



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

# FLORE

## Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

### Usi multifunzionali di Urtica Dioica L

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

*Original Citation:*

Usi multifunzionali di Urtica Dioica L / Laura Bacci; Sara Di Lonardo; Francesca Ieri; Patrizia Pinelli; Annalisa Romani; Arianna Scardigli. - STAMPA. - (2014), pp. 111-142. [10.4399/978885487229511]

*Availability:*

This version is available at: 2158/938937 since: 2015-12-14T15:37:04Z

*Publisher:*

ARACNE

*Published version:*

DOI: 10.4399/978885487229511

*Terms of use:*

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

*Publisher copyright claim:*

(Article begins on next page)

## CAPITOLO 1

### **USI MULTIFUNZIONALI DI *URTICA DIOICA* L.**

Patrizia Pinelli, Arianna Scardigli, Annalisa Romani  
Laboratorio PHYTO LAB  
POLO SCIENTIFICO E TECNOLOGICO  
DiSIA (Dipartimento di Statistica, Informatica, Applicazioni)  
Università degli Studi di Firenze

Sara Di Lonardo, Laura Bacci  
CNR-IBIMET (Consiglio Nazionale delle Ricerche-Istituto di  
Biometeorologia) via Caproni, 8 - 50145 Firenze

#### **1. INTRODUZIONE**

L'attuale contesto economico-sociale, caratterizzato da crisi energetiche, impatti ambientali che si traducono anche in danni sulla salute umana, eccedenze del settore agricolo dovute ad un aumento delle produzioni e ad una stabilizzazione dei consumi, ha rivalutato enormemente la multifunzionalità dell'agricoltura. In questo contesto, le sostanze vegetali dovranno essere sempre di più impiegate come fonti rinnovabili per produrre merci ed energia, in alcuni casi anche mediante la riscoperta di usi tradizionali, già conclamati nel passato ma valorizzati attraverso l'utilizzo di nuove tecnologie e metodologie, individuando nuove potenzialità produttive attraverso ricerca e innovazione.

L'obiettivo di questa ricerca sulla specie *Urtica dioica* L. consiste nel dimostrare come da questa pianta sia possibile mettere a punto un processo produttivo di sfruttamento multifunzionale. In particolare, sarà di seguito illustrato come sia possibile ricavare fibra naturale, quale materia prima da destinare a produzione tessile e, al tempo stesso, recuperare un prodotto di scarto a base acquosa (derivante dal processo di macerazione acquosa per l'ottenimento della fibra) dal quale ottenere sostanze bioattive, antiossidanti e antiradicaliche, con le quali produrre estratti standardizzati per i settori fitoterapico e cosmetico. Particolare attenzione sarà inoltre rivolta all'impiego dell'ortica in campo alimentare, considerando anche settori innovativi, quali i *novel food* e gli alimenti funzionali.

L'ortica (*Urtica dioica* L.) è una pianta perenne ampiamente distribuita in tutte le regioni temperate, contenente fibre sclerenchimatiche nel fusto. È una specie vegetale tra le più interessanti, per la quale è possibile pensare alla realizzazione di una filiera completa, dalla coltivazione alla lavorazione, data l'ecosostenibilità della coltivazione (non utilizzo di diserbanti e fitofarmaci), della durata della coltivazione (fino a 4-5 anni), delle caratteristiche peculiari della fibra d'interesse tessile (produzione di nuovi materiali tessili di alta qualità) e degli importanti utilizzi dei "sottoprodotti" della coltivazione (ad esempio le foglie per il settore fitoterapico e cosmetico). Oltre a vantaggi commerciali, la coltivazione dell'ortica può generare effetti ambientali positivi: l'aumento della biodiversità nell'agricoltura tradizionale; la riduzione dell'erosione dei suoli, essendo una pianta perenne; il recupero di terreni con carico azotato eccessivo, poiché è una specie nitrofila; la possibilità di coltivare la terra non sfruttata di molte aziende che sorgono nelle aree rurali più problematiche, come ad esempio quelle appenniniche, in cui la superficie agricola utilizzata è tra le più basse in regione. Inoltre, l'ortica è resistente a malattie e ad altri infestanti (essendo essa stessa una pianta

infestante) e quindi non ha bisogno dell'impiego di fitofarmaci (coltivazione a basso *input* energetico); inoltre, può ospitare più di 40 specie di insetti, alcuni dei quali, come l'Ammiraglio Rosso (*Vanessa atalanta* L.) e la larva di Piccolo Guscio di Tartaruga (*Nymphalis* o *Aglais urticae* L.), dipendono interamente da questa pianta per la loro sopravvivenza.

In realtà, l'ortica è una delle specie medicinali più anticamente conosciute ed usate. Si ipotizza che fin dall'età della pietra potessero addirittura esistere delle coltivazioni soprattutto per uso alimentare sia umano che animale. Per quanto riguarda il suo utilizzo nel settore tessile, fin dall'antichità era impiegata soprattutto la specie *Urtica dioica* per fare lacci, tessuti e perfino per fabbricare la carta. In Europa centrale le fibre dell'ortica, molto simili al lino (*Linum usitatissimum* L.) ed alla canapa (*Cannabis sativa* L.), furono usate per la produzione tessile prima dell'introduzione del cotone (*Gossypium* spp.). In Danimarca è stato trovato del tessuto di ortica che avvolgeva una salma in un sepolcro risalente all'Età del Bronzo e l'uso delle fibre di ortica è documentato da Nestorius fin dal 900 a.C. Una delle notizie più interessanti è che migliaia di uniformi usate dall'armata di Napoleone erano tessute in ortica. Tuttavia, in Europa una produzione vera e propria iniziò solo nel XX secolo quando, durante la Prima e la Seconda Guerra Mondiale, l'ortica fu utilizzata per sostituire il filato di cotone divenuto introvabile. Intorno al 1940 in Germania e Austria erano coltivati circa 500 ettari di terreno con ortica dioica per uso tessile. A partire dalla metà degli anni '90 la ricerca di fibre "alternative" al cotone a basso impatto ambientale ha determinato un nuovo interesse per l'ortica in quanto, soprattutto in Germania, Austria e Finlandia, sono stati svolti progetti di ricerca sugli aspetti agronomici e sui metodi e processi tecnici per l'estrazione della fibra da destinare al settore tessile. Presso alcuni istituti di ricerca, come ad esempio l'Università di Amburgo, sono conservati alcuni cloni selezionati negli anni '50 a partire da piante madri di ortica spontanea con elevati contenuti in fibra. L'interesse è sottolineato dal fatto che la fibra di ortica ha alta resistenza alla trazione (maggiore di quella del cotone anche se rispetto a questa è meno elastica), finezza, basso peso specifico; inoltre, la struttura cava permette di accumulare aria all'interno creando un isolamento termico naturale (ha buone caratteristiche traspiranti e termoregolatrici) e consentendo perciò la produzione di prodotti tessili di qualità.

## **2. PARTE SPERIMENTALE**

### *2.1 Estrazione della fibra*

Sono state effettuate diversi tipi di estrazione al fine di determinare in via preliminare il miglior metodo di estrazione della fibra per uso tessile. Di seguito vengono riportati i metodi di estrazione utilizzati.

#### *2.1.1 Estrazione della fibra mediante macerazione in acqua*

Le prime prove per l'estrazione della fibra sono state effettuate mediante macerazione in acqua, processo adatto alle regioni dell'Europa meridionale come l'Italia dove le condizioni climatiche non si prestano alla pratica macerativa in campo: le temperature troppo alte porterebbero, infatti, all'insediamento di funghi saprofiti deturpanti mentre l'azione

macerativa sarebbe scarsa a causa della bassa umidità. In ogni prova circa 4 kg di steli sono stati messi a macerare in una vasca da 300 litri riempita di acqua, mantenuta a circa 30°C mediante due riscaldatori immersi nella vasca. Questa temperatura dell'acqua ha permesso di accelerare il processo di macerazione (circa 2,5 giorni), cioè sia il distacco della porzione corticale dalla parte legnosa sia, in parte, la separazione delle fibre tra di loro. Il materiale così macerato è stato poi messo ad essiccare in stufa a 60-70°C in modo tale da permetterne la conservazione e da evitare l'insediamento di funghi. Circa 40 litri di acqua di macerazione sono stati poi analizzati al fine di caratterizzare chimicamente le possibili sostanze fenoliche ad attività antiossidante ed antiradicalica.

### *2.1.2 Estrazione della fibra mediante estrazione microbiologica controllata con vari tipi di ceppi batterici*

Sono anche state effettuate delle prove di macerazione microbiologica controllata, una macerazione in acqua che prevede l'inoculo di ceppi selezionati di batteri degradatori i quali sciolgono le sostanze pectiche che tengono uniti i fasci fibrosi agli altri tessuti. Questo consente in particolare la riduzione dei tempi di macerazione, il miglioramento della qualità della fibra e l'ottenimento di un prodotto di qualità costante. Sono stati utilizzati ceppi batterici aerobi ed anaerobi con grande capacità pectinolitica e bassa attività cellulolitica, chiamati rispettivamente ROO40B (*Bacillus* sp.) e L 1/6 (*Clostridium* sp.), isolati dal laboratorio di microbiologia del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica "Leo Pardi" (Università degli Studi di Firenze) dalle vasche di macerazione della canapa (Tamburini et al. 2003). L'inoculo prevedeva la presenza di circa  $10^4$  spore di ROO40B e L 1/6 per litro di acqua, come già previsto per le sperimentazioni precedenti effettuate per altre piante da fibra come la canapa (Di Candilo et al. 2000; Tamburini et al. 2003).

Allo scopo di isolare organismi autoctoni dell'ortica che potessero permettere una macerazione più veloce o di avere una fibra di miglior qualità se inoculati nuovamente nelle vasche, sono stati prelevati campioni di acqua per l'analisi microbiologica. Gli isolamenti sono stati eseguiti su terreno solido piastrandolo 100  $\mu$ L di diluizioni  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) in almeno un duplicato ottenendo così circa 50 piastre. I ceppi aerobi sono stati fatti crescere su un terreno massimo (estratto di lievito allo 0.5%, peptone allo 0.5%, bacto-triptone all'1%) sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 121°C ed 1 atm e sono stati incubati a 37°C per 24 ore: per quanto riguarda i ceppi anaerobi, essi sono stati isolati sul terreno Reinforced Clostridial Agar e sono stati mantenuti in condizioni di anaerobiosi a 37°C per una settimana. Tolate le piastre dalla stufa, sono state individuate colonie diverse per morfologia e sono poi state descritte per aspetto, forma, bordo e sezione mediante l'uso di uno stereo microscopio: sono state così individuate circa 20 colonie di aerobi e circa 25 di anaerobi, tutte diverse fenotipicamente e selezionate dopo aver effettuato il saggio per valutare la loro attività pectinolitica e cellulolitica seguendo il procedimento effettuato da Tamburini et al. (2003). Tramite questa procedura, è stato individuato un ceppo anaerobio ad elevata attività pectinolitica (13/A) che è stato utilizzato per effettuare prove in vasca al fine di valutare l'effettiva capacità macerativa. Le altre prove di macerazione hanno quindi previsto l'uso dei ceppi batterici come segue, mantenendo le stesse condizioni già descritte per la macerazione in acqua (acqua di macerazione a 30°C):

- ceppo anaerobio L 1/6,
- ceppo aerobio ROO40B e ceppo anaerobio L 1/6,
- ceppo aerobio ROO40B,
- ceppo aerobio ROO40B,

- ceppo anaerobio 13/A e ceppo anaerobio 13/A.

### *2.1.3 Estrazione della fibra mediante bioenzimi*

L'estrazione enzimatica prevede per ora solo l'uso di fibra già estratta con altri metodi (meccanicamente, in acqua, microbiologicamente, chimicamente). Sono state utilizzate due miscele enzimatiche commerciali, Pectinex Ultra SP-L (Sigma Aldrich, Milano) e Viscozyme L (Sigma Aldrich, Milano), ed una soluzione (350 ml/10 g di fibra) contenente un buffer sodio acetato 0,05 M (pH 5,0). Pectinex Ultra SP-L (Sigma Aldrich, Milano) e Viscozyme L (Sigma Aldrich, Milano) sono stati scelti in base alle loro caratteristiche in quanto contengono enzimi che degradano pectine ed emicellulose. Le due miscele enzimatiche sono state utilizzate sia da sole che con l'aggiunta di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) per verificare se aumentava l'efficienza enzimatica, come già dimostrato nelle prove effettuate per la fibra di lino (Henriksson et al. 1997).

Nella prima prova (Tratt. enzim. 1) sono stati effettuati questi cinque trattamenti:

- Controllo; buffer acetato e fibra (350 mL/10 g di fibra);
- Pectinex; buffer acetato e Pectinex (0,1 g di soluzione/10 g di fibra);
- Pectinex + EDTA; buffer acetato, EDTA 0,05 M e Pectinex (0,1 g di soluzione/10 g di fibra);
- Viscozyme; buffer acetato e Viscozyme (0,1 g di soluzione/10 g di fibra);
- Viscozyme + EDTA; buffer acetato, EDTA 0,05 M e Viscozyme (0,1 g di soluzione/10 g di fibra).

Dopo 24 ore a temperatura ambiente (20°C) in continua agitazione, la fibra è stata prelevata ed è stata sciacquata in acqua bidistillata per quattro volte; successivamente è stata fatta asciugare rapidamente in stufa a circa 50°C per 24 ore.

La seconda prova (Tratt. enzim. 2) è stata simile alla prima in quanto i trattamenti effettuati sono stati gli stessi ma il tempo di permanenza della fibra nelle soluzioni è stato di 48 ore.

Nella terza prova (Tratt. enzim. 3) il tempo di permanenza della fibra in soluzione è stato di 48 ore ma dopo 24 ore c'è stata un'aggiunta di 0,1 g di soluzione enzimatica nei trattamenti effettuati con l'enzima.

### *2.1.4 Valutazione delle caratteristiche morfologiche (diametro e lunghezza) e meccaniche (tenacità ed allungamento)*

Il diametro e la lunghezza delle fibre sono stati acquisiti utilizzando uno stereo microscopio (57X); le relative immagini che sono state, successivamente, esaminate mediante un programma di elaborazione delle immagini. La tenacità delle fibre estratte è stata determinata mediante un dinamometro Instron 4301-CRE in base agli standard UNI EN ISO 5079-98. L'allungamento delle fibre rappresenta la variazione percentuale della lunghezza delle fibre secondo la seguente equazione:

$$\text{Allungamento (\%)} = (L1 - L) \times 100$$

dove L è la lunghezza della fibra quando non è allungata e L1 è la massima lunghezza raggiunta dalla fibra prima che si rompa.

## *2.2 Estrazione ed analisi qualitativa delle sostanze fenoliche mediante HPLC/DAD/ESI/MS*

Sono stati analizzati campioni di ortica Clone 13 e spontanea, secchi e freschi. Per l'analisi del materiale vegetale fresco sono stati pesati 2,0 g di foglie di ortica, immersi quindi in azoto liquido per 20 minuti e tritati in polvere fine. Ciascun campione è stato estratto con una soluzione idroalcolica, EtOH/H<sub>2</sub>O per HCOOH a pH 3,2. Le analisi sono state effettuate in triplicato.

I composti fenolici sono stati analizzati utilizzando una colonna Polaris E RP18 (5 mm) 4,6×250 mm (Varian, Germany) che opera a 27±0,5 °C. Gli eluenti impiegati sono stati H<sub>2</sub>O (pH 3,2 per HCOOH)/CH<sub>3</sub>CN. È stato applicato un gradiente lineare a quattro rampe, flusso 0,8 mL/min, per 55 minuti (Pinelli et al. 2008).

### *2.3 Analisi quantitativa HPLC/DAD*

I composti polifenolici presenti negli estratti analizzati sono stati quantificati con l'impiego di specifiche curve di calibrazione HPLC/DAD, costruite con sostanze standard di riferimento a più livelli di concentrazione, andando a monitorare il dato alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento. In particolare: gli acidi caffeici sono stati calibrati a 330 nm usando acido clorogenico come standard; i derivati dell'acido *p*-cumarico sono stati calibrati a 315 nm usando acido *p*-cumarico come sostanza di riferimento; i composti flavonoidici sono stati calibrati rispettivamente con rutina e kaempferolo-3-*O*-rutinoside a 350 nm.

### *2.4 Ottenimento di estratti acquosi mediante estrattore pneumatico TIMATIC*

Dalle foglie di ortica sono stati preparati estratti acquosi a caldo mediante estrattore pneumatico industriale TIMATIC (Tecnolab, Spello - PG), in alcuni casi previa macerazione in acqua a temperatura ambiente per 12 ore. Sono stati estratti quantitativi pari a 20-30 Kg di foglie. Le condizioni di estrazione sono state le seguenti: carico di acqua: 200 L (compresa quella di lavaggio, circa 20 L); T(°C) dell'acqua 85–87; numero di cicli di lavorazione; 5. Ogni singolo ciclo è composto da due sottocicli: uno in compressione ed uno in decompressione, della durata ciascuno di 8 minuti, per un totale quindi di 80 minuti di lavorazione. Potenza massima assorbita; 500 Watt. Pressione di esercizio; 7 bar.

Le soluzioni concentrate e le paste sono state ottenute mediante concentrazione con evaporatore industriale a pompa di calore.

### *2.5 Attività antiradicalica degli estratti mediante test DPPH*

È stata valutata mediante test con radicale stabile DPPH·(difetil-picril-idrazil), facendo reagire in rapporto 1:1 soluzioni opportunamente diluite dei campioni in esame con una soluzione 0,25 mg/mL di DPPH· e misurando l'assorbanza a 517 nm per 20 min ad intervalli di 2 min. L'attività antiradicalica percentuale (AAR%) è stata calcolata misurando l'assorbanza del radicale a 517 nm al tempo 0 (A<sub>0</sub>) e dopo 20 minuti (A<sub>20</sub>) dall'aggiunta dell'estratto di ortica, secondo la seguente formula:

$$AAR\% = (A_0 - A_{20}) / A_0$$

L'attività antiradicalica degli estratti è espressa anche come EC<sub>50</sub> (concentrazione dell'estratto in grado di ridurre del 50% l'attività del radicale stabile).

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Estrazione della fibra destinata al settore tessile e valutazione delle proprietà morfologiche e meccaniche

La qualità della fibra è stata valutata in base alle caratteristiche morfologiche (diametro e lunghezza) e meccaniche (tenacità ed allungamento). I risultati delle analisi condotte su campioni di fibra di ortica sono riportate in Tabella 1 e 2. La lunghezza delle fibre è costante in tutti i trattamenti mentre varia molto il diametro tra i diversi campioni soprattutto tra i controlli ed i trattati. Infatti, i diametri delle fibre derivanti da macerazione microbiologica sono significativamente minori rispetto ai controlli (in Tabella 1 evidenziati in grigio) e, in generale, ai diametri delle fibre derivanti da tutti gli altri trattamenti. Il significativo assottigliamento del diametro delle fibre trattate microbiologicamente molto probabilmente è dovuto ad una migliore separazione delle fibre. Anche le fibre trattate con i bioenzimi mostrano una significativa riduzione del diametro rispetto alle fibre ottenute da macerazione in acqua, ma solamente se nel buffer acetato è stato inserito l'EDTA (Tabella 1). La riduzione del diametro delle fibre non determina, però, una riduzione statisticamente significativa della tenacità delle fibre stesse (Tabella 2).

**Tabella 1.** Lunghezza (cm) e diametro ( $\mu\text{m}$ ) di campioni di fibra di ortica (media  $\pm$  errore standard).

Campione	Lunghezza (cm)	Diametro ( $\mu\text{m}$ )
Estrazione in acqua e stigliatura meccanica 300 L	4.0 $\pm$ 0.4	39 $\pm$ 2
Controllo in vaso da 1 L	4,6 $\pm$ 0,8	37 $\pm$ 2
L 1/6 in vaso da 1 L	4,9 $\pm$ 0,6	29 $\pm$ 2
ROO40B in vaso da 1 L	4,8 $\pm$ 0,5	27 $\pm$ 4
L 1/6 + ROO40B in vaso da 1 L	5,2 $\pm$ 0,3	27 $\pm$ 3
Controllo vasca da 30 L	4,5 $\pm$ 0,4	39 $\pm$ 2
L 1/6 vasca da 30 L	5,1 $\pm$ 0,4	28 $\pm$ 3
ROO40B vasca da 30 L	4,7 $\pm$ 0,6	25 $\pm$ 1
L 1/6 + ROO40B vasca da 30 L	5,0 $\pm$ 0,5	27 $\pm$ 1
Tratt. enzim. 1 Controllo	4,4 $\pm$ 0,6	43 $\pm$ 4
Tratt. enzim. 1 Viscozyme	4,7 $\pm$ 0,5	32 $\pm$ 2
Tratt. enzim. 1 Viscozyme + EDTA	4,7 $\pm$ 0,4	28 $\pm$ 3
Tratt. enzim. 1 Pectinex	4,9 $\pm$ 0,3	39 $\pm$ 1
Tratt. enzim. 1 Pectinex + EDTA	4,6 $\pm$ 0,4	33 $\pm$ 2
Tratt. enzim. 2 Controllo	4,5 $\pm$ 0,6	41 $\pm$ 3
Tratt. enzim. 2 Viscozyme	4,4 $\pm$ 0,3	35 $\pm$ 1
Tratt. enzim. 2 Viscozyme + EDTA	4,8 $\pm$ 0,5	37 $\pm$ 2
Tratt. enzim. 2 Pectinex	4,9 $\pm$ 0,4	30 $\pm$ 1
Tratt. enzim. 2 Pectinex + EDTA	5,1 $\pm$ 0,4	33 $\pm$ 1

Tratt. enzim. 3 Controllo	4,4 ± 0,5	35 ± 4
Tratt. enzim. 3 Viscozyme	4,8 ± 0,3	35 ± 1
Tratt. enzim. 3 Viscozyme + EDTA	4,9 ± 0,3	31 ± 4
Tratt. enzim. 3 Pectinex	5,1 ± 0,4	34 ± 1
Tratt. enzim. 3 Pectinex + EDTA	4,8 ± 0,3	27 ± 2

**Tabella 2.** Tenacità (cN/dtex) ed allungamento (%) di campioni di fibra di ortica (media ± errore standard).

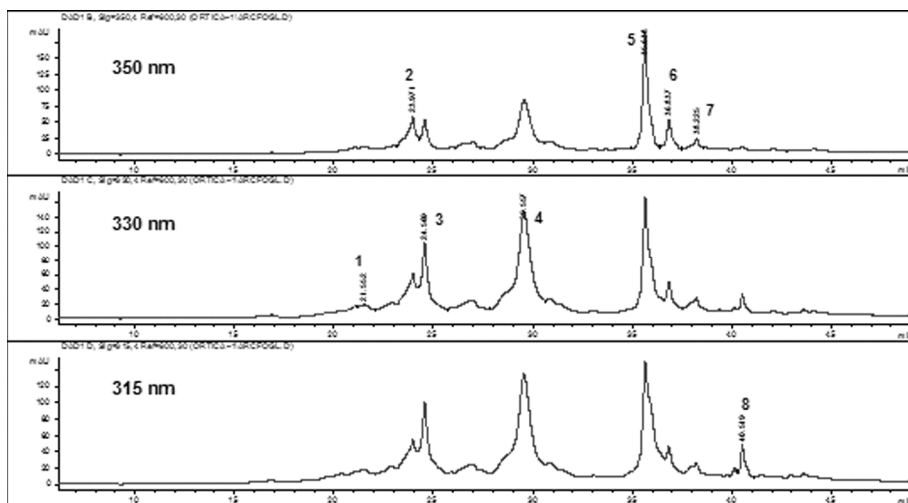
Campione	Tenacità (cN/dtex)	Allungamento (%)
Estrazione in acqua e stigliatura meccanica	4,61 ± 2,86	3,1 ± 0,8
Controllo vasca da 30 L	5,14 ± 4,30a	3,2 ± 0,9bcd
L 1/6 vasca da 30 L	4,86 ± 1,60a	3,4 ± 0,8bcd
ROO40B vasca da 30 L	4,48 ± 0,60a	3,4 ± 1,0bc
L 1/6 + ROO40B vasca da 30 L	4,25 ± 0,59a	2,6 ± 0,5b
Tratt. enzim. 1 Controllo	5,03 ± 1,43	3,6 ± 1,2
Tratt. enzim. 1 Viscozyme	4,66 ± 2,57a	4,1 ± 1,5cd
Tratt. enzim. 1 Viscozyme + EDTA	4,39 ± 1,17a	3,8 ± 0,7cd
Tratt. enzim. 1 Pectinex	4,05 ± 1,64a	3,6 ± 0,9cd
Tratt. enzim. 1 Pectinex + EDTA	5,89 ± 1,68a	4,9 ± 1,3ad
Tratt. enzim. 3 Controllo	5,11 ± 0,99	4,5 ± 1,0
Tratt. enzim. 3 Viscozyme	3,57 ± 0,93	3,8 ± 0,6
Tratt. enzim. 3 Viscozyme + EDTA	3,86 ± 0,92	4,3 ± 0,6
Tratt. enzim. 3 Pectinex	4,25 ± 1,05	3,8 ± 0,7
Tratt. enzim. 3 Pectinex + EDTA	4,13 ± 0,95	3,1 ± 0,8

### 3.2 Caratterizzazione di estratti di foglie di ortica

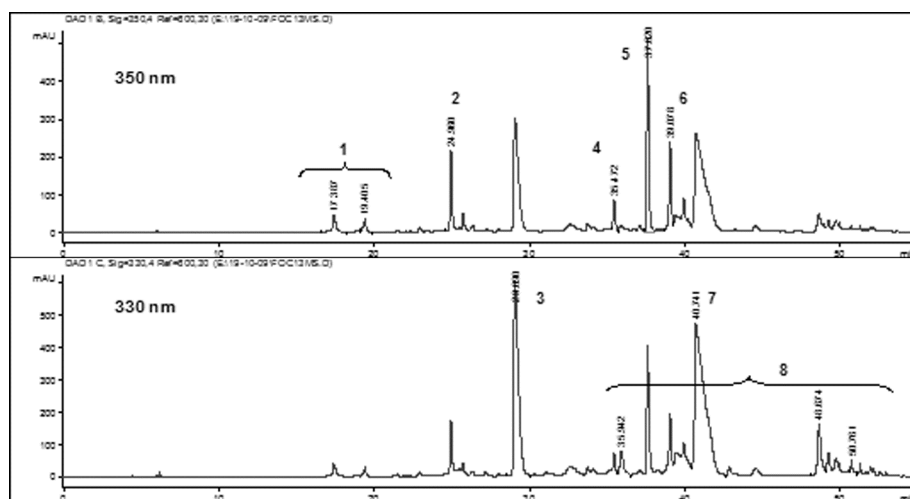
In Figura 1 ed in Figura 2 sono mostrati i profili cromatografici HPLC/DAD registrati a diverse lunghezze d'onda di estratti idroalcolici di foglie di ortica, sia spontanea raccolta in Toscana, che ortica da fibra (Clone 13) coltivata nel campo sperimentale di Iolo (Po).

In particolare, è riportata la lunghezza d'onda di 330 nm, massimo di assorbimento degli acidi idrossicinnamici, la lunghezza d'onda di 315 nm, massimo di assorbimento dei derivati dell'acido *p*-cumarico e la lunghezza d'onda di 350 nm, massimo di assorbimento dei composti flavonoidici. In legenda sono indicati i nomi dei composti polifenolici identificati.



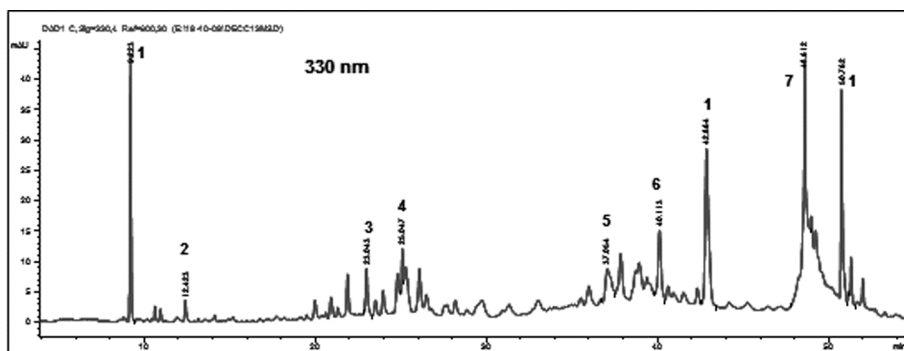


**Figura 1.** Analisi HPLC/DAD di un estratto idroalcolico di foglie fresche di ortica spontanea di Arcidosso. Composti identificati: 1. *Derivato ac. caffeico*; 2. *Quercetina derivato*; 3. *Ac. clorogenico*; 4. *Ac. 2-O-caffeoilmalico*; 5. *Rutina*; 6. *Quercetina 3-O-glucoside*; 7. *Kaempferolo 3-O-rutinoside*; 8. *Derivato ac. p-cumarico*.

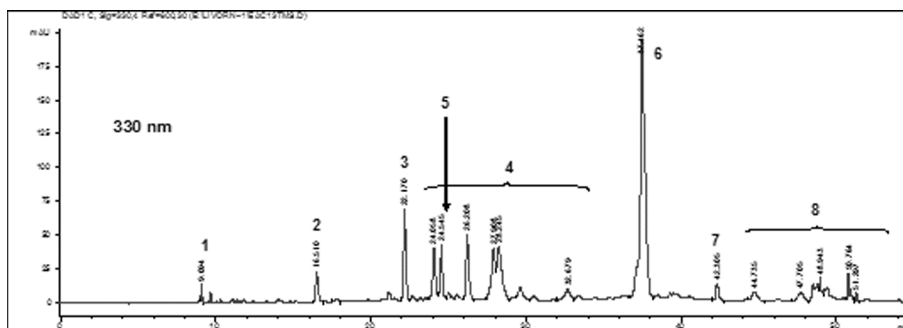


**Figura 2.** Analisi HPLC/DAD di un estratto idroalcolico di foglie fresche di ortica Clone 13 da pianta a completo sviluppo del fusto. Composti identificati: 1. *Derivati poliglucosilati della quercetina* ( $m/z$  761,  $m/z$  615); 2. *Quercetina diglucoside*; 3. *Ac. clorogenico*; 4. *Rutina*; 5. *Quercetina 3-O-glucoside*; 6. *Kaempferolo 3-O-rutinoside*; 7. *Ac. 2-O-caffeoilmalico*; 8. *Derivati ac.p-cumarico*.

In Figura 3 ed in Figura 4 sono mostrati i profili cromatografici di estratti acquosi ottenuti a caldo da foglie di ortica Clone 13, rispettivamente fresche ed essiccate. La legenda delle figure indica i nomi dei composti polifenolici identificati confrontando tempi di ritenzione e spettri UV-Vis con quelli delle sostanze usate come riferimenti.



**Figura 3.** Analisi HPLC/DAD di un estratto acquoso di foglie fresche di ortica Clone 13. Composti identificati: **1.** *Derivati fenolici* (calibrati come ac. *p*-cumarico); **2.** *Derivato quercetina*; **3.** *Ac. clorogenico*; **4.** *Quercetina diglucoside*; **5.** *Ac. p-cumarico*; **6,7.** *Derivati dell'acido p-cumarico*.



**Figura 4.** Analisi HPLC/DAD di un estratto acquoso ottenuto con TIMATIC di foglie essiccate di ortica Clone 13. Composti identificati: **1.** *Derivati fenolici* (calibrati come ac. *p*-cumarico); **2.** *Derivato ac. caffeico*; **3.** *Ac. clorogenico*; **4.** *Derivati mono-caffeoilchinici*; **5.** *Rutina*; **6.** *Ac.2-O-caffeoilmalico*; **7.** *Ac. p-cumarico* **8.** *Derivati Ac. p-cumarico*.

### 3.3 Analisi quantitativa HPLC/DAD/MS di ortica spontanea e da fibra (Clone 13)

Le analisi quali-quantitative HPLC/DAD/MS messe a punto su estratti di ortica Clone 13 sono state effettuate mediante l'impiego di specifiche curve di calibrazione HPLC/DAD costruite a più livelli di concentrazione tramite il monitoraggio del dato al massimo di assorbimento dello spettro UV-Vis utilizzando molecole standard di riferimento quali acido clorogenico, acido *p*-cumarico e rutina.

In Tabella 3 sono riportati i dati quantitativi delle diverse classi polifenoliche, valutati per estratti idroalcolici di foglie fresche ed essiccate di ortica Clone 13.

I dati quantitativi riportati per le classi polifenoliche presenti in estratti idroalcolici di foglie, fresche ed essiccate rispettivamente, sono tra loro confrontabili perché espressi come mg di polifenoli per g di tessuto fogliare essiccato. Dai dati riportati in Tabella 3 si evidenzia che il processo di essiccamento determina la degradazione del 75,7% dei composti flavonoidici (espressi come rutina) e del 47,6% dei derivati dell'acido caffeico. L'unica classe

di polifenoli che incrementa è quella riportata come derivati dell'acido *p*-cumarico che aumenta di 7,4 volte da campione fresco ad essiccato.

**Tabella 3.** Analisi quantitativa HPLC/DAD delle classi polifenoliche presenti in estratti idroalcolici di foglie fresche ed essiccate di Clone 13. I dati sono espressi in mg/g peso secco.

	<b>Foglie fresche</b>	<b>Foglie essiccate</b>
Ac. caffeico derivati	5,957	3,122
Ac. <i>p</i> -cumarico derivati	0,219	1,623
Flavonoidi	1,351	0,329
<b>Polifenoli totali</b>	<b>7,527</b>	<b>5,074</b>

In Tabella 4 sono riportati i dati quantitativi HPLC/DAD dei singoli composti polifenolici presenti nell'estratto di foglie fresche della pianta di ortica Clone 13 a completo sviluppo. I dati indicano che i derivati dell'acido caffeico sono rappresentati da acido clorogenico ed acido 2-*O*-caffeoil malico. I flavonoidi sono principalmente derivati della quercetina variamente sostituiti con zuccheri; in particolare sono stati evidenziati derivati della quercetina polisostituiti con glucosio, ramnosio e xilosio; tra i composti di natura flavonoidica è anche presente il kaempferolo 3-*O*-rutinoside.

**Tabella 4.** Analisi quantitativa HPLC/DAD dei singoli composti polifenolici presenti nell'estratto idroalcolico di foglie fresche di ortica Clone 13 a completo sviluppo del fusto. I dati sono espressi in mg/g peso fresco.

	<b>Foglie fresche</b>
Ac. clorogenico	0,803
Ac. 2- <i>O</i> -caffeoilmalico	1,592
Ac. <i>p</i> -cumarico derivati	0,144
Rutina	0,091
Quercetina poliglucoside	0,123
Quercetina diglucoside	0,320
Quercetina 3- <i>O</i> -glucoside	0,549
Kaempferolo 3- <i>O</i> -rutinoside	0,291
<b>Polifenoli totali</b>	<b>3,913</b>

Negli estratti acquosi ottenuti a caldo si evidenzia ancora la presenza di acido clorogenico, mentre non è presente il derivato 2-*O*-caffeoil malico. Tra i flavonoidi non è presente la rutina (quercetina 3-*O*-rutinoside) né il derivato del kaempferolo (kaempferolo 3-*O*-rutinoside), ma si evidenziano altri glicosidi della quercetina. La differenza più significativa rispetto all'estratto idroalcolico è che nell'estratto acquoso ottenuto a caldo sono presenti derivati fenolici ed altre sostanze fenoliche, probabilmente derivanti da processi di degradazione o di trasformazione dei metaboliti principali attribuibili ad un processo di estrazione che avviene a temperatura più elevata ed in ambiente acquoso e, quindi, anche in diverse condizioni di pH.

L'utilizzo di un solvente idroalcolico è più efficace nell'estrazione delle sostanze polifenoliche rispetto al solvente acquoso anche se impiegato a caldo, tuttavia risulta di scarso interesse per l'industria e per le eventuali applicazioni in campo alimentare dell'estratto acquoso. In questa ottica sono stati ottimizzati tempi e modalità dell'estrazione a caldo con acqua secondo quanto precedentemente riportato nella sezione "Parte Sperimentale-Ottenimento di estratti acquosi mediante estrattore industriale TIMATIC".

L'ortica che maggiormente trova impiego in campo alimentare è quella spontanea, in particolare le foglie apicali più tenere, quindi sono stati analizzati anche dei campioni di ortica spontanea raccolti in Toscana. Come già messo in evidenza in un estratto ottenuto da foglie di Clone 13, anche nel campione spontaneo trapiantato nel campo sperimentale di Iolo il principale derivato dell'acido caffeico è rappresentato dall'acido 2-*O*-caffeoilmalico insieme all'acido clorogenico; inoltre, i principali flavonoidi sono ancora derivati glicosidici della quercetina, in particolare la rutina e, in minore quantità, è presente il kaempferolo 3-*O*-rutinoside (vedi Tabella 5). I dati sono la media di campionamenti effettuati rispettivamente a Iolo (Po), Arcidosso (Gr) e Montegiovi (Gr). L'elevata variabilità nella concentrazione ma non nella composizione dei campioni è dovuta alla diversa area geografica di raccolta della specie spontanea.

**Tabella 5.** Analisi HPLC/DAD dei singoli composti polifenolici o delle sottoclassi presenti in estratti idroalcolici di foglie di ortica spontanea raccolta in diverse aree di campionamento in Toscana. I dati sono espressi in mg/g di peso fresco.

	<b>Ortica spontanea (foglie)</b>
Ac. caffeico derivati	1,153±0,887
Ac. <i>p</i> -cumarico derivati	0,084±0,043
Flavonoidi	0,624±0,665
<b>Polifenoli totali</b>	<b>1,868±1,507</b>

Le foglie fresche di ortica spontanea proveniente da Montegiovi (Gr), sottoposte ad un essiccamento naturale a T ambiente di circa dieci giorni sono state nuovamente analizzate mediante HPLC/DAD/MS. È stato ottenuto un estratto contenente lo 0.2% di polifenoli su peso delle foglie essiccate.

### 3.4 *Ortica ad uso alimentare*

Come precedentemente detto, l'ortica che trova maggiormente impiego in campo alimentare è quella spontanea, in particolare le foglie apicali più tenere ottimali per l'uso alimentare. Campioni di ortica spontanea sono quindi stati analizzati insieme e per confronto con quelli da fibra (Clone 13). Le foglie di ortica Clone 13 raccolte dal campo sperimentale di Iolo sono state sottoposte a processo di bollitura in laboratorio. In particolare, sono stati pesati 350 g di foglie fresche della parte apicale, portate successivamente ad ebollizione per 20 minuti in 5 litri di acqua ultrapura milliQ. Per ricavare la quantità di biomolecole antiossidanti rimaste nel liquido di bollitura, 1 L di tale acqua è stato sottoposto a liofilizzazione ottenendo 8,1 g di liofilo. Una quantità pesata di liofilo è stata quindi disciolta in acqua ed analizzata in HPLC/DAD, ottenendo un titolo in composti polifenolici pari al 5,3%.

Il residuo di foglie bollite, una volta spremuto dell'acqua di bollitura, è stato estratto con una miscela idroalcolica, analogamente a quanto già effettuato per le foglie fresche, in modo da verificare, nel materiale vegetale residuo del processo a caldo, la presenza residua di composti polifenolici che potrebbero eventualmente essere recuperati.

Nell'estratto di foglie bollite sono infatti ancora presenti derivati fenolici, riconducibili alle due classi di composti già evidenziate nel tessuto vegetale fresco: derivati dell'acido caffeico e flavonoidi. Tali composti sono stati quantificati secondo quanto descritto nella parte sperimentale ed il valore in polifenoli totali risulta pari  $1,216 \pm 0,73$  mg/g di materiale vegetale essiccato (circa 0,12% in peso).

Come complemento all'analisi del corredo polifenolico estraibile dalle foglie dopo bollitura, è stata analizzata l'acqua di bollitura stessa, da cui sono stati identificati ancora derivati caffeici e flavonoidi. È stata verificata la presenza di polifenoli variabili tra 0,763 mg/mL nell'acqua di bollitura delle foglie apicali non a completo sviluppo (0,76% p/V) e 3,816 mg/mL delle foglie basali a completo sviluppo (3,82% p/V).

Per il confronto tra il campione di ortica Clone 13 con piante spontanee raccolte in Toscana è stato scelto il campionamento di ortica effettuato presso Arcidosso (Gr). In particolare sono stati raccolti steli e foglie, quest'ultime ulteriormente classificate in foglie basali e foglie apicali, per poter evidenziare eventuali differenze nel corredo polifenolico in foglie a diversi stadi di sviluppo, considerando che le foglie basali sono foglie a completo sviluppo e le foglie apicali sono quelle di neo-formazione.

In Tabella 6 si riportano i dati quantitativi relativi ai derivati polifenolici presenti in estratti idroalcolici di foglie apicali e basali del campione raccolto ad Arcidosso. Le foglie apicali e basali, liofilizzate, hanno entrambe rivelato un contenuto d'acqua pari al 75%.

**Tabella 6.** Derivati polifenolici presenti nell'estratto di foglie apicali e basali fresche del campione di ortica spontanea raccolta ad Arcidosso (Gr). I dati quantitativi sono espressi in mg/g di peso secco. \* molecole in via di caratterizzazione.

	<b>Foglie apicali</b>	<b>Foglie basali</b>
Ac. caffeico derivati	1,055	1,018
Ac. gallico derivati*	0,590	0,475
Ac. <i>p</i> -cumarico derivati	0,134	-
Flavonoidi	-	-
Altri composti non flavonoidi	0,474	0,574
<b>Polifenoli totali</b>	<b>2,253</b>	<b>2,067</b>

Una volta caratterizzato il contenuto del materiale vegetale di partenza, le analisi per l'identificazione di metaboliti antiossidanti in estratti di ortica è proseguita effettuando la bollitura delle foglie raccolte ad Arcidosso, analogamente a quanto già descritto per ortica Clone 13. In particolare, sono state pesate 100 g di foglie apicali in 350 mL di acqua ultrapura MilliQ e 150 g di foglie basali in 550 mL di acqua MilliQ. Il processo di bollitura è stato condotto per 10 minuti. In questo modo, rispetto alle foglie di ortica Clone 13, è stato incrementato il rapporto p/V (peso del materiale vegetale/volume del solvente) ed è stato ridotto il tempo di bollitura per ottimizzare il processo verso il massimo contenuto di polifenoli allo scopo di minimizzare i fenomeni dovuti a degradazione termica delle molecole antiossidanti.

I polifenoli presenti nell'estratto di foglie bollite sono costituiti da un derivato dell'acido caffeico (acido clorogenico) e da altri derivati fenolici in via di caratterizzazione che

presentano un massimo di assorbimento nel range 310-330 nm e sono stati quantificati con una curva di calibrazione dell'acido clorogenico costruita a 330 nm. In Tabella 7 sono mostrati i risultati quantitativi dei derivati polifenolici presenti negli estratti idroalcolici delle foglie, apicali e basali, previamente sottoposte a bollitura. Tali foglie, dopo la liofilizzazione, hanno rivelato un contenuto d'acqua pari rispettivamente a 88,6% e 87,9%.

**Tabella 7.** Derivati polifenolici presenti negli estratti di foglie apicale e basali di ortica spontanea raccolta ad Arcidosso dopo processo di bollitura. I dati quantitativi sono espressi in mg/g di peso secco.

	<b>Foglie apicali dopo bollitura</b>	<b>Foglie basali dopo bollitura</b>
Ac. cinnamici derivati	0,650	1,107
Altri composti fenolici	0,360	0,562
<b>Totale</b>	<b>1,010</b>	<b>1,669</b>

Anche nel caso del campione di ortica spontanea, come complemento all'analisi del corredo polifenolico estraibile dalle foglie dopo bollitura, è stata analizzata l'acqua di bollitura stessa. Analogamente all'estratto delle foglie bollite anche nella relativa acqua di bollitura il profilo dei composti polifenolici è caratterizzato da derivati dell'acido caffeico e da altri derivati fenolici in corso di caratterizzazione. Per quanto attiene alla classe dei derivati dell'acido caffeico, la maggiore presenza di questi nell'acqua di bollitura rispetto al solo acido clorogenico presente nell'estratto delle foglie bollite, è attribuibile a processi di isomerizzazione in seguito a transesterificazione in ambiente acquoso a caldo. La concentrazione dei derivati polifenolici nell'acqua di bollitura di foglie apicali e basali sono rispettivamente 0,096 e 0,084 mg/mL, quindi concentrazioni molto più basse di quelle ottenute impiegando il Clone 13.

In Tabella 8 si riportano i dati quantitativi relativi alla resa in liofilo delle acque di bollitura di due campionamenti di ortica, Clone e spontaneo rispettivamente. I dati del liofilo sono espressi in g/L ed il contenuto in polifenoli totali è espresso in mg/g di liofilo.

**Tabella 8.** Resa in liofilo espressa in g/L e contenuto totale in polifenoli espresso in mg/g di liofilo delle acque di bollitura di ortica Clone 13 ed ortica spontanea raccolta ad Arcidosso (Gr).

	<b>Ortica Clone 13</b>	<b>Ortica spontanea</b>
Resa in liofilo (g/L)	29,45	19,26
Polifenoli Totali (mg/g di liofilo)	129,57	4,98

### *3.5 Processo di estrazione industriale di polifenoli da foglie di *Urtica dioica* L. mediante estrattore TIMATIC*

Obiettivo delle attività finora svolte è stato quello di poter monitorare le caratteristiche e le potenzialità di uso di foglie di ortica spontanea e di foglie di Clone 13 in campo fitoterapico ed alimentare, sia come tessuto vegetale sottoposto a bollitura, sia come possibile recupero di composti antiossidanti dall'acqua di bollitura stessa. Ulteriore sviluppo di questo obiettivo è stato quello di ottimizzare un processo di estrazione di antiossidanti polifenolici utilizzando

una tecnologia già impiegata per altre spezie e specie vegetali medicinali e che sfrutta un processo industriale di estrazione pneumatica a pressione (TIMATIC).

La multifunzionalità di questa specie vegetale consente infatti di realizzare un processo di sfruttamento e trattamento dei diversi tessuti vegetali (foglie e fusti) ai fini dell'ottenimento di estratti naturali da destinare al settore fitoterapico, alimentare funzionale e/o cosmetico.

In dettaglio, le foglie della pianta di ortica, inizialmente stoccate in appositi contenitori, vengono prelevate nella misura del 10-15% del peso dell'estratto acquoso che si intende ottenere per essere sottoposte alla fase di lavaggio. Successivamente le foglie possono essere sottoposte ad essiccazione o destinate fresche direttamente alla fase di triturazione in base al tipo di estratto che si intende ottenere. Nel caso dell'essiccazione, le foglie vengono sottoposte ad un processo che si basa sull'asportazione di umidità dalle matrici vegetali tramite circolazione di aria riscaldata in appositi armadi essiccanti, ad una temperatura di 60°C per 48h. Tale processo consente di evitare la degradazione dei principi antiossidanti e di preservare al meglio le caratteristiche organolettiche della matrice oggetto di estrazione.

Il materiale, fresco o essiccato, può essere caricato all'interno di una tramoggia e triturato attraverso l'azione di coltelli di pre-taglio e contro-coltelli calettati su disco ruotante, per poi raccogliere il materiale da destinare alla fase di estrazione. La fase di triturazione può essere effettuata per massimizzare l'efficienza estrattiva poiché la pezzatura fine del tessuto vegetale consente l'aumento della superficie di contatto con il solvente (H<sub>2</sub>O).

Il ciclo estrattivo, basato su un processo di estrazione solido-liquido, alterna una fase dinamica, ottenuta a pressione programmata, ad una fase statica necessaria per il trasferimento della sostanza estraibile in acqua, riscaldata parallelamente in un apposito contenitore a temperatura controllata mediante camicia ad olio o altro sistema a controllo termico (250 litri di acqua a 90°C per 5 ore). Durante la fase dinamica si genera una percolazione forzata con ricircolo del liquido estraente e nello stesso tempo viene evitata la formazione di canali preferenziali e sovra-saturazione del prodotto.

Tale tecnologia permette di incrementare la produttività estrattiva lasciando inalterate le caratteristiche qualitative ed organolettiche dei principi attivi, permette di utilizzare o sola acqua o miscele di liquidi (es. acqua/etanolo) in casi di necessità di coestrazione anche di sostanze poco idrosolubili o liposolubili.

Alla fine del ciclo, con controllo automatico della pressione nella camera di estrazione, il prodotto è premuto per ottenere la massima estrazione. La doppia azione di pistoni, spingendo il solvente nel materiale vegetale, genera un movimento di liquido nella camera di estrazione. L'impiego di tale tecnologia estrattiva si caratterizza per i seguenti requisiti:

- Rapidità di estrazione e costi di gestione ridotti;
- Produzione di estratti limpidi e pre-filtrati;
- Controllo delle fasi del trattamento con micro-processori;
- Semplicità di utilizzo, manutenzione e pulizia;
- Massima affidabilità ed alto rendimento dell'impianto;
- Flessibilità e riproducibilità costante delle varie estrazioni;
- Estrazione a temperatura controllata con ridotti consumi energetici;
- Caratteristiche organolettiche inalterate dei principi attivi estratti;
- Minima perdita di solvente durante le varie fasi.

L'utilizzo dell'estrattore pneumatico permette di ottenere soluzioni di biomolecole che potranno essere impiegate per la messa a punto di bevande funzionali arricchite in antiossidanti, bevande cosmetiche ed estratti concentrati utilizzabili nel settore fitoterapico e cosmetico.

Sono stati pesati 5,0 Kg di foglie essiccate di ortica Clone 13, quindi è stata effettuata un'estrazione con acqua mediante TIMATIC, seguendo il processo precedentemente descritto (ad esclusione della fase di triturazione).

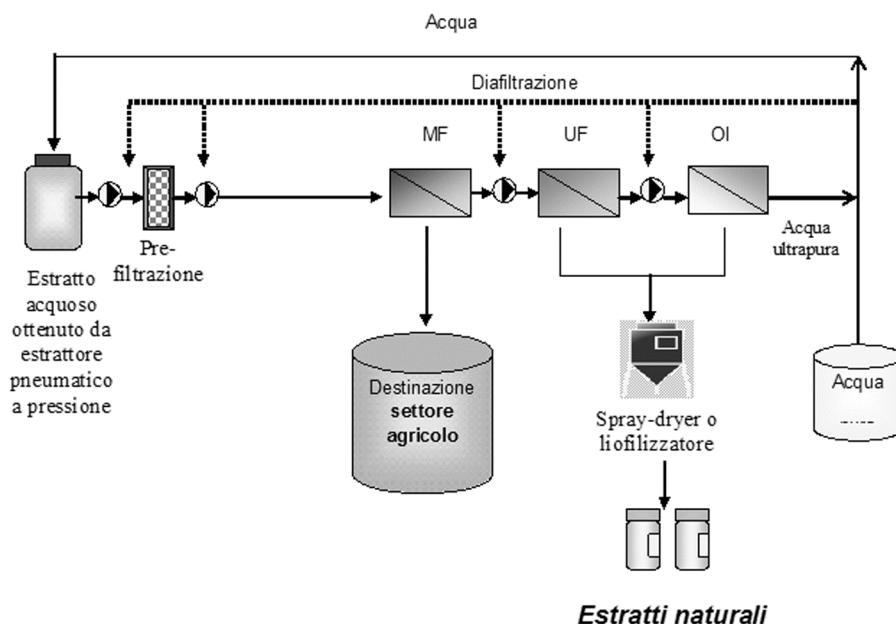
Una volta ottenuto l'estratto acquoso grezzo è possibile prevedere un'eventuale raffinazione degli estratti liquidi, sottoponendoli ad una fase di filtrazione su membrana/resina quale tecnologia di purificazione dell'estratto.

È stata precedentemente effettuata un'ottimizzazione del processo di raffinazione fondato sull'impiego di tecnologie separative mediante membrane già applicate per la produzione degli estratti da residui di carciofo, in particolare dalle foglie. Tale tecnologia, oggetto di registrazione di un brevetto internazionale per l'estrazione di principi attivi da scarti di Cynara (Pizzichini M., Romani A., Pizzichini D., Russo C., Pinelli P. "Process for producing refined nutraceutic extracts from artichoke waste and from other plants of the Cynara genus". Domanda di Brevetto Internazionale PCT/IT2008/000135 depositata il 01/04/08), consente di trattare estratti acquosi ottenuti dai sottoprodotti considerati, ed ottenere:

- direttamente estratti acquosi concentrati;
- estratti in polvere ad elevato contenuto in molecole biologicamente attive (da utilizzare nell'industria farmaceutica - comparto nutraceutico - ed in quella alimentare per prodotti innovativi, quali: paste speciali e/o sfarinati per prodotti da forno, etc.);
- acqua riutilizzabile nel processo stesso.

Tale impianto, con opportuni adattamenti di processo, è stato ottimizzato per il potenziale impiego di matrici vegetali di ortica ed estratti acquosi, sia da tessuto fogliare che scarti del settore tessile, in particolare l'estratto acquoso da foglie ottenuto attraverso estrazione pneumatica a pressione e le acque di macerazione ottenute dal processo di ottenimento della fibra tessile.

Lo schema complessivo del processo di frazionamento e purificazione delle frazioni ottenute è riportato di seguito in Figura 5.



**Figura 5.** Schema del Processo di Filtrazione su Membrana.



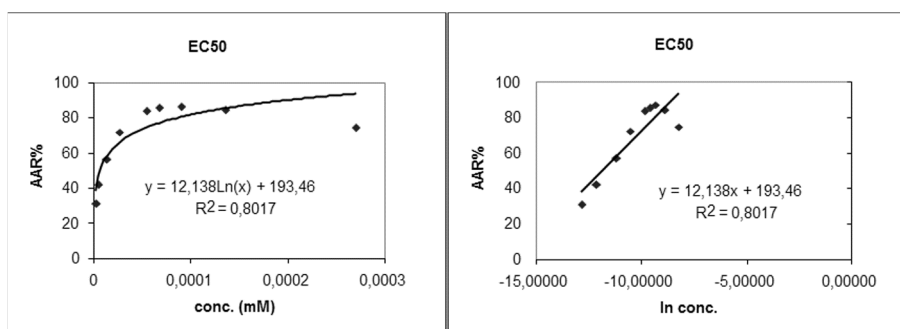
Sono in corso di studio la modulazione delle caratteristiche organolettiche delle bevande utilizzabili come integratori alimentari o come bevande cosmetiche ad elevate proprietà antiossidanti e l'ottenimento di estratti in polvere standardizzati, da usare quali semi-lavorati nel settore fitoterapico, cosmetico ed alimentare per la messa a punto di novel-food provenienti sia da tessuti vegetali di piante di ortica Clone 13 che di campioni spontanei.

### 3.6 Attività antiradicalica degli estratti di ortica

La percentuale di inibizione dell'attività radicalica valutata mediante l'impiego del test del radicale stabile DPPH è risultata pari a 55-88% per l'estratto di foglie fresche (spontaneo - Clone 13), 65% per l'estratto da foglie previamente sottoposte a bollitura (Clone 13), 28-49% per le acque di bollitura.

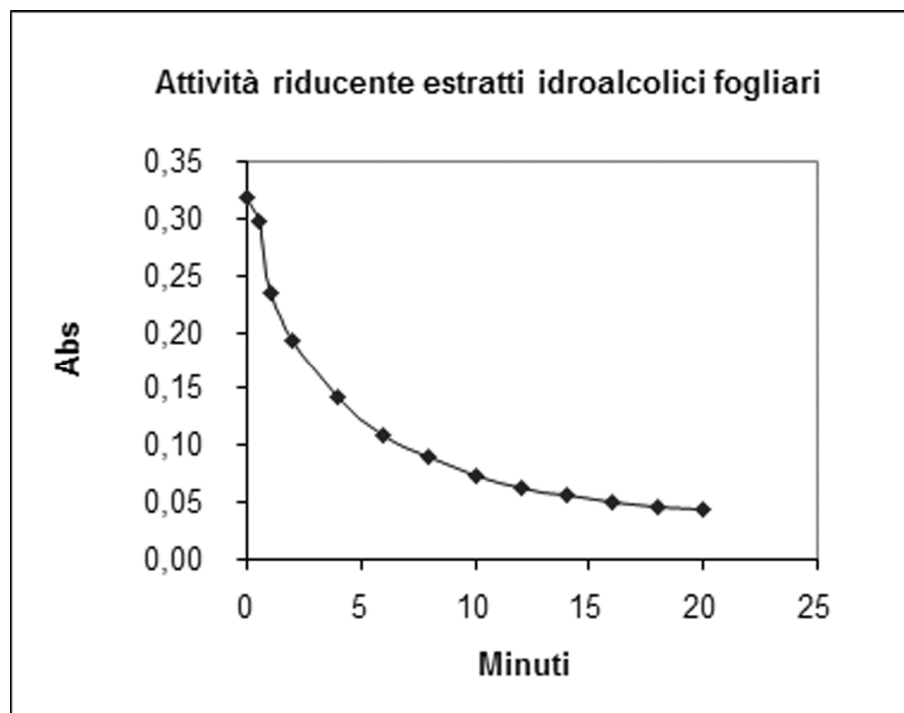
Ulteriori indagini sono state effettuate per determinare il valore di EC50 (concentrazione dell'estratto che inibisce il 50% del radicale) riferita all'attività antiradicalica mediante test DPPH, degli estratti idroalcolici di foglie fresche di Clone 13 e del campione di ortica spontanea di Arcidosso. A completamento di questa indagine è stata valutata anche la EC50 degli estratti provenienti da foglie sottoposte a decozione e delle relative acque di bollitura.

È stata infine misurata l'attività antiradicalica percentuale (AAR%) su estratti di ortica Clone 13 trapiantata a primavera 2007 e raccolta a luglio 2008 (TPF 07). Il valore di AAR% è stato inserito in un grafico contro i valori della concentrazione (espressa come mM) dell'estratto di ortica, ottenendo una curva logaritmica (Fig. 6). Trasformando il dato di concentrazione nel corrispondente logaritmo si ottiene una retta, dalla quale è possibile estrapolare il valore di EC50 dell'estratto. Nel caso del campione Clone 13 TPF 07 è stata evidenziata una EC50 pari a  $7,3627 \cdot 10^{-6}$  mM.



**Figura 6.** Curva logaritmica concentrazione-AAR% per l'estratto di foglie fresche Clone 13 (TPF 07).

Analogamente all'estratto idroalcolico di Clone 13 TPF 07, è stata monitorata l'attività antiradicalica dell'estratto idroalcolico da foglie di ortica Clone 13 TPF 06 (trapianto nel 2006, campionamento di luglio 2008), cioè sono state considerate piante di età differenziata (piante di due anni, rispetto al campione precedente costituito da piante di un anno). In Figura 7 è mostrata la cinetica dell'attività antiradicalica nell'estratto idroalcolico di Clone 13 TPF 06 diluito venti volte. Applicando la formula del test del DPPH si evidenzia che AAR% è pari a 86,25%.



**Figura 7.** Cinetica dell'attività antiradicalica ottenuta per l'estratto fogliare di Clone 13 TPF 06 diluito 1:20.

Anche per questo estratto sono stati acquisiti i valori di AAR% a diverse diluizioni, quindi a diverse concentrazioni di antiossidanti polifenolici. Tali valori sono stati inseriti in un grafico contro i valori della concentrazione (espressa come mM) dei polifenoli presenti nell'estratto di ortica, ottenendo una curva logaritmica. Trasformando il dato di concentrazione nel corrispondente logaritmo si ottiene una retta, dalla quale è possibile estrapolare il valore di EC50 dell'estratto. Nel caso del campione Clone 13 TPF 06 è stata evidenziata una EC50 pari a  $8,20052 \cdot 10^{-6}$  mM, quindi comparabile con quella ottenuta da estratti di piante di un anno ( $7,3627 \cdot 10^{-6}$  mM).

Il test del radicale stabile per il monitoraggio dell'attività antiossidante è stato applicato ad altri estratti fogliari di ortica, a diversa diluizione, allo scopo di verificare ripetibilità, sensibilità e robustezza del metodo, confrontando i risultati anche con alcuni dati riportati in letteratura relativi sia a standard puri che a fitocomplessi o estratti vegetali contenenti molecole di analoga natura.

I dati sopra riportati mostrano una interessante attività antiradicalica degli estratti fogliari di ortica. Informazioni di questo tipo, oltre a definire efficacia ed efficienza di estratti e fitocomplessi provenienti da foglie di ortica, possono essere utili informazioni da inserire in schede tecniche di semilavorati utilizzabili nel settore fitoterapico oltre a poter essere impiegati come dimostrazione delle proprietà funzionali di prodotti fitoterapici ed alimenti a base di foglie di ortica.

Tali risultati preliminari potranno essere in futuro utilizzati nell'ambito di un data-base per la valutazione di attività biologiche e funzionali di estratti e semilavorati per i settori *food*, fitoterapico e cosmetico.

#### 4. CONCLUSIONI

La presente ricerca ha permesso di ottimizzare una filiera analitica, di estrazione e purificazione della specie vegetale *Urtica dioica* L. di interesse alimentare, fitoterapico e tessile, al fine di caratterizzarla ed ottenere, da materie prime/secondo o scarti della sua lavorazione, estratti a titolo noto, caratterizzati da un punto di vista chimico, con particolare riguardo alle molecole di natura polifenolica ed alle relative proprietà ed attività biologiche.

Per la produzione di tessuti, le fibre floematiche dell'ortica devono essere separate dagli altri costituenti dello stelo, devono cioè essere processate in modo da ottenere fibra tessile di buona qualità. Affinché ciò avvenga, è necessario trovare dei metodi di estrazione efficienti ed allo stesso tempo economici per essere competitivi sul mercato. Le sperimentazioni effettuate confermano che i metodi utilizzati per il lino e la canapa possono essere adattati per produrre fibra dall'ortica. Il processo di macerazione è sicuramente importante per ottenere la fibra e non può essere soppresso. Per l'ortica, questo processo può essere ottimizzato mediante inoculo di ceppi autoctoni (macerazione microbiologica controllata), i quali demoliscono più efficientemente la sostanza cementante di natura pectica, anche se l'uso dei batteri non ha ridotto il tempo di macerazione rispetto all'impiego della sola acqua. Uno dei maggiori svantaggi è sicuramente il cattivo odore e lo smaltimento delle acque del macero che però potrebbero essere riutilizzate nell'agricoltura biologica, in una nuova macerazione o per l'estrazione di metaboliti di interesse fitoterapico. Raggiunto l'appropriato grado di macerazione e dopo la successiva asciugatura in stufa, gli steli possono poi essere sottoposti al processo di stigliatura. Dopo questo processo la qualità della fibra ottenuta è già abbastanza buona per la filatura. Anche l'uso di enzimi con un chelante come l'EDTA può essere una soluzione dopo la macerazione in acqua e la stigliatura meccanica, oppure la sola stigliatura meccanica di steli che però sono rimasti immagazzinati per un tempo sufficientemente lungo da garantire una buona essiccazione e, in qualche forma, l'instaurarsi di un processo di degradazione delle pectine. L'uso degli enzimi, però, determina un aumento dei costi che potrebbe essere assorbito solo se la fibra ottenuta risulta di qualità superiore. Per ora quindi la combinazione macerazione microbiologica controllata-stigliatura meccanica risulta la soluzione migliore per ottenere un'elevata resa in breve tempo. La diffusione della coltivazione di ortica per la produzione di fibra e la sua lavorazione è ancora estremamente limitata. Tuttavia ci sono alcune ditte che lavorano in collaborazione con istituti di ricerca per l'introduzione delle fibre di ortica nell'industria tessile. La ditta tedesca Stoffkontor Kranz AG ([www. Stoffkontor-ag.de](http://www.Stoffkontor-ag.de)) è la prima che ha iniziato a produrre su scala industriale, nel 2002, prodotti con fibre di ortica: ha una filiera chiusa all'interno dell'impresa, dalla coltivazione (50-100 ha di campi coltivati con ortica da fibra) fino all'ottenimento del capo finito con il marchio Nettle World. I tessuti attualmente disponibili sono misto ortica-cotone, con un contenuto in ortica variabile tra il 5 e il 10%.

Contestualmente all'attività svolta di macerazione acquosa per via naturale dell'ortica essiccata (per successiva estrazione della fibra tessile) è stata condotta una valutazione analitica della natura delle sostanze polifenoliche a scopo di caratterizzazione per gli impieghi nel settore salutistico e fitoterapico. Nell'ambito di queste ultime attività sono stati presi in considerazione tre possibili impieghi dell'ortica, alcuni dei quali decisamente innovativi per i settori industriali già citati derivanti da processi produttivi differenziati:

- Matrice vegetale triturrata (taglio tisana);
- Estratti in polvere ad elevato contenuto in molecole biologicamente attive (polifenoli), da utilizzare nell'industria farmaceutica - comparto nutraceutico - ed in quella

alimentare per prodotti innovativi, quali: paste speciali e/o sfarinati per prodotti da forno, etc.;

- Estratto acquoso concentrato da estrazione pneumatica a pressione controllata da tessuto vegetale essiccato di ortica da sottoporre ad eventuale filtrazione a membrana per l'ottenimento di bevanda funzionale.

La possibile registrazione di alimenti funzionali a partire dalle matrici di ortica (ed anche da scarti di altri cicli produttivi del settore agro-alimentare) può portare alla messa in commercio di prodotti ad uso salutistico a seguito di iter di verifica di sicurezza per la salute oppure, in relazione alla natura dell'alimento, secondo procedimento di notifica del prodotto. Il mercato degli alimenti funzionali è in costante crescita: per ciò che concerne ad esempio la specie *Urtica dioica* L., sulla base delle attività condotte e dei risultati ottenuti fino ad ora, emerge come, a partire da una matrice vegetale legata al territorio locale, sia possibile ottenere un processo a "ciclo chiuso" dal punto di vista della sostenibilità produttiva, economica ed ambientale. L'obiettivo è quello di poter definire filiere di produzione integrate e multifunzionali che possano valorizzare specie autoctone poco sfruttate, quali l'ortica ed altre specie officinali.

A tale scopo, si è previsto un approfondimento sulla valorizzazione ed utilizzazione di prodotti a base di ortica e prodotti di scarto a base acquosa derivanti da processi di sfruttamento della pianta stessa. Tra gli obiettivi c'è quello di dimensionare, a fini di implementazione, un impianto di estrazione di biocomponenti da acque di estrazione o scarto acquoso da macerazione di ortica e da tessuti vegetali, allo scopo di ottenere la produzione di bioestratti standardizzati a potenziale uso antiossidante, antiradicalico e antimicrobico, ottimizzando anche l'utilizzo di processi a membrana utili ad avere frazioni a diversa composizione. L'implementazione di procedure a garanzia della tracciabilità di filiera degli estratti naturali ottenuti da destinare, come ingredienti funzionali, ad uso food e ad uso fitoterapico, a seguito di iter di registrazione degli estratti presso il Ministero, faciliterà l'ottenimento della certificazione (di prodotto e di processo) di ingredienti funzionali e/o di prodotti alimentari innovativi a base di estratti e di tessuti vegetali di ortica, integrando anche studi LCA (*Life Cycle Assessment*). Lo scopo finale è quello di promuovere nuovi modelli di sfruttamento che siano il più possibile integrati dal punto di vista delle tecnologie, delle destinazioni di utilizzo e delle matrici di partenza, in modo da creare potenziali sinergie tra esigenze di sostenibilità ambientale, economiche e di valorizzazione territoriale.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1) DI CANDILO M, RANALLIP, BOZZI C, FOCHER B, MASTROMEI G. 2000. *Preliminary results of tests facing with the controller retting of hemp*. Industrial Crops and Products 11, 197-203.

2) HENRIKSSON G, AKIN DE, RIGSBY LL, PATEL N, ERIKSSON KEL. 1997. *Influence of chelating agents and mechanical pretreatment on enzymatic retting of flax*. Textile Research Journal 67, 829-836.

3) PINELLI P, IERI F, VIGNOLINI P, BACCI L, BARONTI S, ROMANI A. 2008. *Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of Urtica dioica L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 9127-9132.

4) TAMBURINI E, GORDILLO LÉON A, PERITO P, MASTROMEI G. 2003. *Characterization of bacterial pectinolytic strains involved in the water retting process*. Environmental Microbiology 5, 730-736.