26
3.15 EFFETTI DEL ROSATO SULL'IL-6.....	27
3.16 IL POTENZIALE DEL ROSATO COME INIBITORE DELL'ANGIOGENESI	28

3.17 FORMULAZIONE CUTANEA	29
3.18 ANALISI DELLA CITOTOSSICITÀ	30
3.19 ANALISI DEL POTENZIALE PRO-SENSIBILIZZANTE.....	31
3.20 LIMITI E SFIDE NELL'USO DELLA VINACCIA	31
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	33
5. REFERENZE	36

1. Introduzione

"L'agricoltura è un settore complesso che svolge un ruolo cruciale e primario nel processo di transizione verso un'economia circolare e a sostegno dei principi di eco-sostenibilità. Questa attività, strettamente legata all'uso delle risorse naturali e alla gestione del territorio, consente la produzione di beni e servizi destinati anche a settori diversi da quello agricolo, promuovendo il recupero degli scarti di lavorazione e delle parti inutilizzate delle piante, che vengono trasformati in nuove risorse da reinserire in un nuovo processo produttivo. Ciò genera una fonte di reddito aggiuntiva per le imprese, senza perdere di vista la tutela ambientale. Il settore agricolo è quindi sempre più proiettato verso un futuro sostenibile, ma per raggiungere questo obiettivo è necessario puntare sull'innovazione tecnologica. Tra i settori industriali che meglio si prestano all'impiego e all'assorbimento di queste nuove materie prime recuperate vi sono la cosmetica e l'integrazione nutraceutica. Infatti, i residui agricoli contengono numerosi composti bioattivi che possono essere efficacemente utilizzati per la realizzazione di prodotti per la cura della persona, la salute e il benessere." Il progetto ha avuto come obiettivo la valorizzazione e l'utilizzo degli estratti polifenolici ottenuti dalle vinacce come fonte di composti funzionali da utilizzare in ambito nutraceutico. In particolare, si è proposto di migliorare l'estrazione e il recupero delle sostanze bioattive dalla vinaccia, di caratterizzare gli estratti ottenuti verificandone l'efficacia in termini di proprietà biofunzionali (ad esempio antiossidanti, antinfiammatorie) attraverso test specifici e, infine, di utilizzarli per lo sviluppo di nuove formulazioni cosmetiche.

Questo progetto rientra nel piano di sviluppo delle cantine IGT Palizzi dell' "Area Grecanica" della costituenda Rete di Imprese, di cui fa parte la "Cooperativa Agricola Terre Grecaniche".

In un'ottica di economia circolare e solidale, questo progetto ha previsto l'utilizzo degli attuali scarti di lavorazione dell'uva (vinacce) per la produzione di nuovi prodotti da promuovere sul mercato, anche in abbinamento all'offerta enologica. Le vinacce rappresentano circa il 30% della produzione di uva e attualmente non sono valorizzate e

vengono smaltite come scarti di lavorazione secondo la normativa vigente. I risultati delle attività potrebbero contribuire, attraverso l'ideazione di nuovi prodotti, ad aumentare il fatturato delle cantine IGT Palizzi senza costi aggiuntivi per la parte agricola della filiera e, allo stesso tempo, completare la filiera vitivinicola con un altro innovativo e importante segmento produttivo legato alla trasformazione delle vinacce in nuovi prodotti, la maggior parte dei quali potrebbero anche essere biologici. La scoperta delle particolari qualità salutari dei vitigni IGT Palizzi potrebbe ulteriormente valorizzare e caratterizzare i vini prodotti dalle cantine locali.

Il Progetto è finalizzato all'acquisizione, alla combinazione, alla strutturazione e all'utilizzo delle conoscenze e delle competenze scientifiche, tecnologiche, commerciali e di altro tipo esistenti nel micro-filone del vino IGT Palizzi al fine di sviluppare prodotti, processi o servizi nuovi o migliorati. Ciò include anche altre attività volte alla definizione concettuale, alla pianificazione e alla documentazione di nuovi prodotti, processi o servizi. L'obiettivo del Progetto è quello di utilizzare i risultati della ricerca disponibili e realizzarne il trasferimento concreto all'interno della micro filiera vitivinicola dell'IGT Palizzi, attraverso la progettazione, il coordinamento delle attività di implementazione, la sperimentazione e la valutazione dei risultati ottenuti.

Il progetto sarà fondamentale per trasferire i risultati della ricerca alle imprese locali, facilitando la progettazione, la sperimentazione e la valutazione dei risultati.

Il progetto è inoltre in sinergia con le linee di sviluppo locale dell'Area Greca, contribuendo a stimolare l'attività economica e innovativa nel micro settore vitivinicolo.

2. Materiali E Metodi

2.1 Preparazione dell'estratto

2.1.1 Raccolta delle vinacce

Le vinacce del vitigno Nerello (*Vitis vinifera* L.) ottenute dalla lavorazione del vino Rosato e Rosso dell'azienda "Terre Grecaniche" (Palizzi, RC, Italia), sono state raccolte rispettivamente nei mesi di agosto e settembre 2022. Per la produzione del vino Rosato, le uve rosse vengono raccolte in anticipo, in questo modo si ottiene un maggiore equilibrio tra la componente acida dell'uva e il suo contenuto di zuccheri. Le uve vengono lavorate allo stesso modo dei vini rossi: dopo la pressatura le bucce rimangono a macerare nel mosto. Il contatto tra le bucce e il mosto avviene per un periodo molto breve, di poche ore. Nel caso dei rossi, invece, il contatto tra le bucce e il mosto può durare fino a 15 giorni. Le vinacce, in entrambi i casi, sono state raccolte subito dopo la pressatura. Dopo la raccolta, le vinacce sono state confezionate sottovuoto e conservate a -20° C fino al momento dell'utilizzo.

2.1.2 Essiccazione

Le vinacce del Rosato e del Rosso, conservate a -20° sottovuoto, sono state essiccate in un disidratatore Sedona® Classic con vassoi in plastica BPA-Free Modello: SD-P9000-B. Nello specifico, 150 g di prodotto fresco sono stati inseriti nel disidratatore ed essiccati a 40° per 4 giorni, ottenendo circa 70 g di prodotto secco, con una resa del 46,67%. Il prodotto è stato poi immediatamente utilizzato per la fase di estrazione.

2.1.3 Estrazione della vinaccia per infusione

È stata effettuata un'estrazione per infusione a caldo ponendo 40 g di prodotto secco in sacchetti per infusione e ponendoli in 350 ml di acqua distillata a 40° C per due ore a 600 rpm. Gli estratti sono stati poi liofilizzati, utilizzando un Freeze Dryer Micro Modulyo (Edwards Ltd., Surrey, UK), con una resa del 25% e se non utilizzati immediatamente, sono stati conservati a -80° .

2.1.4 Estrazione della vinaccia assistita da ultrasuoni (UAE)

È stata effettuata un'estrazione assistita da ultrasuoni utilizzando 100 g di prodotto secco in 750 mL di acqua distillata.

Secondo quanto emerso da un'attenta ricerca bibliografica, le condizioni ottimali per massimizzare il potere estrattivo sono risultate le seguenti: frequenza di 40 kHz per 25 minuti, con una potenza specifica di 150 W/L. Applicando tali parametri al volume utilizzato, la potenza effettiva impiegata

è stata di 112,5 W. Gli estratti sono stati poi liofilizzati, utilizzando un Freeze Dryer Micro Modulyo (Edwards Ltd., Surrey, UK), e se non utilizzati immediatamente, sono stati conservati a -80°.

2.1.5 Risospensione dell'estratto

La polvere ottenuta è stata risospesa in acqua (Ultrapure DNase/RNase free Distilled Water, Invitrogen) a una concentrazione di 500 mg/mL. Per favorire la risospensione, è stata sottoposta ad agitazione per 1 ora; dopo aver controllato che tutta la polvere fosse in soluzione, è stata centrifugata a 14000 rpm e il surnatante è stato raccolto e filtrato in condizioni sterili utilizzando un filtro a membrana da 0,45 µm.

2.2 Contenuto Fenolico Totale (TPC)

Il contenuto totale in polifenoli è stato valutato mediante il saggio di Folin-Ciocalteu basato su una complessa reazione di ossidoriduzione in presenza degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico contenuti nel reattivo di Folin-Ciocalteu. Nello specifico, lo sviluppo di colore è dovuto al trasferimento di elettroni dal fenolo al complesso molibdato/tungstato che diventa cromogeno quando i metalli passano ad un più basso stato di ossidazione. La determinazione viene effettuata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 760 nm.

2.3 Valutazione Proprietà Antiossidanti

Le proprietà antiossidanti degli estratti sono state determinate in termini di attività scavenger sui radicali DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile), ABTS•+ (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)) e saggio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Nello specifico il radicale DPPH è un radicale stabile di natura organica con una banda massima di assorbimento intorno a 515-528 nm che viene ridotto dall'antiossidante ad un composto dalla colorazione gialla, la difenilpicrilidrazina; l'ABTS•+ è, invece, un radicale di natura idrofila con un massimo di assorbimento intorno a 734 nm. In entrambi i casi, la reazione dipende dalla capacità di donare atomi di idrogeno da parte dell'antiossidante e la capacità di agire da scavenger viene espressa come percentuale di inibizione dei due radicali. Il saggio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), che misura la capacità degli antiossidanti di ridurre il complesso ferrico TPTZ-Fe³⁺ a TPTZ-Fe²⁺, con assorbanza massima a 595 nm.

2.4 Determinazione del contenuto totale di antociani

Il contenuto totale di antociani è stato determinato mediante metodo spettrofotometrico differenziale a pH. Il metodo si basa sulla variazione dell'assorbanza degli antociani a due diversi pH: pH 1,0 (in tampone cloridrico di potassio 0,025 M) e pH 4,5 (in tampone acetato di sodio 0,025 M), con lettura a 510 nm. La differenza di assorbanza tra le due condizioni riflette il contenuto di antociani monomerici, calcolato utilizzando i parametri di cianidina-3-glucoside ($\epsilon = 26900$; $PM = 449,2$). I risultati sono espressi in mg equivalenti di cianidina-3-glucoside per litro di estratto.

2.5 Attività di Scavenger dell'ossido nitrico

L'attività scavenger nei confronti del radicale ossido nitrico ($\text{NO}\bullet$) è stata valutata impiegando diverse concentrazioni degli estratti (1,25–12,5 mg) preparate in acqua distillata e incubate con una soluzione 2 mM di nitroprussiato di sodio in PBS pH 7,4. Dopo esposizione a luce UV (25 W) per 3 ore a 25 °C, l'accumulo di nitriti è stato determinato mediante reazione con il reagente di Griess, con lettura dell'assorbanza a 546 nm. L'attività antiossidante è stata espressa come percentuale di inibizione della formazione di ossido nitrico rispetto al controllo.

2.6 Profilazione fitochimica tramite analisi UHPLC

L'analisi è stata eseguita in collaborazione con il Prof. M. Stornaiuolo presso il Laboratorio di Biologia Molecolare del Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Il profilo fitochimico degli estratti Rosato e Rosso è stato analizzato mediante RP-UHPLC-PDA e RP-UHPLC-HRMS, dopo solubilizzazione in etanolo/acqua (70:30 v/v) e filtrazione. Le analisi hanno permesso l'identificazione dei metaboliti tramite massa esatta, spettrometria MS/MS e confronto con database. La quantificazione è stata effettuata utilizzando salidroside come standard esterno, con curva di calibrazione lineare tra 1–100 $\mu\text{g/mL}$. I risultati sono stati ottenuti da due repliche per ciascun campione.

2.7 Colture Cellulari e Condizioni di Crescita

Le linee cellulari utilizzate per i test in vitro comprendevano fibroblasti umani (BJ), fibroblasti murini (BALB/c 3T3), cheratinociti umani (HaCaT), monociti umani (THP-1) e cellule endoteliali umane (EA.hy926), tutte fornite da ATCC (Manassas, VA, USA). Le cellule sono state coltivate in

terreni specifici arricchiti con siero e antibiotici, secondo le esigenze della linea. Le colture sono state mantenute a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% di CO₂.

2.8 Test di vitalità e citotossicità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante tre saggi colorimetrici: MTT, Neutral Red Uptake (NRU) e Sulforodamina B (SRB), applicati su fibroblasti umani (BJ), cheratinociti umani (HaCaT) e fibroblasti murini (BALBc/3T3). Il test MTT si basa sulla riduzione del sale tetrazolico MTT a formazano da parte delle cellule metabolicamente attive. Il saggio NRU valuta l'integrità della membrana lisosomiale, misurando l'assorbimento del colorante rosso neutro. Il saggio SRB, infine, determina il contenuto proteico cellulare come indicatore della proliferazione. I test sono stati eseguiti dopo trattamento con gli estratti o con la crema a base di Rosato, e la risposta è stata quantificata tramite lettura spettrofotometrica.

2.9 Valutazione dei livelli intracellulari di ROS

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari è stata misurata mediante il Muse™ Oxidative Stress Kit (EMD Millipore). I fibroblasti murini BALBc/3T3 sono stati trattati con H₂O₂ o con gli estratti Rosato e Rosso (2,5 mg/mL), e successivamente incubati con il reagente fluorescente specifico. L'accumulo intracellulare di ROS è stato quantificato tramite citofluorimetria a flusso utilizzando il Muse™ Cell Analyzer.

2.10 Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

Il test h-CLAT è un metodo in vitro standardizzato (OECD TG 442E) utilizzato per valutare il potenziale sensibilizzante cutaneo dei composti, tramite l'analisi dell'attivazione immunitaria in cellule THP-1. La risposta viene misurata attraverso l'espressione delle molecole co-stimolatorie CD54 e CD86, rilevate mediante citofluorimetria a flusso. Le cellule sono trattate con diverse concentrazioni dei campioni e, dopo incubazione, etichettate con anticorpi fluorescenti specifici. L'attività sensibilizzante è determinata calcolando le concentrazioni efficaci (EC150 per CD86 e EC200 per CD54) come indicatore della risposta immunitaria. L'analisi è stata condotta in triplicato su tre giorni indipendenti.

2.11 Estrazione dell'RNA

L'RNA totale, inclusi i microRNA, è stato estratto utilizzando il kit MagMAX mirVana Total RNA (Thermo Fisher Scientific) su piattaforma automatizzata KingFisher Duo Prime. I fibroblasti BJ e i cheratinociti HaCaT sono stati trattati in diverse condizioni sperimentali, comprendenti stimoli infiammatori (LPS) ed estratto Rosato, in trattamento singolo o combinato. Dopo il trattamento, le cellule sono state lisate e sottoposte a procedura di estrazione secondo il protocollo del produttore. La quantificazione e la purezza dell'RNA (inclusi i miRNA) sono state valutate tramite spettrofotometria con NanoDrop One.

2.12 miRNA PCR

La sintesi del cDNA è stata eseguita a partire dall'RNA estratto utilizzando il TaqMan Advanced miRNA cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific), seguendo il protocollo del produttore. Dopo le fasi di legatura dell'adattatore, trascrizione inversa e amplificazione (miR-Amp), il cDNA è stato utilizzato per la real-time PCR con sonda TaqMan specifica per hsa-miR-30c-5p. L'espressione relativa del miRNA è stata calcolata tramite il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando miR-16 come controllo endogeno.

2.13 Analisi bioinformatica

L'analisi bioinformatica è stata condotta in collaborazione con il Prof. E. Cione (Università della Calabria). I target genici di hsa-miR-30c-5p sono stati identificati tramite il pacchetto multiMiR di Bioconductor. Le analisi di arricchimento GO e KEGG sono state eseguite con ClusterProfiler in R, mentre le interazioni proteina-proteina sono state esplorate tramite STRING.

2.14 ELISA IL-6 e VEGF-A

I cheratinociti HaCaT sono stati trattati in condizioni basali, con LPS, con estratto Rosato o in modalità di pre-trattamento combinato, per valutare la modulazione dell'infiammazione. Dopo 48 ore totali, i supernatanti sono stati raccolti, centrifugati e utilizzati per la quantificazione delle citochine IL-6 e VEGF-A tramite saggio ELISA (Abcam), secondo le istruzioni del produttore.

2.15 Mezzo Condizionato

Le cellule HaCaT sono state trattate in condizioni basali, con LPS, con estratto Rosato, o in modalità di pre-trattamento combinato, utilizzando un mezzo contenente il 2,5% di FBS. Dopo 48 ore, i

supernatanti sono stati raccolti, centrifugati e utilizzati come mezzo condizionato per il trattamento delle cellule EA.hy926.

2.16 Tube formation

Il saggio 'tube formation' è stato eseguito su cellule EA.hy926 seminate su Matrigel® in piastre da 96 pozzetti, utilizzando medium condizionato derivato da cellule HaCaT trattate. La formazione di strutture tubulari è stata monitorata a partire da 4 ore dopo la semina e documentata tramite microscopia a contrasto di fase.

2.17 Formulazione e Preparazione della Crema

La formulazione e preparazione della crema è stata realizzata in collaborazione con lo spin-off universitario Macrofarm dell'Università della Calabria, utilizzando metodologie innovative e competenze avanzate.

2.17.1 Formulazione

INCI: Aqua, Caprylic/Capric Triglyceride, Glycerin, Butylene Glycol, Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer, Squalane, Vitis Vinifera Fruit Extract, Dimethicone, Vitis Vinifera Seed Oil, Tocopherol, Hydrogenated Ethylhexyl Olivat, Hydrogenated Olive Oil Unsaponifiables, Oryza Sativa Bran Oil, Cetyl Alcohol, Xanthan Gum, Sodium Hyaluronate, Tocopheryl Acetate, Phenoxyethanol, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, Polysorbate 60, Arginine, Inositol, Urea, Parfum, Propylene Glycol, Hydrolyzed Elastin, Pentylene Glycol, Disodium EDTA, Sorbitan Isostearate, Citric Acid.

Composizione Quali-Quantitativa

Ingredienti	%	Fase
Aqua active Rosé grape pomace 1,3%	Qb 100	A
Caprylic/Capric Triglyceride	3	B
Glycerin	3	A
Butylene Glycol	3	B
Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer	1,85	A2
Squalane	1,27	A2
Dimethicone	1	B
Vitis Vinifera Seed Oil	1	B
Tocopherol	1	C

Hydrogenated Ethylhexyl Olivatate	1	B
Hydrogenated Olive Oil Unsaponifiables	1	B
Oryza Sativa Bran Oil	0,1	B
Cetyl Alcohol	0,3	B
Xanthan gum	0,3	A
Sodium Hyaluronate	0,1	A
Tocopheryl Acetate	0,12	C
Phenoxyethanol	0,7	A
Potassium Sorbate	0,2	A
Sodium Benzoate	0,2	A
Polysorbate 60	0,275	A2
Arginine	0,1	C
Inositol	0,1	C
Urea	0,1	C
Parfum	0,1	C
Propylene Glycol	0,0562	C
Hydrolyzed Elastin	0,0261	C
Pentylene Glycol	0,011	C
Disodium EDTA	0,1	A
Sorbitan Isostearate	0,075	A2
Citric Acid	0,07	D

2.17.2 Preparazione

La crema è stata prodotta in condizioni controllate, con attrezzature sanificate e uso di DPI adeguati. L'acqua distillata è stata sostituita da acqua di vinaccia Rosato (1,3%). Le fasi A, A2 e B sono state preparate separatamente, riscaldate a 70 °C e successivamente emulsionate con turbo-emulsore. A raffreddamento (<40 °C), è stata incorporata la fase C e regolato il pH. Il prodotto finito è stato confezionato, campionato e sottoposto a controlli qualità.

2.18 Analisi Statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in almeno tre repliche indipendenti. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM). L'analisi statistica è stata condotta con il software GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Il confronto tra due gruppi è stato effettuato tramite test t di Student, mentre per il confronto tra tre o più gruppi è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA). Differenze statisticamente significative sono state considerate per $p < 0,05$.

3. Risultati

3.1 Contenuto totale in polifenoli

Il contenuto totale in polifenoli (TPC) è stato determinato mediante saggio Folin–Ciocalteu, con espressione dei risultati in mg equivalenti di acido gallico (GAE) per grammo di estratto secco. I risultati ottenuti, riportati nella Tabella 3.1, mostrano differenze significative in relazione sia alla matrice di origine (rosato vs rosso), sia alla metodica di estrazione utilizzata (infusione vs ultrasuoni).

Sample	Contenuto totale in polifenoli GAE mg/g extract
Rosato Infusione	681,8
Rosato Ultrasuoni	778,4
Rosso Infusione	420,3
Rosso Ultrasuoni	203,4

Tabella 3.1 – Contenuto totale in polifenoli (TPC).

Gli estratti ottenuti da vinacce rosate hanno evidenziato un contenuto fenolico superiore rispetto a quelli derivati da vinacce rosse, in entrambi i metodi di estrazione. In particolare, l'estrazione assistita da ultrasuoni del rosato ha fornito il valore più elevato (778,4 mg GAE/g estratto), suggerendo una maggiore efficienza del processo rispetto alla semplice infusione.

Nel caso delle vinacce rosse, al contrario, il trattamento ad ultrasuoni ha prodotto una quantità di fenoli inferiore rispetto all'infusione (203,4 mg/g vs 420,3 mg/g).

3.2 Determinazione della Capacità Antiossidante

Le vinacce (grape pomace, GP) sono note per le loro proprietà antiossidanti, principalmente attribuite alla presenza di composti fenolici in grado di modulare i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di agire come scavenger di radicali liberi [1,2]. Per valutare l'attività antiossidante degli estratti ottenuti da vinacce di uva rosata e rossa, sono stati eseguiti tre test in vitro: DPPH, ABTS e FRAP. Nei test DPPH e ABTS, l'attività scavenger è stata espressa come valore IC_{50} , ovvero la concentrazione necessaria per neutralizzare il 50% dei radicali liberi presenti nel sistema. Valori più bassi di IC_{50} indicano una maggiore capacità antiossidante. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 3.2.

Sample	DPPH test	ABTS test	Frap test
	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)	Fe (II)/g
Rosato Infusione	0,780778	1,181663	37,800
Rosato Ultrasuoni	0,480339	0,485128	92,364
Rosso Infusione	2,574403	2,162407	17,622
Rosso Ultrasuoni	2,141551	3,314741	15,109

Controllo positivo nei test antiossidanti: Acido ascorbico IC₅₀ di 0,008 mg/ml nel test DPPH e 1,72 ug/ml per ABTS; BHT 63,26 µMFe (II)/g nel test FRAP

Tabella 3.2 – Attività antiossidante degli estratti (test DPPH, ABTS, FRAP). I valori IC₅₀ sono espressi in mg/mL; FRAP in µM Fe(II)/g di estratto.

I risultati mostrano chiaramente che gli estratti di vinacce rosate presentano una capacità antiossidante superiore rispetto a quelli rossi, in tutti e tre i test eseguiti. In particolare, l'estratto Rosato Ultrasuoni ha registrato i valori IC₅₀ più bassi nei test DPPH (0,480 mg/mL) e ABTS (0,485 mg/mL), e il più alto potere riducente nel test FRAP (92,364 µM Fe(II)/g). Questo indica una notevole efficacia nell'inattivare i radicali liberi e una maggiore capacità di donare elettroni. Al contrario, gli estratti di vinacce rosse, soprattutto quello ottenuto per infusione, hanno mostrato un'attività inferiore: IC₅₀ più elevati (fino a 2,574 mg/mL per DPPH) e valori FRAP inferiori (15,109–17,622 µM Fe(II)/g). Nel complesso, i dati ottenuti evidenziano una correlazione tra contenuto fenolico e attività antiossidante, confermata dall'andamento coerente dei tre test, come già osservato in letteratura [3].

3.3 Attività Antinfiammatoria

L'attività scavenger dei diversi estratti nei confronti del radicale ossido nitrico (NO) è stata valutata mediante saggio in vitro, con espressione dei risultati come valore IC₅₀ (mg/mL), ovvero la concentrazione necessaria per inibire il 50% della formazione del radicale. Tra i campioni analizzati, l'estratto Rosato Ultrasuoni ha evidenziato la maggiore efficacia antiossidante, con un IC₅₀ pari a 1,816 mg/mL, seguito dal Rosato Infusione con 3,651 mg/mL. I campioni da vinacce rosse hanno mostrato attività inferiori, con 7,651 mg/mL per il Rosso Ultrasuoni e 7,822 mg/mL per il Rosso Infusione. L'elevata attività del campione rosato ultrasuoni può essere attribuita alla maggiore disponibilità di flavonoidi e antociani bioattivi, già osservata nei profili fitochimici, noti per il loro ruolo nella modulazione dello stress ossidativo e della risposta infiammatoria [2].

3.4 Profilo Fitochimico degli Estratti di Vino Rosato e Rosso

L'analisi UHPLC, come mostrato nella tabella 3.3, ha confermato la presenza di diversi composti bioattivi, tra cui acidi fenolici, flavan-3-oli, flavonoli, procianidine e antociani. Il contenuto totale di polifenoli varia in base alla tecnica estrattiva: gli ultrasuoni hanno favorito una maggiore estrazione, con valori più alti nel rosato ultrasuoni (5177,7 $\mu\text{g/g}$) e nel rosso ultrasuoni (6301 $\mu\text{g/g}$), rispetto alle rispettive infusioni (4794,7 $\mu\text{g/g}$ e 4273,2 $\mu\text{g/g}$). L'estrazione con ultrasuoni ha incrementato la presenza di catechine ed epicatechine, con il rosso ultrasuoni che presenta il massimo contenuto di catechina (897,0 $\mu\text{g/g}$) ed epicatechina (697,6 $\mu\text{g/g}$). Anche i flavonoli, in particolare la quercetina-3-O-glucuronide, risultano più abbondanti nei campioni trattati con ultrasuoni. Gli antociani, fondamentali per il colore e l'attività antiossidante, sono più elevati nel rosato ultrasuoni (malvidina-3-O-glucoside: 2894,4 $\mu\text{g/g}$) rispetto alla sua infusione (2640,2 $\mu\text{g/g}$), mentre il rosso ultrasuoni raggiunge il valore massimo (3594,4 $\mu\text{g/g}$). Questi dati confermano l'influenza della tecnica estrattiva sulla composizione fenolica degli estratti [4–8].

Composti	Rosato	Rosato	Rosso	Rosso
	Infusione (µg/g)	Ultrasuoni (µg/g)	Infusione (µg/g)	Ultrasuoni (µg/g)
Phenolic acids				
Gallic acid	27,4	25,6	47,7	38,8
Flavan-3-ols				
Catechin	776,5	670,1	966,2	897,0
Epicatechin	440,3	584,5	589,3	697,6
Gallotannins				
Galloyl glucose	28,9	31,5	35,3	31,5
Flavonols				
Quercetin rhamnoside	7,3	8,3	7,5	9,8
Quercetin-3-O-glucoside	17,1	20,4	24,3	27,5
Quercetin-3-O-glucuronide	35,8	43,8	46,8	55,4
Myricetin hexoside	18,9	18,3	27,7	23,2
Syringetin hexoside	8,1	9,0	9,4	9,8
Quercetin rutinoside	5,1	4,5	7,4	6,9
Procyanidins				
Procyanidin dimer B-type	50,3	37,0	65,8	51,6
Procyanidin dimer B-type	32,8	13,6	56,4	27,1
Procyanidin B2	34,5	49,7	31,2	35,3
Procyanidin dimer gallate B-type	14,1	14,7	24,3	28,0
Procyanidin trimer B-type	15,4	15,7	11,3	13,2
Procyanidin trimer B-type	28,8	18,5	34,3	19,5
Procyanidin trimer B-type	23,4	4,4	28,1	6,9
Anthocyanins				
Cyanidin-3-O-glucoside	2,2	2,1	3,7	3,6
Delphinidin-3-O-glucoside	23,6	24,0	21,4	25,3
Petunidin-3-O-glucoside	452,0	583,4	405,4	584,5
Malvidin-3-O-glucoside	2640,2	2894,4	2152,5	3594,4
Malvidin-3-O-acetylglucoside	31,9	60,0	39,6	63,5
Petunidin-3- <i>p</i> - coumaroylglucoside	4,2	4,4	4,9	5,3
Malvidin-3- <i>p</i> -coumaroylglucoside	68,5	32,8	29,8	36,7
Malvidin-diglucoside	7,4	7,0	8,3	8,6
Total sum (poly)phenols	4794,7	5177,7	4273,2	6301

Tabella 3.3 – Profilo fitochimico degli estratti.

Gli estratti di rosato e rosso possiedono significative proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, con il rosato che mostra una maggiore capacità di ridurre lo stress ossidativo e promuovere la proliferazione cellulare. La tecnica estrattiva ha un impatto rilevante sulla composizione finale degli estratti: gli ultrasuoni sembrano migliorare l'estrazione di alcuni composti bioattivi, in particolare catechine, epicatechine e antociani. Questi risultati supportano l'uso del rosato come ingrediente naturale per formulazioni cosmetiche e dermatologiche eco-sostenibili, confermandone il potenziale nella protezione della pelle contro lo stress ossidativo e l'infiammazione.

3.5 Valutazione della Biocompatibilità e Citotossicità

I promettenti risultati ottenuti nei test di capacità antiossidante e di eliminazione dei radicali liberi hanno portato a valutare l'efficacia degli estratti in un modello cellulare utilizzando fibroblasti murini BALBc/3T3. Gli estratti impiegati per le successive analisi sono quelli ottenuti per infusione. L'analisi delle proprietà biologiche degli estratti di vinacce in termini di citotossicità, biocompatibilità e bioattività è stata effettuata mediante un test combinato. Questo ha previsto l'impiego di un saggio di citotossicità morfologica visiva e di un test spettrofotometrico basato sulla quantificazione del colorante rosso neutro (NR). Tale metodologia ha permesso di valutare l'effetto degli estratti su cellule di fibroblasti murini BALBc/3T3 in coltura, individuando eventuali agenti potenzialmente tossici e fornendo informazioni sulla loro sicurezza per applicazioni biologiche. L'analisi NRU (Neutral Red Uptake) condotta su BALBc/3T3, mostrati in Figura 3.1, ha evidenziato che entrambi gli estratti non sono citotossici a concentrazioni inferiori a 10 mg/mL. Tuttavia, il rosso ha mostrato una lieve riduzione della vitalità cellulare alle concentrazioni più elevate.

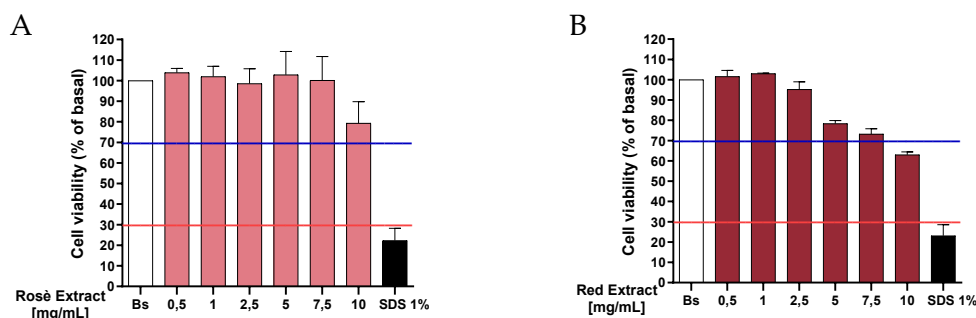


Figura 3.1-Citotossicità di Rosato e Rosso, ottenuti per infusione. Test di vitalità cellulare NRU (%), su BALB/c 3T3, in assenza o in presenza di dosi crescenti di estratto del Rosato (A) e Rosso (B). Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di tre pozzetti/gruppo. LINEA BLU: non citotossico, vitalità cellulare $<70\%$, LINEA ROSSA: fortemente citotossico, vitalità cellulare $<30\%$.

Un'ulteriore conferma della mancanza di citotossicità degli estratti è stata ottenuta mediante il saggio MTT, un'analisi colorimetrica che permette di valutare la proliferazione cellulare misurando

l'attività metabolica. Nei risultati, in figura 3.2, l'estratto del Rosato ha dimostrato una capacità proliferativa significativa sui fibroblasti a 24 ore, suggerendo il suo potenziale nella rigenerazione tissutale, tale effetto si attenua a 48 ore, indicando una possibile dipendenza temporale [7,9].

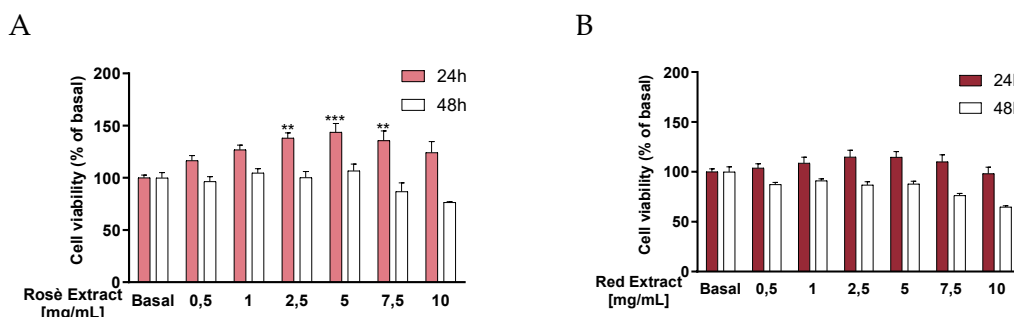


Figura 3.2-Effetti proliferativi del Rosato e del Rosso. Il saggio di proliferazione cellulare MTT è stato eseguito su cellule Balb/3T3, trattate con dosi crescenti del Rosato (A) o Rosso (B) per 24 e 48 ore. I risultati sono espressi come percentuale dei valori medi di assorbanza, rispetto al basale (cellule non trattate), e rappresentano la media \pm SE di tre diversi esperimenti. (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ rispetto al basale).

3.6 Effetti sulla Produzione di ROS

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), un segno distintivo dello stress ossidativo, è stata quantificata con il Muse® Oxidative Stress Kit. Come mostrato in figura 3.3, l'estratto di rosato ha ridotto significativamente la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in BALB/c 3T3 e trattate con H₂O₂, evidenziando il suo ruolo protettivo contro lo stress ossidativo. Il rosso, invece, non ha mostrato i medesimi effetti, probabilmente a causa della sua minore concentrazione di polifenoli antiossidanti [2,10].

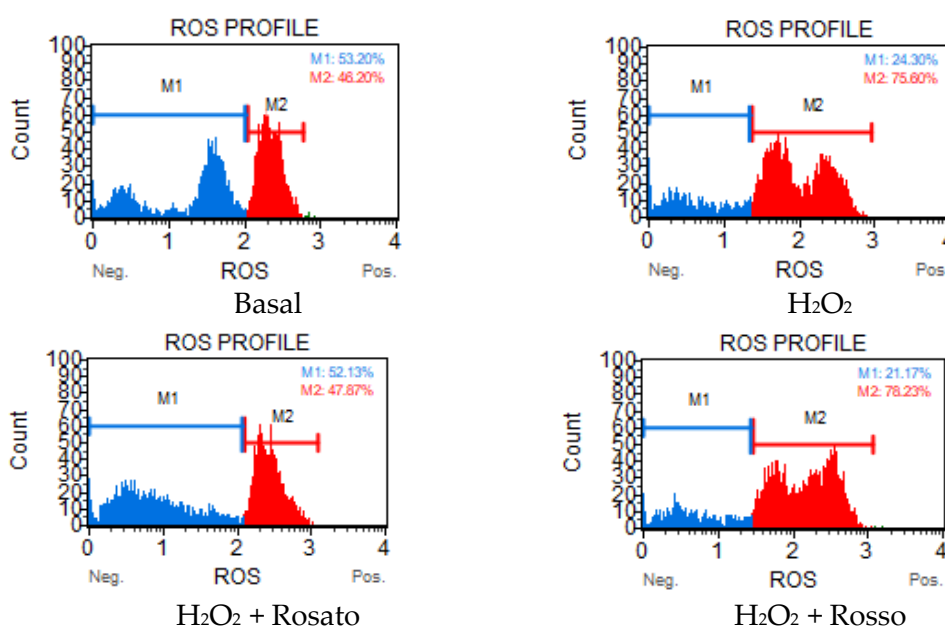


Figura 3.3-Effetti del Rosato e del Rosso sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le cellule BALB/c 3T3 sono state trattate con H₂O₂ (500 μ M) da solo o in combinazione con 2,5 mg/mL del Rosato o Rosso per 3 ore.

3.7 Potenziale Sensibilizzante e Applicazioni Cosmetiche

Considerando gli effetti osservati e le possibili applicazioni topiche degli estratti, è stato eseguito lo Human Cell Activation Test (h-CLAT), per valutare il loro potenziale sensibilizzante. Il test ha misurato i livelli di espressione dei marcatori di attivazione immunitaria CD86 e CD54, dopo 24 ore di esposizione a 6 concentrazioni seriali degli estratti, in una linea cellulare di monociti umani THP-1. L'attivazione è stata valutata tramite l'Intensità di Fluorescenza Relativa (RFI%), misurata con citofluorimetro: i valori di RFI% per entrambi gli estratti (Rosato e Rosso), mostrati in tabella 3.4, sono inferiori alle soglie, indicando che non possiedono proprietà sensibilizzanti sulla pelle.

Campione	CD86*	CD54*
Rosato ($\mu\text{g/mL}$) 76,27	147	198
158,16	124	170
273,29	122	171
Rosso ($\mu\text{g/mL}$) 23,41	148	195
48,54	125	192
83,88	148	164
Negative Control	102	101
Positive Control (NISO ₄)	389	394

* The sample is a skin sensitizer where CD86 > 150 and CD54 > 200.

Tabella 3.4. Effetti pro-sensibilizzanti degli estratti Rosato e Rosso

3.8 Transizione ai Modelli Umani per il Potenziale Anti-Infiammazione Cutanea

Considerando i risultati promettenti ottenuti nei modelli murini, la ricerca si è estesa a modelli cellulari umani per approfondire il potenziale dell'estratto come agente topico per la gestione delle condizioni infiammatorie della pelle.

3.9 Effetto Proliferativo degli Estratti su BJ e HaCat

Il test SRB, un test colorimetrico che permette di quantificare la vitalità cellulare, misurando il contenuto proteico, è stato condotto per valutare gli effetti proliferativi degli estratti di rosato e rosso su fibroblasti umani BJ e cheratinociti HaCat, dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione. I risultati, riportati nella figura 3.4, mostrano che il rosato, a basse dosi, non è citotossico per entrambe le linee cellulari, suggerendo il suo potenziale utilizzo in trattamenti per condizioni iperproliferative come la psoriasi. Il rosso, invece, ha mostrato una maggiore tollerabilità anche a dosi più elevate [11].

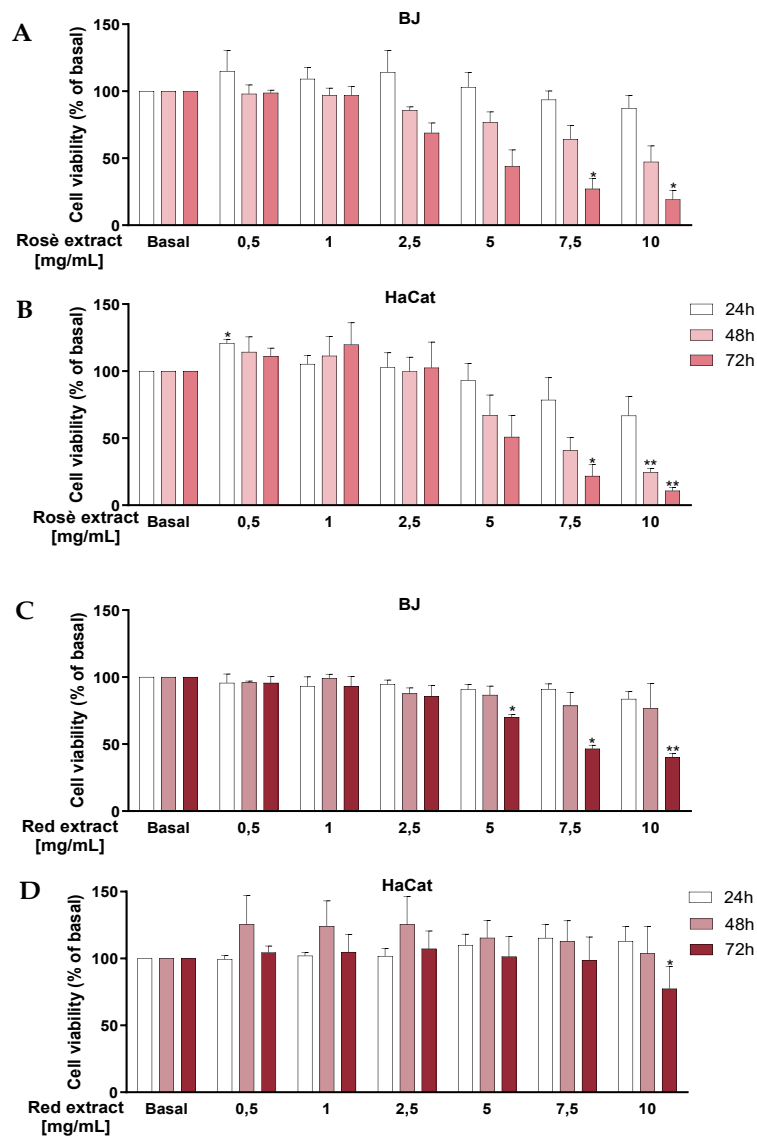


Figura 3.4-Saggio di proliferazione cellulare SRB su BJ e HaCat. Il saggio di proliferazione cellulare SRB è stato eseguito su cellule Bj1 (A,C) e HaCat (B,D), trattate con dosi crescenti di Rosato (A,B) o Rosso (C,D) per 24h, 48h e 72h. I risultati sono espressi come percentuale dei valori medi di assorbanza rispetto al basale (cellule non trattate) e rappresentano la media \pm SE di tre diversi esperimenti. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ rispetto al basale).

Il test MTT, mostrato nella figura 3.5, ha confermato questi risultati, indicando che l'estratto di rosato riduce più significativamente la vitalità cellulare rispetto al rosso, specialmente a dosi più alte e tempi di esposizione prolungati.

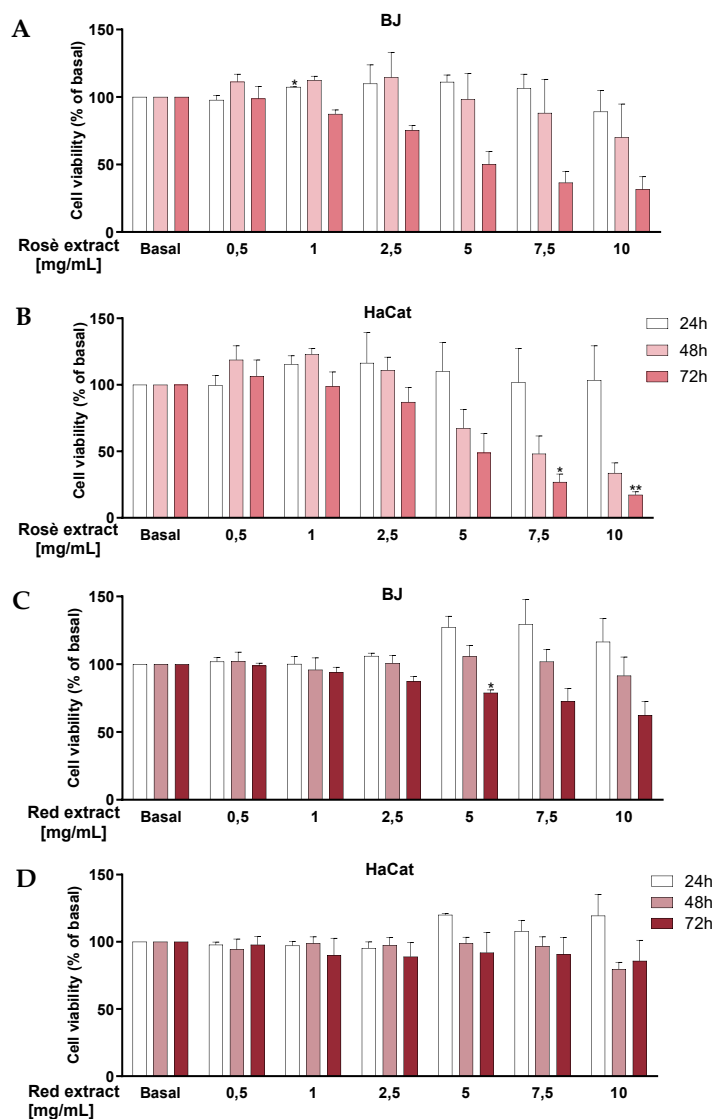


Figura 3.5 Saggio di proliferazione cellulare MTT su BJ e HaCat. Il saggio di proliferazione cellulare MTT è stato eseguito su cellule BJ (A,C) e HaCat (B,D), trattate con dosi crescenti di Rosato (A,B) o Rosso (C,D) per 24 ore, 48 ore e 72 ore. I risultati sono espressi come percentuale dei valori medi di assorbanza rispetto al basale (cellule non trattate) e rappresentano la media \pm SE di tre diversi esperimenti. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ rispetto al basale).

3.10 Caratterizzazione delle proprietà antinfiammatorie e antiangiogeniche dell'estratto del Rosato

Alla luce dei risultati della caratterizzazione dell'estratto, che ha identificato l'estratto di Rosato come il più attivo in termini di attività antiossidante, di rimozione dei radicali liberi e di riduzione dell'ossido nitrico, e considerando la sua potenziale applicazione nelle condizioni infiammatorie della pelle caratterizzate da iperproliferazione dei cheratinociti, i successivi esperimenti *in vitro* sono

stati condotti esclusivamente con l'estratto del Rosato, in quanto è emerso come il candidato più promettente.

3.11 Il trattamento con Rosato aumenta il miR-30c-5p

Per valutare la potenziale attività antinfiammatoria dell'estratto del Rosato, è stato esplorato il suo effetto regolatore sull'espressione del miR-30c-5p. È stato dimostrato che l'upregolazione del miR-30c-5p sopprime l'espressione di citochine pro-infiammatorie come l'IL-6 in modelli di linee cellulari microgliali [12]. Analogamente, è stato riscontrato che l'esposizione al lipopolisaccaride (LPS) diminuisce i livelli di miR-30c-5p nelle cellule endoteliali microvascolari polmonari umane (HPMEC) [13]. L'LPS, insieme alle specie reattive dell'ossigeno e ad altri fattori patologici, induce la rottura della barriera nelle cellule endoteliali (EC) e innesca la secrezione di proteine pro-infiammatorie dalle cellule danneggiate. Inoltre, la sovraespressione del miR-30c-5p ha portato a un aumento degli enzimi antiossidanti, tra cui la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi, nonché delle metalloproteinasi di matrice (MMP), nelle cellule trattate con ossalato di sodio (Wang et al., 2019). I risultati riportati nella Figura 3.6 mostrano che il Rosato è in grado di regolare l'espressione del miR-30c-5p.

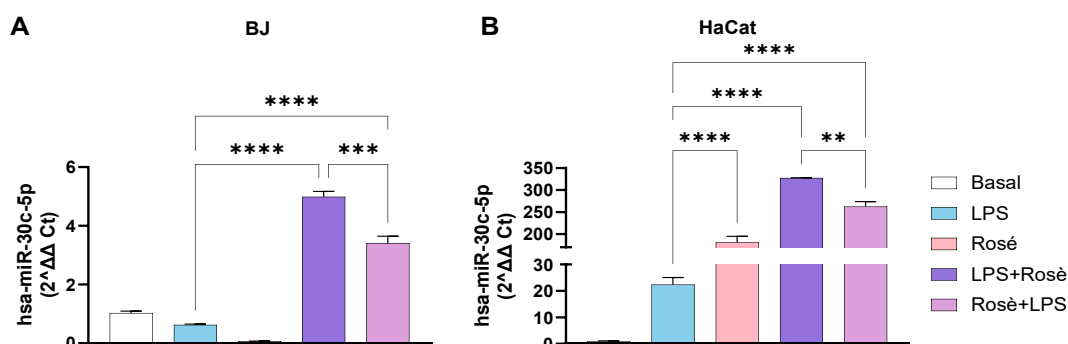


Figura 3.6 Espressione di miR-30c-5p su cellule BJ e HaCat. Le cellule BJ (A) e HaCat (B) sono state trattate nelle seguenti condizioni: basale (non trattate) per 24 ore; LPS (0,5 ug/mL) da solo per 24 ore; estratto del Rosato (2,5 mg/mL) da solo per 24 ore; pre-trattamento LPS (0,5 ug/mL per 9 ore) seguito da estratto del Rosato (2,5 mg/mL) per 14 ore; e pre-trattamento Rosato (2,5 mg/mL per 9 ore) seguito da LPS (0,5 ug/mL) per 14 ore. I risultati sono espressi come percentuale di variazione del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ rispetto al basale (cellule non trattate) e rappresentano la media \pm SE di tre diversi esperimenti (****p < 0,0001, ***p = 0,0005 e **p < 0,005).

Nelle cellule BJ, l'esposizione all'LPS porta a un leggero aumento dell'espressione del miR-30c-5p rispetto alle cellule non trattate, indicando che l'LPS induce una lieve upregolazione del miR-30c-5p. Tuttavia, il co-trattamento con l'estratto del Rosato determina una significativa upregolazione

dell'espressione di miR-30c-5p, suggerendo che nello stato infiammatorio indotto da LPS, Rosato può attivare efficacemente miR-30c-5p. Questo effetto è particolarmente pronunciato quando lo stato infiammatorio è già consolidato (pre-trattamento con LPS).

Una tendenza simile si osserva nelle cellule HaCat, dove Rosato induce anche l'attivazione del miR-30c-5p. Tuttavia, in questo caso, l'attivazione è molto più pronunciata, raggiungendo una notevole induzione di 350 volte. La capacità del Rosato di upregolare il miR-30c-5p, in particolare in combinazione con l'LPS, evidenzia le sue potenziali proprietà antinfiammatorie, in quanto il miR-30c-5p è noto per sopprimere citochine pro-infiammatorie come l'IL-6.

La risposta più forte nei cheratinociti HaCat rispetto ai fibroblasti BJ potrebbe essere dovuta a differenze specifiche del tipo di cellula nella regolazione dei miRNA o alla sensibilità ai trattamenti.

3.12 Analisi di Gene Ontology (GO) del miR-30c-5p

Per esplorare i ruoli e le associazioni biochimiche del miR-30c-5p, sono state eseguite analisi di arricchimento per identificare le funzioni biologiche dei suoi geni bersaglio utilizzando l'analisi Gene Ontology (GO)[14]. I geni che mostravano un arricchimento significativo nelle categorie GO sono stati analizzati in tre domini: processi biologici (BP), componenti cellulari (CC) e funzioni molecolari (MF). I risultati, mostrati nella Figura 3.7, indicano che il miR-30c-5p è coinvolto in processi biologici critici come la regolazione della trascrizione, l'ubiquitinazione delle proteine e il controllo del ciclo cellulare. I suoi bersagli sono arricchiti in compartimenti cellulari come il nucleo, il citoplasma e i complessi di ubiquitina ligasi e le sue funzioni molecolari includono il legame con le proteine, il legame con l'RNA e la regolazione trascrizionale. Questi risultati sottolineano il ruolo potenziale del miR-30c-5p nell'omeostasi cellulare, nelle risposte infiammatorie e nella regolazione delle proteine.

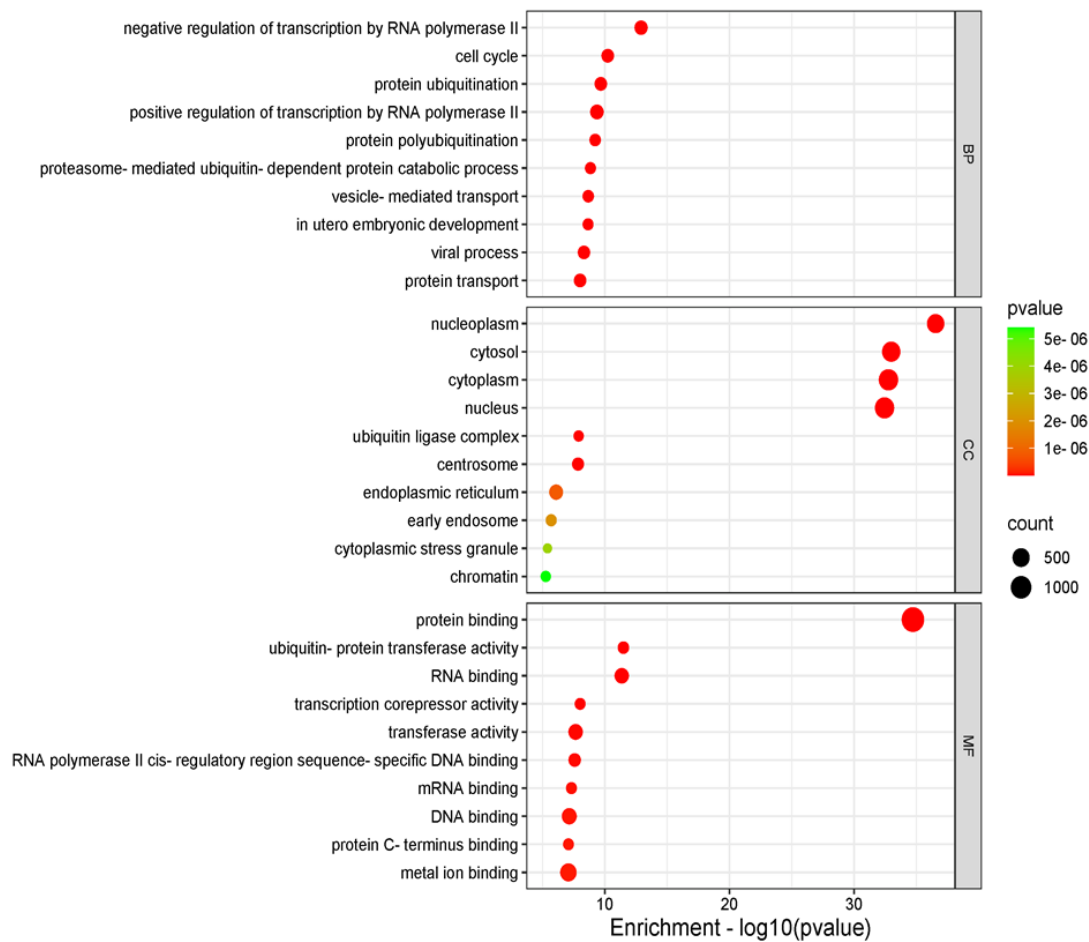


Figura 3.7 Ontologia genica del miR-30c-5p. BP - Processi biologici; CC - Componenti cellulari; MF - Funzione molecolare. Arricchimento - $\log_{10}(\text{p-value})$ indica la significatività statistica di ciascun termine GO. Valori più alti rappresentano un arricchimento più significativo. Colore dei punti: rappresenta il p-value, con un gradiente di colore dal verde (p-value più alto) al rosso (p-value più basso, più significativo). Dimensione dei punti: Indica il numero di geni associati a ciascun termine GO, con punti più grandi che rappresentano conteggi più elevati.

3.13 Analisi dell'arricchimento funzionale dei percorsi KEGG

KEGG fornisce database completi contenenti informazioni su genomi, percorsi biologici, malattie, farmaci e composti chimici [15]. I 10 principali percorsi arricchiti dai geni target sono illustrati nel diagramma a punti presentato nella Figura 3.8. L'analisi suggerisce una forte associazione tra i miR-30c-5p e i geni target. L'analisi suggerisce una forte associazione tra il miR-30c-5p e le vie metaboliche, in particolare quelle che coinvolgono il metabolismo degli acidi grassi, l'elaborazione delle proteine e la segnalazione cellulare. La presenza di vie legate al cancro (p53, Wnt, TGF-beta) e all'apoptosi evidenzia un possibile legame con lo stress cellulare, la proliferazione o i meccanismi di sopravvivenza.

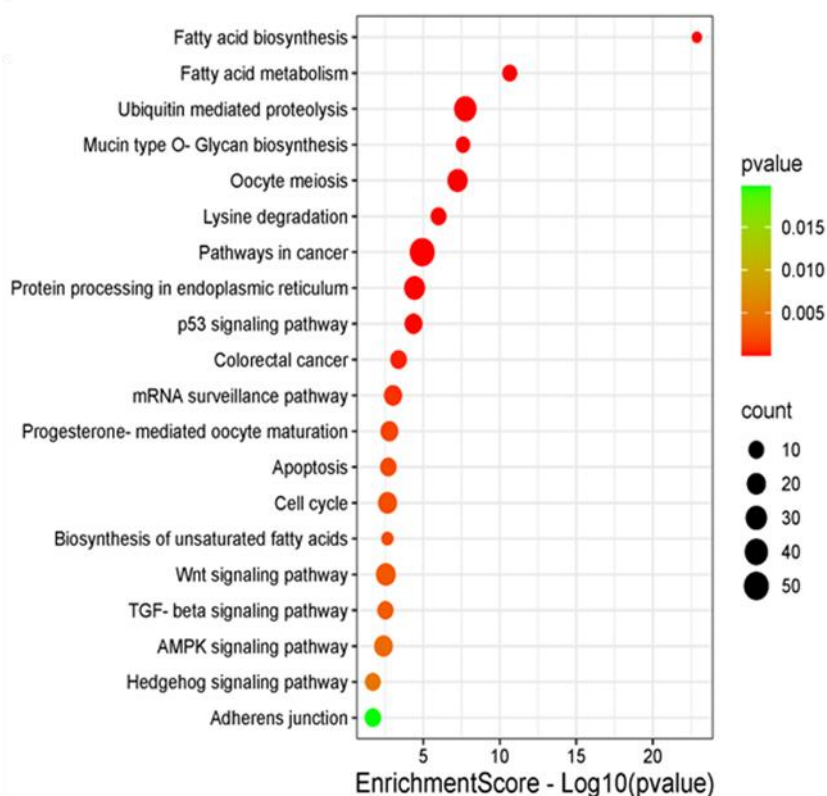


Figura 3.8 Analisi del percorso KEGG dell'arricchimento di miR-30c-5p - il $\log_{10}(\text{p-value})$ indica la significatività statistica di ciascun termine KEGG. I valori più alti rappresentano un arricchimento più significativo. Colore dei punti: Rappresenta il p-value, con un gradiente di colore dal verde (p-value più alto) al rosso (p-value più basso, più significativo). Dimensione dei punti: Indica il numero di geni associati a ciascun termine GO, con punti più grandi che rappresentano conteggi più elevati.

3.14 Arricchimento dei percorsi di miR-30c-5p e reti di interazione proteina-proteina (PPI) su Reactome

Per comprendere meglio le interazioni tra i bersagli di hsa-miR-30c-5p, i geni presenti nei percorsi KEGG con l'arricchimento più significativo sono stati utilizzati per l'arricchimento dei percorsi Reactome e la costruzione di reti di interazione proteina-proteina (PPI) utilizzando il database STRING. Il database Reactome collega le proteine umane alle loro funzioni molecolari (Milacic et al., 2024). I percorsi più ricchi in Reactome includono l'elaborazione dell'antigene mediata da MHC di classe I, l'elaborazione dell'antigene, l'ubiquitinazione e la degradazione del proteosoma, il sistema immunitario adattativo (Figura 3.9 A). Questi percorsi hanno punteggi di somiglianza superiori a 0,8, il che suggerisce che sono raggruppati in base alla somiglianza funzionale o meccanicistica relativa al sistema immunitario. Altri percorsi significativi includono la segnalazione da parte dei membri della famiglia TGFB, la segnalazione del recettore Fc epsilon (FCERI) e le vie del ciclo cellulare, indicando potenziali connessioni con la segnalazione cellulare e la regolazione

della divisione cellulare. La Figura 3.9 B mostra un cluster di interazioni di proteine legate al sistema immunitario adattativo composto da 21 nodi e 146 bordi (punteggio 14,6), tra cui TRIP12, UBE2R2, CUL5, RNF7 e UBE2D2. Molte di queste proteine sono coinvolte nelle vie dell'ubiquitinazione e del proteasoma, sottolineando il ruolo della degradazione e dell'elaborazione delle proteine nel contesto biologico osservato.

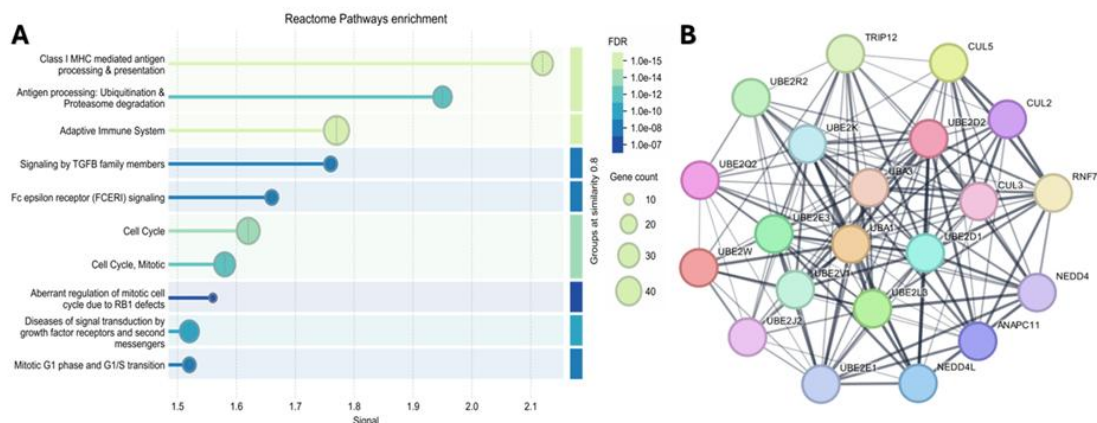


Figura 3.9 Analisi delle PPI mediante miR-30c-5p. (A) Arricchimento di Reactome Pathways (B) Diagramma di rete delle interazioni proteina-proteina. Ogni nodo rappresenta una proteina, con le proteine specifiche etichettate. Bordi: Le connessioni tra i nodi rappresentano interazioni note o previste tra queste proteine.

3.15 Effetti del Rosato sull'IL-6

Per valutare i potenziali effetti antinfiammatori del Rosato ed esplorarne la rilevanza terapeutica in condizioni caratterizzate da un'inflammatione disregolata, è stata studiata la modulazione dell'IL-6. Infatti, l'IL-6 è una citochina pro-infiammatoria chiave che orchestra l'attivazione dei cheratinociti e le risposte infiammatorie mediate dalle cellule immunitarie, processi centrali nella fisiopatologia della psoriasi (Wang e Jin, 2018). L'LPS è stato utilizzato come robusto innesco infiammatorio, mimando l'iperattivazione immunitaria caratteristica delle condizioni psoriasiche. I livelli di IL-6 sono stati quantificati utilizzando il saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA). I risultati della Figura 3.10 mostrano l'espressione di IL-6 nelle cellule BJ (A) e HaCat (B). Nelle cellule BJ, i livelli di IL-6 sono notevolmente elevati in seguito alla stimolazione con LPS, indicando una forte risposta infiammatoria; il trattamento con Rosato sembra ridurre significativamente l'espressione di IL-6, suggerendo i suoi potenziali effetti antinfiammatori. Una tendenza simile si osserva nelle cellule HaCat, dove la stimolazione con LPS aumenta l'espressione di IL-6, sebbene la riduzione con il trattamento con Rosato sia più pronunciata rispetto alle cellule BJ. In entrambe le linee cellulari

non ci sono differenze significative tra i due pretrattamenti. Ciò indica che in entrambi i tipi di cellule il Rosato esercita un effetto modulatore sull'espressione di IL-6.

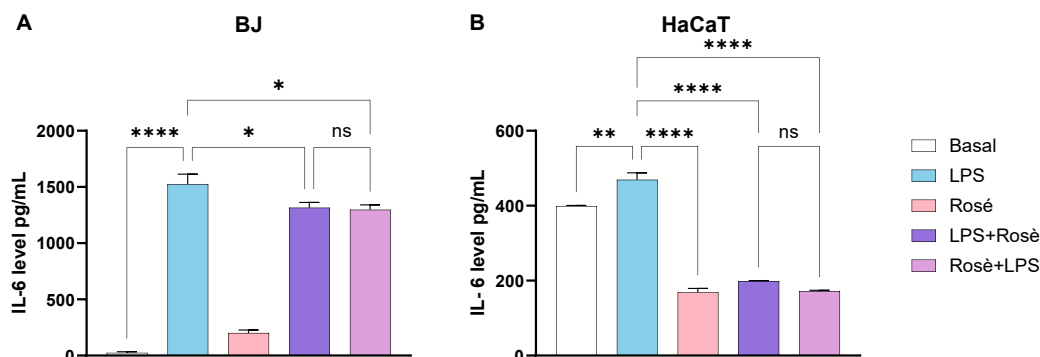


Figura 3.10 Effetti di inibizione dei livelli di IL-6 da parte del Rosato. Le cellule BJ (A) e HaCaT (B) sono state trattate nelle seguenti condizioni: basale (non trattate) per 48 ore; LPS (0,5 ug/mL) da solo per 48 ore; estratto del Rosato (2,5 mg/mL) da solo per 48 ore; pre-trattamento LPS (0,5 ug/mL per 9 ore) seguito da estratto del Rosato (2,5 mg/mL) per 39 ore; e pre-trattamento Rosato (2,5 mg/mL per 9 ore) seguito da LPS (0,5 ug/mL) per 39 ore. I risultati sono espressi come concentrazione di IL-6 pg/mL (****p <0,0001, **p<0,005 e *p<0,05).

3.16 Il potenziale del Rosato come inibitore dell'angiogenesi

Dato il coinvolgimento del VEGF-A nelle vie angiogeniche e infiammatorie, la sua modulazione da parte del Rosato è stata studiata per valutare il suo potenziale anti-angiogenico. Il VEGF-A è un motore cruciale dell'angiogenesi e contribuisce all'ipervascolarizzazione osservata nelle lesioni psoriasiche, che aumenta il reclutamento di cellule infiammatorie e sostiene l'iperplasia epidermica [16]. Inoltre, è stato dimostrato che l'interleuchina-6 induce l'espressione di VEGF-A, collegando ulteriormente le vie infiammatorie e angiogeniche [17]. L'LPS è stato utilizzato per la sua capacità di indurre il rilascio di VEGF-A [18]. I livelli di VEGF-A sono stati quantificati utilizzando il saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA).

Come mostrato nella Figura 3.11, nelle cellule HaCaT il trattamento con Rosato da solo non altera significativamente i livelli di VEGF-A rispetto alla condizione basale, mentre la stimolazione con LPS aumenta significativamente VEGF-A, ma quando il Rosato è combinato con LPS, riduce l'espressione di VEGF-A in modo significativo, rispetto al trattamento con LPS da solo, portando VEGF-A agli stessi livelli del trattamento con Rosato da solo. Mentre non ci sono differenze significative tra i due pretrattamenti. Ciò indica che il Rosato ha un forte effetto inibitorio sulla produzione di VEGF-A in un contesto infiammatorio.

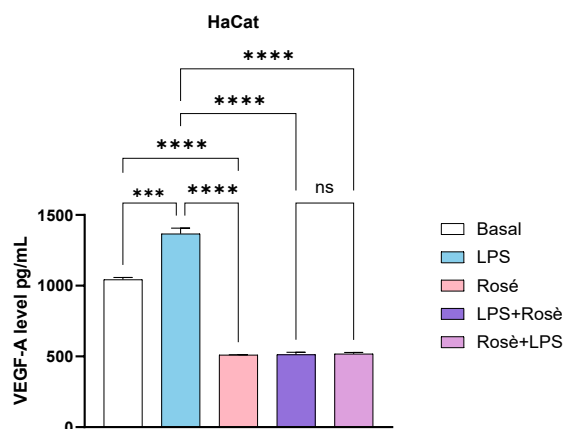


Figura 3.11 Effetti di inibizione dei livelli di VEGF-A da parte del Rosato. Le cellule HaCat sono state trattate nelle seguenti condizioni: basale (non trattate) per 48 ore; LPS (0,5 ug/mL) da solo per 48 ore; estratto del Rosato (2,5 mg/mL) da solo per 48 ore; pre-trattamento con LPS (0,5 ug/mL per 9 ore) seguito da estratto del Rosato (2,5 mg/mL) per 39 ore; e pre-trattamento con Rosato (2,5 mg/mL per 9 ore) seguito da LPS (0,5 ug/mL) per 39 ore. I risultati sono espressi come concentrazione di VEGF-A pg/mL (**** $p < 0,0001$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$).

Come mostrato nella figura 3.12, il mezzo condizionato (CM) raccolto da cellule HaCat trattate con LPS da solo ha portato a un aumento della formazione di tubi e delle ramificazioni nelle cellule EA.hy926 (B). Tuttavia, il co-trattamento con Rosato ha inibito efficacemente questo effetto, impedendo l'aumento dell'attività angiogenica indotta da LPS.

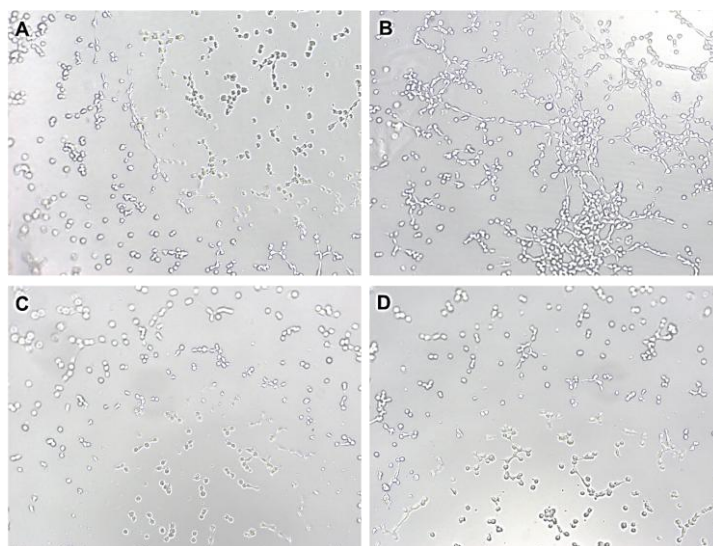


Figura 3.12 Formazione di tubi in EA.hy926 esposte a mezzi condizionati raccolti da HaCat. (A) Cellule EA.hy926 trattate con mezzi condizionati di cellule HaCat coltivate in condizioni basali (non trattate) per 48h, (B) esposte a LPS (0,8 ug/mL) da solo per 48h, (C) trattate con estratto del Rosato (2,5 mg/mL) da solo per 48h, (D) pre-trattate con LPS (0,8 ug/mL per 9h) seguito da estratto del Rosato (2,5 mg/mL) per 39h.

3.17 Formulazione cutanea

Sulla base di questi risultati incoraggianti, è stata sviluppata una formulazione in crema per uso topico che utilizza come principio attivo l'estratto liofilizzato di vinaccia Rosato. Questa

formulazione è stata studiata per sfruttare le proprietà bioattive dimostrate dell'estratto, con l'obiettivo di fornire una soluzione naturale ed efficace per le applicazioni cutanee, in particolare nelle condizioni associate all'infiammazione e allo stress ossidativo. La crema presenta una caratteristica innovativa nella sua formulazione: è stata preparata con acqua attiva del Rosato. In particolare, l'estratto del Rosato non è stato incorporato direttamente nella crema. Al contrario, è stata prima preparata un'acqua attiva all'1,3% di concentrazione con l'estratto e questa acqua attiva è stata poi utilizzata nella preparazione della crema. Poiché la formulazione è destinata all'uso cutaneo e quindi all'applicazione diretta sulla pelle, è essenziale confermare che non presenti effetti citotossici sulle cellule dermiche in condizioni di esposizione rilevanti e garantire che non induca una risposta immunitaria avversa, come ad esempio reazioni allergiche.

3.18 Analisi della citotossicità

Il saggio Neutral Red Uptake (NRU) è stato eseguito sulla formulazione in crema per valutarne la citotossicità, un passo fondamentale per valutare la sicurezza di un prodotto topico. Il saggio NRU è ampiamente riconosciuto come un metodo in vitro affidabile per i test di citotossicità ed è conforme alle linee guida normative (ad esempio, OECD TG 129), garantendo la sicurezza del prodotto per uso topico. Secondo Mannerström (2017), il saggio NRU è stato eseguito utilizzando fibroblasti BJ umani invece di cellule BALB/c 3T3, come specificato dalle linee guida ISO 10993-5:2009, per fornire una valutazione della citotossicità più rilevante per l'uomo [19]. I risultati, riportati nella Figura 3.13, indicano che la crema non presenta effetti citotossici, a sostegno della sua sicurezza per l'applicazione topica nelle condizioni testate.

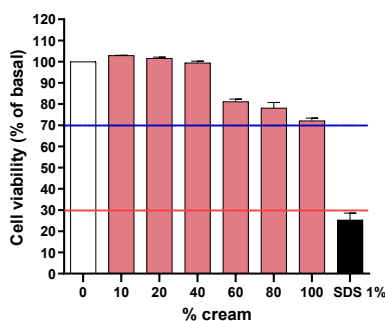


Figura 3.13 Valutazione della citotossicità della crema del Rosato. Il grafico mostra la vitalità cellulare (%) valutata con il test NRU su cellule BJ dopo il trattamento con l'estratto di crema del Rosato. È stato preparato un estratto di crema da 0,2 g/mL e applicato alle cellule a varie diluizioni, dal 100% (estratto non diluito) al 10%. I risultati illustrano l'effetto citotossico dell'estratto di crema a concentrazioni crescenti, con SDS 1% usato come controllo positivo per la citotossicità. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di tre pozzetti. LINEA BLU: non citotossica, vitalità cellulare $<70\%$, LINEA ROSSA: fortemente citotossica, vitalità cellulare $<30\%$.

3.19 Analisi del potenziale pro-sensibilizzante

Il test h-CLAT (Human Cell Line Activation Test) è stato eseguito sulla formulazione della crema per valutarne il potenziale di sensibilizzazione cutanea, un aspetto critico della valutazione della sicurezza delle applicazioni topiche. Questo test è in linea con le linee guida internazionali (ad esempio, OECD TG 442E) per la valutazione del potenziale di sensibilizzazione dei prodotti cosmetici e dermatologici e garantisce che la formulazione sia sicura per l'uso umano. Come mostrato nella Tabella 3.5, la crema non presenta effetti di sensibilizzazione cutanea, in quanto i valori RFI% erano inferiori alle soglie CD86 e CD54.

Campione	CD86*	CD54*
552,88 µg/mL	105	137
663,46 µg/mL	109	148
796,15 µg/mL	110	156
955,38 µg/mL	116	163
1146,46 µg/mL	120	168
1375,75 µg/mL	126	174
1650,90 µg/mL	133	180
1981,08 µg/mL	143	187
Negative Control	102	101
Positive Control (NISO ₄)	389	394

* Il campione è un sensibilizzatore cutaneo dove CD86 > 150 and CD54 > 200

Tabella 3.5.-Effetti pro-sensibilizzanti della crema a base di Rosato

3.20 Limiti e sfide nell'uso della vinaccia

Uno dei limiti principali nell'utilizzo della vinaccia è la difficoltà di standardizzazione. La composizione chimica della vinaccia è fortemente influenzata da fattori climatici, con conseguenti variazioni dei composti bioattivi nei diversi raccolti [20]. Ad esempio, i dati preliminari (non riportati in questo lavoro) hanno evidenziato differenze significative tra gli estratti del 2022 e del 2023. Questa variabilità rappresenta una sfida per la produzione di estratti standardizzati su larga

scala. Sebbene il processo di estrazione proposto sia tecnicamente semplice, la sua scalabilità richiede un notevole investimento di risorse. Uno di questi è il consumo di acqua, infatti l'estrazione di composti bioattivi, su scala di laboratorio, richiede 350 ml di acqua per ogni 40 g di vinaccia secca. Su scala industriale, ciò si traduce in 350 litri di acqua per 40 kg di vinaccia. Un altro aspetto da considerare è l'investimento iniziale per i costi delle attrezzature, che comprendono

- Disidratatore alimentare (~4.000 €)
- Maceratore/infusore (~4.000 €)
- Liofilizzatore (opzionale, ~20.000 €)

L'uso di un disidratatore alimentare è un costo inevitabile. Sebbene l'essiccazione al sole possa sembrare un'alternativa economicamente vantaggiosa, i dati (non riportati in questo lavoro) hanno rivelato che l'essiccazione al sole riduce significativamente la bioattività dell'estratto finale. Questa perdita di bioattività potrebbe compromettere l'efficacia del prodotto e il suo valore nelle applicazioni nutraceutiche e cosmetiche. Pertanto, investire in un processo di essiccazione controllata, ad esempio attraverso un disidratatore alimentare, è fondamentale per preservare le proprietà funzionali dell'estratto. In un contesto industriale, la vinaccia non verrebbe conservata sotto vuoto e congelata, come è stato fatto in questo studio. La vinaccia verrebbe essiccata subito dopo la produzione e conservata in sacchetti a prova di umidità per garantire la stabilità e prevenire la degradazione. Gli estratti verrebbero preparati solo su richiesta del prodotto, evitando la necessità di conservare a lungo gli estratti liquidi. Questo approccio elimina la necessità di conservanti, allineandosi alla crescente domanda del mercato di prodotti naturali e a marchio pulito. Implementando questi cambiamenti operativi, il processo di produzione diventerebbe più efficiente e sostenibile, riducendo i costi associati alla conservazione e mantenendo le proprietà bioattive dei prodotti. Un'analisi di mercato ha rivelato che gli estratti liquidi sono economicamente più vantaggiosi rispetto alle polveri liofilizzate.

Tipo di prodotto	Prezzo per unità	Resa per tonnellata	Ricavi
Estratto liquido	€10/L (non caratterizzato)	340 L	3,400 €
	€20-30/L (caratterizzato)	340 L	6,800 € - 10,200 €
Polvere liofilizzata	€30/kg (non caratterizzato)	11,66 kg	350 €
	€60/kg (caratterizzato)	11,66 kg	700 €

Tabella 3.6 - Analisi di mercato

I dati riportati nella tabella 3.6 evidenziano che:

- Gli estratti liquidi caratterizzati hanno un prezzo significativamente più alto, con una resa di 20-30 €/l rispetto ai 10 €/l degli estratti non caratterizzati;
- gli estratti liquidi offrono un'opportunità di guadagno più consistente rispetto alle polveri liofilizzate, sia nelle forme non caratterizzate che in quelle caratterizzate;
- La crescente domanda di prodotti bio-based di alta qualità suggerisce che investire nella caratterizzazione può aumentare la redditività.

La crescente domanda di prodotti biologici e verdi, unita alla provenienza dell'estratto dalla Cooperativa Terre Grechaniche - impegnata nella legalità, nell'economia circolare e nell'agricoltura biologica sostenibile - giustifica un prezzo premium per questi prodotti. Questo aggiunge valore promuovendo sia la regione che le pratiche sostenibili.

La produzione di estratto liquido sembra essere l'opzione più sostenibile, in quanto evita l'acquisto di un costoso liofilizzatore (~20.000 euro) e riduce le spese operative. Inoltre, il modello di economia circolare adottato dalla Cooperativa Terre Grechaniche, che enfatizza la biodiversità e il benessere umano e animale, aggiunge valore ambientale e sociale. Questo approccio è in linea con le attuali tendenze del mercato che privilegia i prodotti ecologici ed etici.

4. Discussione e Conclusioni

Questo studio ha avuto l'obiettivo di valorizzare le vinacce, un sottoprodotto significativo del settore vitivinicolo, trasformandole in una risorsa bioattiva di interesse nutraceutico e dermocosmetico. Ogni anno vengono coltivate e trasformate oltre 39,6 milioni di tonnellate di uva, generando una quantità di vinacce che rappresenta circa il 20–25% del peso totale dell'uva lavorata [21], pari a circa 8–10 milioni di tonnellate. L'identificazione di strategie innovative per il riutilizzo di questi scarti rappresenta una priorità per ridurre l'impatto ambientale dell'agricoltura e promuovere un'economia circolare sostenibile.

L'estrazione è stata condotta utilizzando due tecniche green: l'infusione in acqua a caldo e l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE), entrambe basate sull'impiego esclusivo di acqua come solvente, in linea con i principi della chimica verde e della sostenibilità ambientale.

Tra le metodiche testate, l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) si è rivelata particolarmente promettente per la matrice rosata, mostrando la maggiore resa in composti fenolici (778,4 mg GAE/g estratto) e la più elevata attività antiossidante nei test DPPH, ABTS e FRAP.

La cavitazione indotta dagli ultrasuoni ha favorito l'efficienza di rilascio dei composti attivi senza l'impiego di solventi organici, confermando la validità di UAE come metodo green ad alta prestazione.

I dati ottenuti dimostrano che le vinacce mantengono un contenuto elevato di polifenoli, tra cui acidi fenolici, flavan-3-oli, tannini, flavonoli, procianidine e antociani. In particolare, l'estratto ottenuto dalla vinaccia Rosato ha evidenziato un contenuto fenolico totale e una capacità antiossidante significativamente superiori rispetto a quello Rosso. Tale differenza è attribuibile principalmente alla maggiore concentrazione di malvidina-3-O-glucoside, un antociano noto per le sue proprietà antinfiammatorie e antiossidanti [22,23]. Questo composto è infatti in grado di ridurre la trascrizione di geni codificanti per mediatori dell'infiammazione e la secrezione di TNF α , IL-1, IL-6 e NO derivato dalla iNOS, oltre a modulare lo stress ossidativo e attivare il pathway Nrf2/ARE.

I risultati sono stati confermati attraverso saggi DPPH, ABTS, FRAP e valutazione della produzione intracellulare di ROS su cellule BALB/c 3T3.

In particolare, l'estratto Rosato ottenuto mediante ultrasuoni ha mostrato valori IC₅₀ significativamente più bassi nei test radicalici (0,480 mg/mL per DPPH e 0,485 mg/mL per ABTS) e un potere riducente FRAP di 92,364 μ M Fe(II)/g, a fronte di risultati inferiori ottenuti con il metodo a infusione. L'estratto Rosato ottenuto per infusione è stato impiegato per una caratterizzazione approfondita delle proprietà antinfiammatorie.

Una scoperta rilevante di questo studio è stata la capacità dell'estratto Rosato di indurre l'espressione di miR-30c-5p. Tale microRNA è noto per le sue funzioni anti-apoptotiche e antinfiammatorie [24], riducendo la secrezione di citochine come IL-6 e IL-1 β . Inoltre, l'estratto ha mostrato un effetto inibitorio sull'espressione di VEGFA e sull'angiogenesi indotta da LPS in cellule endoteliali EA.hy926. Questo effetto potrebbe essere mediato da miR-30c-5p, la cui downregolazione è associata a un aumento dell'angiogenesi [25], ma i nostri dati suggeriscono un possibile ruolo duale in base al contesto cellulare.

Nel complesso, l'estratto Rosato mostra un potenziale antinfiammatorio e antiossidante sinergico, agendo attraverso la modulazione di microRNA, l'inibizione di ROS e la riduzione della secrezione di mediatori pro-infiammatori (IL-6, VEGF-A). Queste proprietà sono di particolare interesse per il

trattamento di patologie cutanee infiammatorie come la psoriasi, malattia immuno-mediata caratterizzata da iperproliferazione cheratinocitaria e forte componente ossidativa [11,26].

L'estratto ha dimostrato inoltre capacità antiproliferative sui cheratinociti HaCat, una proprietà rilevante per contrastare l'acantosi tipica delle lesioni psoriasiche[27]. A ciò si aggiunge l'assenza di citotossicità e attività sensibilizzante, confermata da test in vitro sia sull'estratto che sulla formulazione in crema contenente l'estratto Rosato.

In sintesi, questo lavoro dimostra che la vinaccia Rosato rappresenta una fonte sostenibile di composti bioattivi, con promettenti applicazioni per il trattamento di patologie infiammatorie cutanee. Due prodotti concreti sono stati sviluppati nell'ambito di questo dottorato industriale:

1. **L'estratto di vinaccia Rosato**, che potrebbe essere valorizzato da imprese della rete vitivinicola dell'Area Greca per uso nutraceutico o dermocosmetico, trasformando un costo di smaltimento in una nuova opportunità economica.
2. **La crema topica** a base di Rosato, che potrà essere sottoposta a **sperimentazioni cliniche** per confermare l'efficacia in vivo, come già osservato in vitro, ampliando le prospettive commerciali e terapeutiche di questa ricerca.
3. L'impiego della tecnologia ad ultrasuoni ha rappresentato un elemento chiave per l'ottenimento di estratti più performanti, favorendo l'applicazione industriale di un processo eco-compatibile, efficace e scalabile.

Il progetto si configura così come un esempio virtuoso di economia circolare applicata all'agroindustria, con ricadute scientifiche, ambientali e industriali di rilievo.

5. Referenze

1. Chedea, V. S.; Macovei, Ștefan O.; Bocsan, I. C.; Măgureanu, D. C.; Levai, A. M.; Buzoianu, A. D.; Pop, R. M. Grape Pomace Polyphenols as a Source of Compounds for Management of Oxidative Stress and Inflammation—A Possible Alternative for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs? *Molecules* **2022**, *27*.
2. Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M. Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2019**, *54*, 933–942.
3. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 391–398.
4. Paixão, N.; Perestrelo, R.; Marques, J. C.; Câmara, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* **2007**, *105*, 204–214.
5. Nikolić-Milojević, N. L.; Mošić, I. S.; Karabegović, I. T.; Lazić, M. L.; Nikolić, N. Č.; Perić, S. R.; Golubović, S. S.; Davidović, D. N.; Veličković, D. T. Influence of the Time of Maceration on Phenolic Composition of Wines Produced from the Indigenous Variety Prokupac. *Biol. Nyssana* **2020**, *11*.
6. Alencar, N. M. M.; Cazarin, C. B. B.; Corrêa, L. C.; Maróstica Junior, M. R.; Biasoto, A. C. T.; Behrens, J. H. Influence of maceration time on phenolic compounds and antioxidant activity of the Syrah must and wine. *J. Food Biochem.* **2018**, *42*, e12471.
7. Flamini, R.; Mattivi, F.; De Rosso, M.; Arapitsas, P.; Bavaresco, L. Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *Vol. 14, Pages 19651-19669* **2013**, *14*, 19651–19669.
8. Wasilewski, T.; Hordyjewicz-Baran, Z.; Zarębska, M.; Stanek, N.; Zajszy-Turko, E.; Tomaka, M.; Bujak, T.; Nizioł-Iukaszewska, Z. Sustainable Green Processing of Grape Pomace Using Micellar Extraction for the Production of Value-Added Hygiene Cosmetics. *Molecules* **2022**, *27*.
9. Wittenauer, J.; MäcKle, S.; Sußmann, D.; Schweiggert-Weisz, U.; Carle, R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia* **2015**, *101*, 179–187.
10. Shi, J.; Yu, J.; Pohorly, J. E.; Kakuda, Y. Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and

Functionality. *J. Med. Food* **2003**, *6*, 291–299.

11. Singh, V. K.; Sahoo, D.; Agrahari, K.; Khan, A.; Mukhopadhyay, P.; Chanda, D.; Yadav, N. P. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-psoriatic potential of apigenin in RAW 264.7 cells, HaCaT cells and psoriasis like dermatitis in BALB/c mice. *Life Sci.* **2023**, *328*, 121909.

12. Jin, Y.; Yao, G.; Wang, Y.; Teng, L.; Wang, Y.; Chen, H.; Gao, R.; Lin, W.; Wang, Z.; Chen, J. MiR-30c-5p mediates inflammatory responses and promotes microglia survival by targeting eIF2 α during *Cryptococcus neoformans* infection. *Microb. Pathog.* **2020**, *141*, 103959.

13. Zhou, Y.; Chen, C.; Li, Q.; Sheng, H.; Guo, X.; Mao, E. NORAD modulates miR-30c-5p-LDHA to protect lung endothelial cells damage. *Open Med.* **2022**, *17*, 676.

14. Carbon, S.; Douglass, E.; Dunn, N.; Good, B.; Harris, N. L.; Lewis, S. E.; Mungall, C. J.; Basu, S.; Chisholm, R. L.; Dodson, R. J.; et al. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D330–D338.

15. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Sato, Y.; Morishima, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D353–D361.

16. Pietrzak, A.; Chabros, P.; Grywalska, E.; Pietrzak, D.; Kandzierski, G.; Wawrzycki, B.; Roliński, J.; Gawęda, K.; Krasowska, D. Serum concentration of interleukin 6 is related to inflammation and dyslipidemia in patients with psoriasis. *Adv. Dermatology Allergol. Dermatologii i Alergol.* **2020**, *37*, 41.

17. Cohen, T.; Nahari, D.; Cerem, L. W.; Neufeld, G.; Levin, B. Z. Interleukin 6 Induces the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 736–741.

18. Braile, M.; Cristinziano, L.; Marcella, S.; Varricchi, G.; Marone, G.; Modestino, L.; Ferrara, A. L.; De Ciuceis, A.; Scala, S.; Galdiero, M. R.; et al. LPS-mediated neutrophil VEGF-A release is modulated by cannabinoid receptor activation. *J. Leukoc. Biol.* **2021**, *109*, 621–631.

19. Mannerström, M.; Toimela, T.; Sarkanen, J. R.; Heinonen, T. Human BJ Fibroblasts is an Alternative to Mouse BALB/c 3T3 Cells in In Vitro Neutral Red Uptake Assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *121*, 109–115.

20. Stockham, K.; Sheard, A.; Paimin, R.; Buddhadasa, S.; Duong, S.; Orbell, J. D.; Murdoch, T. Comparative studies on the antioxidant properties and polyphenolic content of wine from different growing regions and vintages, a pilot study to investigate chemical markers for climate change. In *Food Chemistry*; Elsevier, 2013; Vol. 140, pp. 500–506.



21. Almanza-Oliveros, A.; Bautista-Hernández, I.; Castro-López, C.; Aguilar-Zárate, P.; Meza-Carranco, Z.; Rojas, R.; Michel, M. R.; Martínez-Ávila, G. C. G. Grape Pomace—Advances in Its Bioactivity, Health Benefits, and Food Applications. *Foods* 2024, Vol. 13, Page 580 **2024**, 13, 580.
22. Decendit, A.; Mamani-Matsuda, M.; Aumont, V.; Waffo-Teguo, P.; Moynet, D.; Boniface, K.; Richard, E.; Krisa, S.; Rambert, J.; Mérillon, J. M.; et al. Malvidin-3-O- β glucoside, major grape anthocyanin, inhibits human macrophage-derived inflammatory mediators and decreases clinical scores in arthritic rats. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, 86, 1461–1467.
23. Xu, Y.; Ke, H.; Li, Y.; Xie, L.; Su, H.; Xie, J.; Mo, J.; Chen, W. Malvidin-3-O-Glucoside from Blueberry Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Transcription Factor EB-Mediated Lysosomal Function and Activating the Nrf2/ARE Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, 69, 4663–4673.
24. Hu, W. N.; Duan, Z. Y.; Wang, Q.; Zhou, D. H. The suppression of ox-LDL-induced inflammatory response and apoptosis of HUVEC by lncRNA XIAT knockdown via regulating miR-30c-5p/PTEN axis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, 23, 7628–7638.
25. Hu, J.; Lin, F.; Yin, Y.; Shang, Y.; Xiao, Z.; Xu, W. Adipocyte-derived exosomal miR-30c-5p promotes ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome via the SOCS3/STAT3/VEGFA pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2023**, 230, 106278.
26. Mellor, L. F.; Gago-Lopez, N.; Bakiri, L.; Schmidt, F. N.; Busse, B.; Rauber, S.; Jimenez, M.; Megías, D.; Oterino-Sogo, S.; Sanchez-Prieto, R.; et al. Keratinocyte-derived S100A9 modulates neutrophil infiltration and affects psoriasis-like skin and joint disease. *Ann. Rheum. Dis.* **2022**, 81, 1400–1408.
27. Murphy, M.; Kerr, P.; Grant-Kels, J. M. The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin. Dermatol.* **2007**, 25, 524–528.