



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXVIII

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

Studio di *Urtica dioica* come  
nuovo alimento funzionale

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/10

**Dottorando**

Dott. Bonetti Gianpiero

**Tutore**

Prof. Brandolini Vincenzo

Anni 2013/2015

# INDICE

	<i>Pagina</i>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Ortica</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1 Usi storici e moderni della pianta di Ortica</i>	4
<i>1.1.2 Aspetti terapeutici</i>	6
<i>1.1.3 Aspetti nutrizionali ed utilizzo alimentare</i>	12
<i>1.1.4 Microfiliera da piccola-media impresa</i>	15
<b>1.2 Metaboliti secondari di interesse nutraceutico</b>	<b>19</b>
<i>1.2.1 Composti fenolici</i>	19
<i>1.2.2 Carotenoidi</i>	26
<i>1.2.3 Biodisponibilità e Bioaccessibilità</i>	30
<b>1.3 Alimenti funzionali</b>	<b>35</b>
<b>2. SCOPO</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Analisi Bromatologiche</b>	<b>41</b>
<i>3.1.1 Determinazione del contenuto di umidità</i>	41
<i>3.1.2 Determinazione del contenuto proteico totale</i>	41
<i>3.1.3 Determinazione della frazione minerale totale</i>	41
<i>3.1.4 Determinazione del contenuto minerale specifico</i>	42

<b>3.2 Analisi sulla componente ad attività antiossidante</b>	<b>43</b>
3.2.1 Estrazione della frazione ad attività antiossidante	43
3.2.2 Determinazione del contenuto totale di polifenoli	45
3.2.3 Attività antiossidante nei confronti del radicale ABTS	45
3.2.4 Attività antiossidante nei confronti del radicale DPPH	47
3.2.5 Determinazione della capacità antiossidante nei confronti del radicale anione superossido – Metodo della Fotochemiluminescenza (Photochem®)	47
<b>3.3 Analisi cromatografiche</b>	<b>50</b>
3.3.1 Analisi dei composti fenolici in HPLC-UV e LC-ESI-MS	50
3.3.2 Analisi dei carotenoidi in HPLC-UV	51
<b>3.4 Studi di Bioaccessibilità e trasporto transepiteliale</b>	<b>54</b>
3.4.1 Modello gastrointestinale dinamico in vitro	54
3.4.2 Studio del trasporto transepiteliale mediante modello cellulare Caco-2 monolayer	57
3.4.3 Analisi HPLC	58
<b>3.5 Analisi Statistica</b>	<b>60</b>
<hr/>	
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>61</b>
<b>4.1 Caratterizzazione di Ortica spontanea</b>	<b>61</b>
4.1.1 Analisi bromatologica	62
4.1.2 Analisi sulla frazione ad attività antiossidante	65
<b>4.2 Studio di composti fenolici e carotenoidi in <i>Urtica dioica</i> coltivata</b>	<b>70</b>
4.2.1 Coltivazione in campo sperimentale	70
4.2.2 Analisi qualitativa e quantitativa dei composti fenolici	73

4.2.3 <i>Analisi qualitativa e quantitativa dei carotenoidi</i>	82
<b>4.3 L'ortica come ingrediente per pasta alimentare speciale</b>	<b>86</b>
4.3.1 <i>Apporto proteico, minerale e studio delle proprietà antiossidanti</i>	87
4.3.2 <i>Studio specifico dei composti fenolici e dei carotenoidi</i>	92
<b>4.4 Studi di bioaccessibilità e trasporto transepiteliale</b>	<b>101</b>
4.4.1 <i>Bioaccessibilità e trasporto transepiteliale di composti fenolici</i>	104
4.4.2 <i>Proprietà antiossidanti dei fluidi gastrointestinali simulati</i>	115
4.4.3 <i>Bioaccessibilità dei carotenoidi</i>	118
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>122</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>125</b>
<b>INDICE DELLE FIGURE</b>	<b>134</b>
<b>INDICE DELLE TABELLE</b>	<b>139</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>143</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Ortica

Con il termine Ortica si fa riferimento all'insieme di piante erbacee appartenenti al genere *Urtica* L., famiglia delle Urticaceae. All'interno del genere sono comprese piante annuali e perenni, monoiche oppure dioiche, comunemente caratterizzate dalla presenza di peli urticanti su fusto e foglie. Le foglie sono opposte, dentate, con stipole libere o accoppiate. I fiori sono unisessuali, piccoli, di colore verde, violaceo o giallastro e sono raggruppati in false spighe lungo il fusto <sup>[1]</sup>.

Il genere *Urtica* comprende circa 100 specie, distribuite nelle regioni temperate e tropicali in tutto il mondo. La specie maggiormente diffusa è la perenne *U. dioica* distribuita in Europa, Nord Africa, Asia, Nord e Sud America; a seguire sono particolarmente diffuse le specie annuali *U. urens*, *U. pilulifera* e *U. membranacea* <sup>[1]</sup>.

La tabella 1.1 riporta le principali specie presenti in Europa:

Specie	Distribuzione
<i>U. atrovirens</i>	Regione mediterranea occidentale
<i>U. cannabina</i>	Russia
<i>U. dioica</i>	Ubiquitaria
<i>U. dubia</i>	Area Mediterranea, in particolare Portogallo
<i>U. kioviensis</i>	Europa centro-orientale
<i>U. pilulifera</i>	Area Mediterranea
<i>U. rupestris</i>	Sicilia
<i>U. urens</i>	Ubiquitaria eccetto zone estremo Nord

Tabella 1.1

Specie del genere *Urtica* L. nel continente Europeo.

In particolare nel territorio italiano le specie di *Urtica* presenti sono <sup>[2]</sup>:

- *Urtica atrovirens* Req. ex Loisel., perenne, alta tra i 30 e i 90 cm, si trova in Sardegna e in Toscana;
- *Urtica dioica* L., comunemente chiamata ortica, perenne e alta fino a due metri, è la specie più diffusa e conosciuta;
- *Urtica pilulifera* L., detta anche ortica romana o ortica a campanelli, più diffusa nelle zone costiere, dai fiori tendenti al viola;
- *Urtica urens* L., o ortica minore, annuale, alta fino a 30 cm. Si incontra soprattutto al nord e nelle isole;
- *Urtica rupestris* Guss., endemica della Sicilia, è la più rara ed è stata rinvenuta in provincia di Siracusa.

### ***Urtica dioica* L.**

*U. dioica* o ortica comune è una specie decidua a ciclo perenne e a sessi separati. Le caratteristiche morfologiche sono variabili in conseguenza alle sottospecie. Come tutte le piante a grande diffusione, sono numerose le sottospecie, le varietà e gli ecotipi che formano la specie, gode di grande plasticità ecologica, con capacità di adattamento a condizioni ambientali molto varie <sup>[3-5]</sup>.

I rizomi sono lunghi, stoloniferi, ramificati e striscianti poco al di sotto della superficie del suolo, provvisti di numerose radichette. Da essi si dipartono fusti robusti, eretti e striati a sezione quadrangolare, verdi o porporini, che portano la pianta a raggiungere dimensioni che vanno dai 30 ai 180 cm, anche se ve ne sono che superano i 2 m di altezza.

Le foglie sono semplici e opposte, assai più lunghe che larghe. Le loro dimensioni variano dai 5 ai 10 cm. Di forma ellittica lanceolata, hanno base cuoriforme ed apice che si restringe in un dente acuto, dal margine finemente dentato, inciso da denti spesso arcuati a falce e portate da un picciolo, più corto del lembo fogliare. La superficie fogliare è rugosa, il lato superiore è di colore verde scuro vibrante, mentre quello inferiore è di un verde più chiaro, con venature ben visibili.



Figura 1.1  
*Urtica dioica*.

Gli irti tricomi unicellulari sono presenti su tutta la superficie della foglia e soprattutto lungo le nervature. Sono peli semplici corti mescolati a peli lunghi e rigidi, arrivando a raggiungere i 70mm di lunghezza [3,5].

I minuti e imperfetti fiori verdastri sono riuniti in infiorescenze allungate panicolate peduncolate, della lunghezza maggiore rispetto al relativo peduncolo. Esse sono inserite all'ascella delle foglie superiori. I fiori maschili e femminili si trovano in piante distinte, riconoscibili alla fioritura: i fiori maschili sono riuniti in spighe erette, quelli femminili in spighe pendule.

Il frutto è un achenio ovale, con un ciuffo di peli all'apice, racchiuso tra quattro tepali persistenti, contenente un solo seme. I semi sono presenti dalla fine di agosto ai primi di settembre.

La pianta può propagarsi tramite seme o per divisione vegetativa [3].

### 1.1.1 Usi storici e moderni della pianta di Ortica

I più antichi riferimenti sull'utilizzo dell'ortica risalgono all'Età del Bronzo (3000-2000 a.C.). Si possono raggruppare gli utilizzi storici della pianta di ortica in usi medici ed usi non-medici.

#### *Usi medicinali*

I primi riferimenti sull'uso della pianta di ortica risalgono agli antichi Egizi, dove l'infuso di ortica era utilizzato nel trattamento dei dolori di natura artritica. Ai tempi degli antichi Greci risalgono indicazioni sull'applicazione topica di estratto di radice di ortica contro emorragie nasali, mentre le foglie erano prescritte per disturbi gastrointestinali e come diuretici [1].

Nel secondo secolo d.C., Galeno nell'opera *De Simplicibus*, raccomanda le foglie di ortica per i seguenti usi: diuretico e lassativo, applicazioni topiche contro ferite, gonfiori, emorragie nasali e piaghe boccali, malattie legate alla milza, trattamento di pleuriti, asma [6].

Nei secoli successivi si ritrovano altri usi della pianta di ortica. I semi erano indicati contro i dolori di stomaco. Le foglie indicate come afrodisiache ed antiemorragiche, utilizzate nel trattamento delle ferite e in caso di disturbi renali. L'urticazione topica era indicata in caso di reumatismi, paralisi e nel trattamento di tifo e colera [6].

I principali utilizzi interni e topici della pianta di ortica a fini medicinali risultano riguardo al trattamento di: anemia, reumatismi, artriti, eczemi, asma, disfunzioni renali e gastriche, infezioni cutanee, uso topico contro emorragie ed emorroidi [1].

Gli utilizzi moderni dell'ortica supportati da evidenze scientifiche sono limitati al trattamento di artriti, reumatismi, riniti allergiche e nella profilassi dell'ipertrofia prostatica benigna. L'estratto di foglie è efficace nel trattamento interno di riniti allergiche ed artriti reumatoidi [7]. Uno studio evidenzia l'attività antinfiammatoria dose dipendente dell'estratto di semi di *U. pilulifera* sui ratti, comparata con indometacina [8].

Per la profilassi dell'ipertrofia prostatica benigna (IPB) è utilizzato l'estratto idroalcolico dalle radici, di cui diversi studi ne dimostrano l'efficacia nel miglioramento dei sintomi legati alla patologia, sia in utilizzo isolato sia in associazione a farmaci (es: prazosina) o altri estratti vegetali [9-11].

#### *Usi non medicinali*

Tra gli usi a scopi non medicinali l'ortica è conosciuta ed impiegata da secoli a fini alimentari, già al tempo di Greci e Romani, ed attualmente trova utilizzo in ambito alimentare soprattutto in Italia, Turchia e Svezia [1,12].

In particolare l'ortica è una pianta alimurgica, cioè fa parte di quelle piante spontanee utilizzate come alimenti in caso di necessità, ad esempio durante periodi di guerra e carestia. Le cime più giovani e delicate sono usate, dopo una rapida sbollentatura che ne elimina il carattere urticante, al pari degli ortaggi a foglia verde. Da esse si preparano passati, zuppe, ripieni e minestre. Si possono utilizzare anche le foglie secche, ridotte in polvere ed asperse su passati e minestre oppure utilizzate per infusi e tisane. Sono considerate una valida alternativa agli spinaci, ma dal sapore più delicato e dalle note leggermente amare. E' un ottimo colorante per paste verdi, gnocchi e quant'altro voglia avere una funzione al contempo decorativa e gastronomica. Da essa si possono ricavare anche estratti liquidi per bevande.

Fin dall'antichità, soprattutto la specie *U. dioica*, è stata usata per fabbricare lacci, corde, tessuti. In Europa centrale le fibre dell'ortica, dalle caratteristiche molto simili al lino (*Linum usitatissimum* L.) e alla canapa (*Cannabis sativa* L.), furono usate per la produzione tessile prima dell'introduzione del cotone (*Gossypium* sp.). In Scozia l'ortica è stata coltivata a tal scopo <sup>[11]</sup>. In Europa, una produzione vera e propria iniziò solo nel XX secolo quando, durante la prima e la seconda Guerra mondiale, l'ortica sostituì il cotone divenuto introvabile <sup>[13]</sup>.

Dall'ortica, ricca di clorofilla, si può ricavare un colorante naturale verde. La clorofilla può essere usata per la colorazione di bevande, alimenti e profumi. Le clorofille naturali possono essere impiegate come additivi liposolubili negli alimenti, in prodotti farmaceutici e cosmetici. Raramente possono essere usate direttamente perché enzimi vegetali causano modificazioni chimiche delle clorofille durante le fasi di estrazione, promuovendo processi di degradazione che portano ad un colore marrone verde. Queste problematiche rendono i costi di produzione elevati, limitando una più vasta applicazione su larga scala come coloranti naturali.

In campo agricolo è usata soprattutto nell'agricoltura biodinamica come anticrittogamico e come disinfestante per roseti nell'agricoltura biologica. Può essere usata come mangime per animali perché le foglie sono ricche di azoto, calcio e magnesio. In periodi di scarso foraggio, ad esempio durante le guerre mondiali, le foglie venivano date a cavalli e maiali. Aggiungendo l'ortica nel mangime è possibile incrementare l'apporto vitaminico del 60-70% e quello proteico del 15%-20%, inoltre riduce la necessità di foraggio fresco del 30% <sup>[4]</sup>.

In commercio si trovano shampoo per migliorare la salute e stimolare la crescita dei capelli, per controllare la forfora e per restituire la brillantezza naturale dei capelli. Comuni anche lozioni detergenti per la pelle grassa e per il trattamento di eczema. Possono essere utilizzati a scopo cosmetico gli estratti liquidi raffinati dalle foglie <sup>[1,4]</sup>.

### 1.1.2 Aspetti terapeutici

Sia le parti aeree sia le radici sono usate a scopo terapeutico per trattare disturbi diversi. La pianta è utilizzabile dalla primavera all'autunno, mentre la radice solo in fine estate, quando è ben profonda e robusta.

#### Proprietà delle foglie di ortica

L'impiego terapeutico dei prodotti a base di ortica a scopo antinfiammatorio, il più antico e popolare, è stato finora quello supportato dal maggior numero di evidenze scientifiche e studi clinici, nonostante vi sia la necessità di ulteriori approfondimenti. L'attività antinfiammatoria può essere associata con l'uso clinico delle foglie di ortica nel trattamento dei dolori artritici e delle riniti allergiche [5].

Tra gli utilizzi interni delle foglie di ortica il principale è come tonico nutrizionale. A questo scopo le foglie possono essere bollite ed utilizzate tal quali oppure come ingrediente per zuppe o decotti; in alternativa possono essere essiccate ed utilizzate in forma solida e dosabile (compresse e capsule). L'utilizzo come tonico-nutrizionale non è tuttavia supportato da studi clinici o farmacologici, al momento non è sufficientemente dimostrato e si basa fondamentalmente sul profilo dei costituenti della materia prima [5].

Le indicazioni mediche per le foglie di ortica supportate da trial clinici riguardano il trattamento sintomatico di artrite e di rinite allergica ed il suo impiego come diuretico. Tutte le altre azioni osservate: analgesica, anestetica locale, spasmodica, depressiva centrale, cardiovascolare, iperglicemica, sono state finora poco studiate in modo approfondito.

Indicazioni mediche supportate da trial clinici, studi *in vitro* e *in vivo*:

- Trattamento sintomatico di artrite e rinite allergica
  - Cinque studi clinici post-marketing, aperti e multicentrici per un totale 10.368 pazienti ambulatoriali sofferenti di artrite, artrosi o altre malattie reumatiche sono stati condotti con lo scopo di valutare l'efficacia e la sicurezza di un prodotto contenente un estratto idroalcolico di ortica; questi pazienti sono stati trattati per periodi di tempo varianti tra 3 settimane e 12 mesi con due dosi al giorno di 670 mg ciascuna di estratto. In tutti gli studi, parte dei pazienti ha continuato a ricevere la terapia antidolorifica abituale generalmente a base di antiinfiammatori non steroidei. Al termine del trattamento, complessivamente l'80-95% dei pazienti ha testimoniato di avere ricevuto un beneficio dall'estratto di ortica e il 93-95% di avere ben tollerato il trattamento [14].

- un ulteriore studio randomizzato in doppio cieco ha coinvolto 27 pazienti con dolori persistenti dovuti ad osteoartrosi al fine di valutare, nei confronti di un placebo, gli effetti di preparazioni ottenute dalle parti aeree non fiorite fresche di *Urtica dioica* e di *Lamium album* applicate topicamente una volta al giorno per 30 secondi alla parte del corpo dolorante; il trattamento è durato per 5 settimane per essere invertito dopo un periodo di wash-out di una settimana. Al termine dello studio è stata verificata una significativa riduzione dei sintomi nel gruppo trattato con l'ortica, mentre l'applicazione del *Lamium* non ha mostrato gli stessi benefici nell'alleviamento dei sintomi <sup>[14]</sup>.
  - L'estratto idroalcolico della droga ed i suoi principali costituenti fenolici sarebbero in grado di inibire in cellule della linea RBL-1 (granulociti basofili leucemici di ratto) la biosintesi dei metaboliti dell'acido arachidonico mediata dalla lipossigenasi; in particolare, l'acido caffeilmalico inibisce del 68,2% la formazione del leucotriene B4. Inoltre, l'estratto di acido caffeilmalico ha marcatamente e in maniera dipendente dalla concentrazione inibito la sintesi delle prostaglandine mediata dalle ciclossigenasi. In esperimenti *in vitro* di diverso tipo, il medesimo estratto inibisce nel sangue umano il rilascio stimolato dai liposaccaridi delle due citochine proinfiammatorie TNF $\alpha$  e IL-1. L'estratto acquoso ha inibito in cellule mononucleate di sangue umano periferico (PBMC) la produzione, stimolata dalla fitoemoagglutinina (PHA), di interleuchina-2 (IL-2) e di interferone- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) specifici dei linfociti Th-1; diversamente, la secrezione PHA-stimolata dell'interleuchina-4 (IL-4) specifica dei linfociti Th-2 è aumentata mentre quella dell'interleuchina-10 (IL-10) è diminuita; questi risultati suggeriscono che l'estratto delle parti aeree dell'ortica possa inibire la cascata infiammatoria nelle malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide <sup>[14]</sup>.
  - Uno studio randomizzato in doppio cieco ha dimostrato come il liofilizzato ottenuto dalle parti aeree è superiore al placebo nell'alleviare i sintomi della rinite allergica <sup>[15]</sup>.
  - L'estratto di *U. dioica* inibisce *in vitro* diversi fattori che causano i sintomi delle allergie stagionali: antagonismo e agonismo inverso del recettore istaminico H1, riduzione della formazione di prostaglandine attraverso inibizione di COX-1 e COX-2 <sup>[16]</sup>.
- Effetto diuretico
    - L'infusione venosa continua nel ratto anestetizzato di una soluzione salina di un estratto acquoso secco della droga è stata confrontata con l'infusione di una soluzione di furosemide. L'estratto di ortica ha provocato in maniera dipendente dalla

concentrazione un aumento della diuresi (+84% a 24 mg/kg/h) e della natriuresi (+143%); la furosemide (2 mg/kg/h) ha invece incrementato la diuresi dell'85% e la natriuresi del 155%. Gli effetti sulla diuresi di estratti acquosi ed etanolici della droga somministrati per via orale sono risultati nulli <sup>[17]</sup>.

- Nei preparati derivati dall'ortica, come nel decotto e nel succo, è stato dimostrato un effetto diuretico, natriuretico e uricosurico. All'aumento del flusso di urina è correlato un aumento nella concentrazione urinaria di potassio, sodio e cloro con conseguente riduzione dell'edema, del peso corporeo e della pressione <sup>[14]</sup>.

Indicazioni supportate da studi *in vivo* e/o *in vitro*, ma non da trial clinici

- Antiaggregante piastrinico. L'estratto acquoso di ortica *in vitro* inibisce l'aggregazione mediata dalla trombina in modo dose-dipendente del 17%. Questa percentuale aumenta negli estratti organici di ortica e più lipofilo è il solvente più il potere di inibizione aumenta (77% con estratto di etilacetato). L'attività è dovuta a flavonoidi. Studi su animali confermano l'attività dell'estratto delle foglie di ortica contro l'aggregazione piastrinica <sup>[18]</sup>.
- Capacità antiossidante e analgesica. L'attività antiossidante è stata dimostrata da numerosi studi *in vitro*: sia l'estratto acquoso sia quello etanolicano indicano una moderata azione radical scavenger in particolare dovuta alla frazione fenolica <sup>[19, 20]</sup>.
- Attività antimicrobica e antifungina. L'ortica possiede attività antibatterica evidente sia contro i batteri Gram-positivi sia Gram-negativi rispetto a composti antimicrobici tradizionali come il nitrato di miconazolo, amoxicillina e acido clavulanico, ofloxacina e metilmicina. È stata studiata anche l'attività antifungina degli estratti di ortica contro funghi patogeni <sup>[11,19]</sup>.
- Attività antiulcera. Sembra efficace contro l'ulcera etanolo-indotta ed avrebbe effetto analgesico sullo stress indotto dall'acido acetico. Si è evidenziata anche capacità selettiva di migliorare le secrezioni gastriche e di proteggere la mucosa <sup>[19]</sup>.
- Attività ipocolesterolemizzante. E' stato dimostrato come l'estratto alcolico di ortica migliori il profilo lipidico plasmatico in ratti obesi, diminuendo il contenuto di LDL e aumentando quello di HDL, mostrando una modesta capacità ipocolesterolemizzante <sup>[21]</sup>.

- Attività stimolante eritropoiesi. Studi su animali rivelano effetti benefici del succo d'ortica sull'eritropoiesi al pari di preparati a base di ferro, con un aumento di escrezione di porfirine (metaboliti della clorofilla), mostrando un probabile collegamento con la presenza di clorofilla [5].

#### *Indicazioni recenti*

Servono ulteriori approfondimenti per dimostrare la presunta attività antidiabetica delle foglie d'ortica. Finora *in vitro* sono state osservate attività ipoglicemiche, sia di decremento dell'assorbimento del glucosio intestinale attraverso l'inibizione delle glicosidasi intestinali sia di incremento dell'insulina sierica. Su animali invece le osservazioni riguardanti la concentrazione di glucosio e di insulina sono contrastanti. Di recente è stata riportata nel ratto un'attività ipoglicemica dell'estratto, la quale consiste in un incremento dell'insulina accompagnato da una riduzione dei livelli di glucosio nel sangue [5,22].

#### **Proprietà della radice di ortica**

L'estratto dalle radici di *U. dioica* inibisce significativamente l'ingrossamento della prostata ed il progredire della patologia ipertrofia prostatica benigna (IPB). Le parti aeree della pianta non hanno effetto sulla patologia prostatica [1].

La droga vegetale è costituita dai rizomi e dalle radici essiccate, che si caratterizzano per la presenza di fitosteroli ( $\beta$ -sitosterolo e relativi glucosidi) e scopoletina; discreta anche la presenza di tannini, lecitine, sali minerali, fenilpropani e lignani. I componenti idrofili di ortica, compresi lectine e polisaccaridi, sembrano essere importanti, soprattutto in malattie della prostata, anche se non si esclude l'importanza di costituenti idrofobici.

Gli estratti di radice hanno dimostrato in studi *in vitro*, *in vivo* ed in trial clinici di avere una buona attività nel trattamento dell'ipertrofia prostatica benigna (IPB) anche se i meccanismi d'azione non sono stati ancora del tutto chiariti.

Proprietà contro l'IPB supportate da trial clinici, studi *in vivo* e *in vitro*

- Un estratto di ortica (Bazoton® -uno) somministrato per 12 mesi, alle dosi di 459 mg/die, a pazienti affetti da ipertrofia prostatica benigna ha garantito il miglioramento dei sintomi associati (diminuzione dell'IPSS o International Prostatic Symptoms Score, di 5.7 punti,

contro i 4.7 punti del gruppo trattato con placebo). La qualità della vita ed i parametri dell'uroflussometria (Qmax, volume residuo dopo la minzione) sono risultati uguali con l'estratto di ortica e con il placebo [23].

- L'efficacia terapeutica dell'associazione di estratti di serenoa ed ortica (PRO 160/120) è stata comparata con quella della finasteride. Questo studio multicentrico, randomizzato in doppio cieco, ha coinvolto 543 pazienti con IPB in stadio precoce; dopo 24 settimane di trattamento i benefici ottenuti in termini di miglioramento dell'IPSS e del flusso massimo urinario non presentavano differenze statisticamente significative, mentre maggiore era l'incidenza di effetti avversi nel gruppo trattato con finasteride [24].

- *In vitro*, un estratto metanolico di radice di ortica ha inibito il legame delle SHBG (acronimo di Sex Hormone Binding Globulin) con i recettori solubilizzati di tessuto prostatico. Tale azione, ascritta ai lignani presenti nella droga, sarebbe di particolare beneficio per limitare la crescita del tessuto prostatico indotta dagli androgeni ed in particolare dal diidrotestosterone [14].

- *In vitro*, un estratto etanolico di radice di ortica ha inibito l'attività dell'aromatasi prostatica; tale effetto, aumentato dall'aggiunta di un estratto di *Serenoa repens*, diminuisce la conversione del testosterone in estrogeni, riequilibrando il rapporto androgeni/estrogeni (per l'instaurarsi dell'ipertrofia prostatica benigna occorre la presenza degli androgeni, anche se non sono necessariamente la causa diretta della patologia) [25].

- La frazione polisaccaridica mostra attività di tipo antinfiammatorio ed immunomodulante, con inibizione delle lipossigenasi e della ciclossigenasi (coinvolte nella produzione di citochine infiammatorie). L'estratto metanolico ha invece inibito la proliferazione cellulare in colture di tessuto prostatico prelevato da pazienti affetti da ipertrofia prostatica benigna [25].

- La molecola individuata come Urtica Dioica Agglutinina (UDA) inibisce il legame del fattore di crescita epidermica (EGF) ai recettori EGF in una coltura di cellule di tessuto prostatico umano. UDA antagonizza il recettore del fattore di crescita epidermico, un effetto che può essere di beneficio per interferire con la patogenesi di IPB. L'UDA induce un modello di attività dei linfociti T che non si riscontra in qualsiasi altra lectina di piante conosciute.

L'UDA sembra impedire nei topi lo sviluppo di una condizione di lupus eritematoso sistemico ed ha diversi effetti antivirali in vitro [25].

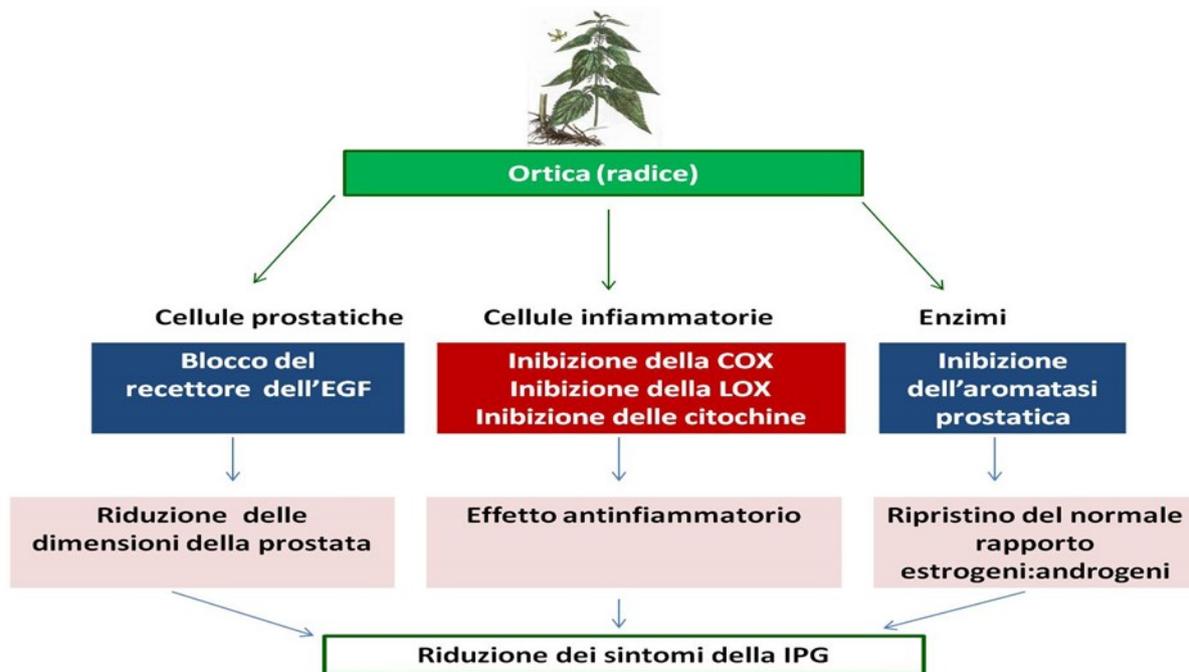


Figura 1.2

Schema ipotizzato per il meccanismo d'azione dell'estratto di radice di ortica nel trattamento dell'ipertrofia prostatica benigna.

Farmacologia e Meccanismo d'azione:

Considerate tutte le ricerche, i meccanismi proposti per spiegare gli effetti dell'ortica sono diversi. Alcuni lignani tipici della droga inibiscono il legame del testosterone alle proteine plasmatiche che lo trasportano; al momento questa azione sembra la più probabile nel determinare l'attività antiprostatica della droga vegetale [1].

Alcune lectine presenti nella radice inibiscono il metabolismo e la crescita prostatica attraverso il blocco del fattore di crescita dell'epidermide EGF al proprio recettore prostatico. Altri meccanismi ipotizzati includono un'azione antinfiammatoria che si esplica attraverso l'inibizione di tipici mediatori dell'infiammazione, quali prostaglandine, leucotrieni e citochine, nonché attraverso l'inibizione dell'elastasi leucocitaria umana, un enzima proteolitico coinvolto nelle infezioni del tratto genito-urinario e l'inibizione dell'aromatasi prostatica (enzima che converte il testosterone in estrogeni). In virtù di tale inibizione può essere ripristinato il normale rapporto di estrogeni/androgeni, che risulta elevato in pazienti affetti da IPB [1].

I composti steroidei stigmasterolo, stigmast-4-en-3-one, e campesterolo hanno dimostrato di inibire la pompa sodio potassio prostatica, che potrebbe contribuire agli effetti dell'ortica nell'IPB. La piccola quantità di  $\beta$ -sitosterolo nella radice di ortica (<0,01% della massa totale) è improbabile che abbia un effetto sull'IPB, visto che 60 mg/die di  $\beta$ -sitosterolo sarebbe la quantità usuale necessaria per ridurre i sintomi [18].

Efficacia clinica riconosciuta: la radice di ortica è utile per risolvere i problemi urinari associati agli stadi 1 e 2 della IPB. Come la serenoa (*Serenoa repens*) e il pigeo africano (*Pygeum africanum*) anche l'ortica allevia la sintomatologia, senza indurre una riduzione della dimensione della prostata [25].

### 1.1.3 Aspetti nutrizionali ed utilizzo alimentare

Il consumo dell'ortica a fini alimentari è radicato nel passato, già ai tempi degli antichi Greci. Attualmente è utilizzata a scopi alimentari soprattutto nella regione del Mar Nero in Turchia, in Finlandia ed in Italia. Le specie maggiormente utilizzate a scopi alimentari sono necessariamente quelle che presentano ampia diffusione geografica: *U. dioica*, *U. urens* ed *U. pilulifera* [1,12].

Le foglie di ortica sono ricche di vitamina C (20-60mg/100g di sostanza secca), vitamine del gruppo B e del gruppo K e di minerali come calcio, ferro, magnesio, fosforo e potassio. Tuttavia, una grossa variabilità nel contenuto di nutrienti può dipendere dal periodo di raccolta, dalle condizioni pedoclimatiche geografiche e dalle specie considerate. Notevole è il contenuto in clorofilla (0,08-0,3% in foglie fresche e 0,6-1% in foglie essiccate) [5,6].

La composizione bromatologico-nutrizionale dell'ortica è riportata in Tabella 1.2, fonte United States Department of Agriculture.

Rutto *et al.* [26] riportano i valori dietetici, le proprietà minerali e altre qualità dell'ortica fresca, sbollentata e cotta con o senza sale di campioni raccolti in primavera ed autunno. I campioni raccolti in primavera contenevano valori significativamente più elevati di nutrienti primari, minerali, aminoacidi e vitamine. Inoltre, l'operazione di sbollentatura della materia prima non provoca una perdita significativa di questi nutrienti. I risultati dimostrano che il trattamento di scottatura e cottura con o senza sale ha un impatto minimo sulla composizione di acidi grassi nell'*U. dioica*. Ciò implica che può essere una buona fonte di acidi grassi essenziali quando mangiata come un vegetale a foglia. *U. dioica* conserva una parte significativa di minerali, vitamine e sostanze nutritive essenziali dopo il trattamento preliminare di scottatura o cottura prima della congelazione.

Tabella valori nutrizionali per 100 g			
Proprietà	Valore	Unità	GDA %
Calorie	42.00	kcal	2000 2.1%
	175.00	kJ	
Grassi	0.11	g	70 0.2%
Carboidrati	7.49	g	270 2.8%
Proteine	2.71	g	50 5.4%
Fibre	6.90	g	25 27.6%
Zuccheri	0.25	g	90 0.3%
Acqua	87.67	g	
Ceneri	2.03	g	
<b>Minerali</b>			
Calcio	481.00	mg	800 60.1%
Sodio	4.00	mg	2400 0.2%
Fosforo	71.00	mg	800 8.9%
Potassio	334.00	mg	
Ferro	1.64	mg	14 11.7%
Magnesio	57.00	mg	300 0,19
Zinco	0.34	mg	10 3.4%
Rame	0.08	mg	1.2 6.7%
Manganese	0.78	mg	10 7.8%
Selenio	0.30	mcg	55 0.5%
<b>Vitamine</b>			
Betaina	21.40	mg	
Vitamina A, RAE	101.00	mcg_RAE	
Tiamina (Vit. B1)	0.01	mg	1.4 0.7%
Riboflavina (Vit. B2)	0.16	mg	1.6 0,1
Niacina (Vit. B3)	0.39	mg	18 2.2%
Piridossina (Vit. B6)	0.10	mg	2 0,05
Folati, totali	14.00	mcg	
Fillocchinone (Vit. K)	498.60	mcg	150 332.4%
Colina totale (Vit. J)	17.40	mg	
Carotene, beta	1150.00	mcg	
Carotene, alfa	114.00	mcg	
Luteina + zeaxantina	4178.00	mcg	
<b>Zuccheri</b>			
Destrosio	0.07	g	
Fruttosio	0.07	g	
Saccarosio	0.10	g	

Fonte: USDA

Tabella 1.2  
Composizione bromatologico-nutrizionale dell'ortica su 100 g di sostanza fresca.

Per quanto riguarda i singoli aminoacidi, *U. dioica* è ricca di aminoacidi essenziali tra cui treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, e lisina, mentre gli amminoacidi limitanti sono rappresentati da istidina e metionina: simile allo spinacio in termini qualitativi, *U. dioica* quantitativamente contiene livelli di amminoacidi essenziali più elevati, ad eccezione di leucina e lisina <sup>[1,26]</sup>.

Hughes *et al.* <sup>[27]</sup> hanno dimostrato che il contenuto totale proteico presenta il valore minore in Dicembre (20,9% su sostanza secca) ed aumenta regolarmente fino a raggiungere il picco in Aprile (36,0%). La composizione aminoacidica specifica è riportata in tabella 1.3 <sup>[27,28]</sup>.

<b>Amminoacido</b>	Wetherilt <i>et al.</i> [28]	Hughes <i>et al.</i> [27]
<b><i>Fenilalanina</i></b>	5,82	6,82
<b><i>Lisina</i></b>	5,53	13,88
<b><i>Treonina</i></b>	4,61	5,40
<b><i>Valina</i></b>	6,31	7,21
<b><i>Metionina</i></b>	1,76	0,87
<b><i>Cisteina</i></b>	0,85	
<b><i>Isoleucina</i></b>	4,78	4,91
<b><i>Leucina</i></b>	8,97	7,39
<b><i>Triptofano</i></b>	1,28	
<b><i>Istidina</i></b>	4,10	2,92
<b><i>Acido Aspartico</i></b>	9,07	10,78
<b><i>Serina</i></b>	6,19	4,61
<b><i>Acido Glutammico</i></b>	13,30	13,09
<b><i>Prolina</i></b>	4,87	4,83
<b><i>Glicina</i></b>	6,25	6,59
<b><i>Alanina</i></b>	6,54	6,67
<b><i>Tirosina</i></b>	3,87	4,03
<b><i>Arginina</i></b>	5,90	

Tabella 1.3

Composizione amminoacidica di foglie di ortica (g/100g idrolizzato proteico di foglie fresche).

Le foglie di ortiche sono ricche di metaboliti secondari di interesse nutraceutico, in particolare i composti fenolici ed i carotenoidi. I composti fenolici presenti si suddividono in fenoli semplici, i cui principali sono l'acido clorogenico e l'acido caffeilmalico, entrambi esteri dell'acido caffeico. Pinelli *et al.* [29] riportano che gli acidi clorogenico e caffeilmalico rappresentano più del 70% del contenuto totale fenolico in foglie di *U. dioica* coltivata e spontanea. Bucar *et al.* [30] hanno confermato questi risultati ed inoltre riportano l'assenza dell'acido caffeilmalico nelle foglie di *U. urens*.

Tra i composti fenolici sono presenti flavonoidi, principalmente kaempferolo, quercetina, isorhamnetina ed i rispettivi derivati 3-rutinosidi e 3-glucosidi. Il flavonoide patuletina è caratteristico delle foglie di *U. urens* [5,31].

L'accumulo di flavonoidi risulta comparabile delle forme maschili e femminile di *U. dioica*, mentre il contenuto di acidi fenolici risulta maggiore nelle piante maschili rispetto a quelli femminili che inoltre presentano un profilo di fenoli semplici maggiormente vario [32].

Le foglie di ortica sono inoltre ricche di carotenoidi, principalmente luteina e  $\beta$ -carotene [33].

Anche se l'uso di *U. dioica* come verdura a foglia è molto diffuso nella cucina tradizionale, ci sono poche informazioni su prodotti elaborati e sull'impatto dei diversi processi produttivi sui valori del prodotto finale. Sono necessari approfondimenti sul valore nutritivo dell'ortica fresca, sul destino dei minerali e dei composti bioattivi nei prodotti trasformati.

Lo studio del contenuto in vitamina C in foglie fresche e infuso di *U. dioica* indica come nelle foglie fresche questa sia presente 36mg su 100g, mentre nell'infuso il contenuto si abbassa significativamente a 0,4 mg su 100g [34].

Alla luce di quanto riportato la foglia di *U. dioica* viene considerata come un alimento altamente funzionale e nutritivo: il consumo di ortica fresca o derivati è consigliato per l'alto contenuto di proteine, il basso contenuto calorico e per l'essere fonte di nutrienti essenziali, minerali e vitamine in particolare nelle diete vegetariane, per diabetici, o altri regimi dietetici [26].

#### **1.1.4 Microfiliera da piccola-media impresa**

La maggior parte della materia prima (parti aeree e radici) utilizzata in prodotti a base di ortica attualmente in commercio deriva da piante spontanee. Tuttavia, la quantità di ortica coltivata è in costante aumento ed i principali produttori si trovano in Germania ed in alcuni paesi dell'ex Unione Sovietica [5].

La pianta di *U. dioica* si presta ad essere propagata per talea, utilizzando il metodo della micropropagazione, partendo da cloni selezionati che possono essere coltivati *in vitro* [4]. La riproduzione per via vegetativa è la migliore soluzione per ottenere un risultato produttivo accettabile: uno studio biennale ha messo in evidenza un aumento di tre volte delle resa in materia prima in seguito a trapianto rispetto alla semina diretta in campo [35].

L'impianto può avvenire utilizzando macchine per trapianto di orticole ad inizio primavera; se il clima non è particolarmente secco non è richiesto l'adacquamento. Il diserbo di tipo meccanico (erpicoltura) è necessario durante il primo anno di coltivazione, dopodiché la pianta prende vigore e domina autonomamente sulle eventuali infestanti. Essendo una pianta perenne

e nitrofila può necessitare di una fertilizzazione all'anno del terreno, da praticare in primavera, con apporto di sostanze azotate (es: 200Kg/ha di N come  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ). La durata di una coltivazione oscilla intorno agli 8-10 anni, ma dopo 4-5 anni le piante si indeboliscono e la produzione cala. La coltivazione di leguminose può essere utilizzata in rotazione in conseguenza dell'apporto di sostanze azotate al terreno [4].

Il tempo di raccolta della materia prima varia in funzione del tipo di impiego finale. La raccolta primaverile prima o durante la fase di fioritura è raccomandata per l'utilizzo delle foglie fresche oppure per la loro essiccazione finalizzata ai vari impieghi alimentari (es: foglie essiccate per infusi). Una volta che la pianta ha prodotto i semi perde rapidamente vitalità e le foglie appassiscono [5].

Dopo la raccolta, la materia prima può essere essiccata semplicemente in una zona ben ventilata, protetta dalla luce diretta del sole, ad una temperatura non superiore ai 35-40°C. L'essiccazione può essere condotta sugli steli raccolti ed al termine di essa le foglie possono essere facilmente rimosse. La rimozione delle foglie dagli steli prima dell'operazione di essiccazione velocizza il processo. La coltivazione dell'ortica può portare allo sfruttamento di due parti distinte della pianta: le foglie e gli steli. Gli steli si prestano principalmente all'utilizzo nel settore tessile, mentre le foglie si prestano ad un utilizzo più variegato.

Nelle figure 1.3 ed 1.4 sono riportati i *flow-chart* del trattamento delle foglie e degli steli in seguito alla raccolta con evidenziati i possibili settori industriali di utilizzo [4].

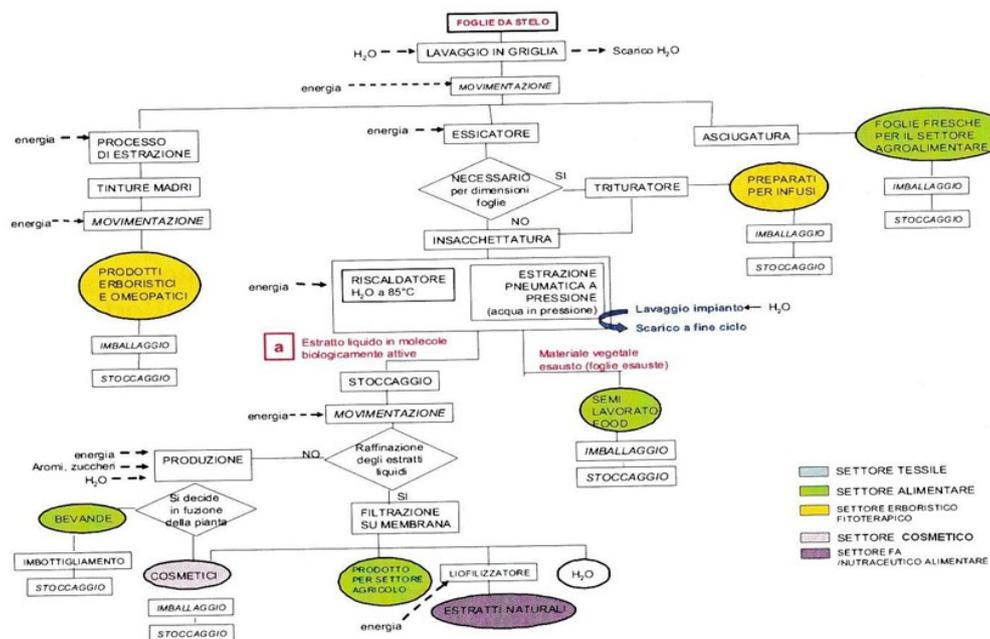


Figura 1.3

*Flow-chart* del trattamento delle foglie e dei possibili settori industriali di utilizzo [4].

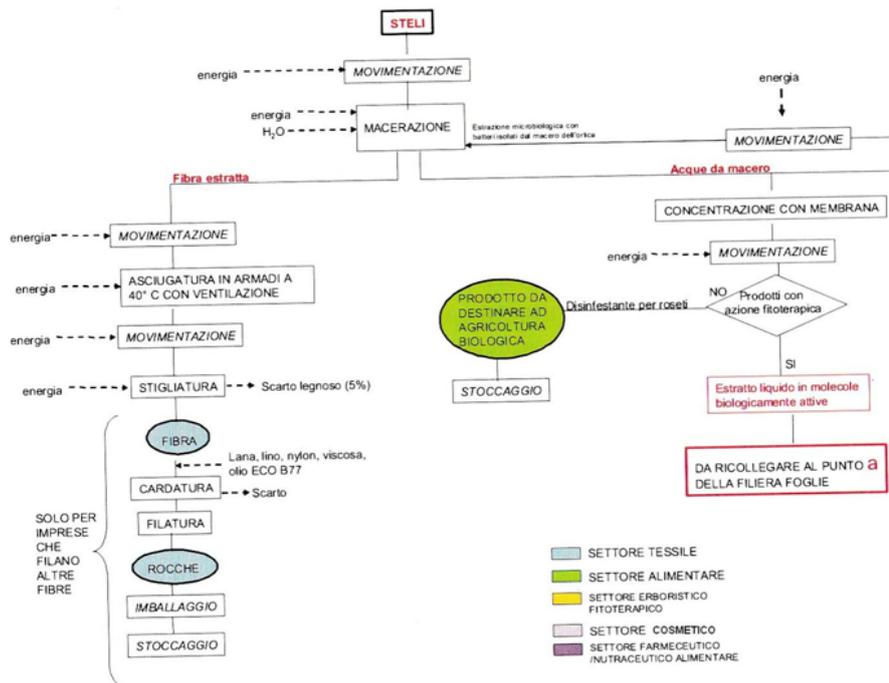


Figura 1.4

Flow-chart del trattamento degli steli e dei possibili settori industriali di utilizzo [4].

Complessivamente si può prevedere il coinvolgimento dei seguenti settori industriali, oltre a quello alimentare:

### Tessile

Fin dall'antichità, soprattutto la specie *U. dioica*, è stata usata per fabbricare lacci, corde, tessuti. Con l'avvento delle fibre sintetiche più economiche e velocemente disponibili, le fibre derivanti dall'ortica cominciarono a perdere importanza, ecco perché la coltivazione di ortica da fibra è oggi un settore molto limitato [3].

A partire dalla metà degli anni '90, la ricerca di fibre a basso impatto ambientale "alternative" al cotone, ha determinato un nuovo interesse per l'ortica e, soprattutto in Germania, Austria e Finlandia, sono stati finanziati progetti di ricerca sugli aspetti agronomici della sua coltivazione e sui metodi e processi tecnici per l'estrazione della fibra da destinare al settore tessile. Dal punto di vista commerciale oggi la domanda di fibre naturali è in aumento, favorita dalle tecniche a basso impatto ambientale, dalla minore richiesta energetica, dalla possibilità di creare una filiera integrata [36]. La fibra di ortica ha buone caratteristiche antistatiche, traspiranti e

termoregolatrici, inoltre sono state individuate proprietà particolari, quali antidecubito e anallergiche, che la renderebbero ideale per il mercato legato al tessile medicale [3].

#### *Cosmetico*

In commercio si trovano shampoo per migliorare la salute e stimolare la crescita dei capelli, per controllare la forfora e per restituire la brillantezza naturale dei capelli. Comuni anche lozioni detergenti per la pelle grassa e per il trattamento di eczema. Il suo impiego nei cosmetici è giustificato dalla presenza di antiossidanti, clorofilla, proteine, vitamine, minerali, amine, serotonina. Possono essere utilizzati a scopo cosmetico gli estratti liquidi raffinati dalle foglie [3].

#### *Agricolo*

In campo orticolo è usata soprattutto nell'agricoltura biodinamica come agrofarmaco e come disinfestante per roseti nell'agricoltura biologica. Può essere usata come mangime per animali perché le foglie sono ricche di azoto, calcio e magnesio. In periodi di scarso foraggio, ad esempio durante le guerre mondiali, le foglie venivano date a cavalli e maiali. Aggiungendo l'ortica nel mangime è possibile incrementare l'apporto vitaminico del 60-70% e quello proteico del 15%-20%, inoltre riduce la necessità di foraggio fresco del 30% [3,4,11,13].

#### *Farmaceutico*

Estrazione di principi attivi da diverse parti della pianta. Estratti naturali liofilizzati da utilizzare in ambito nutraceutico alimentare, erboristico e fitoterapico.

## **1.2 Metaboliti secondari di interesse nutraceutico**

La relazione tra l'assunzione attraverso la dieta di frutta e verdura e la condizione di salute si trova attualmente al centro dell'attenzione della ricerca scientifica e l'evidenza epidemiologica che diete ricche in frutta e verdure siano associate ad una minor incidenza di cancro, malattie cardiovascolari e altre malattie degenerative è vasta [37].

Frutta e verdura, oltre ad essere risorse di vitamine, minerali e fibre, sono alimenti ricchi di composti fitochimici: questi non sono considerati nutrienti primari poiché non hanno funzioni fisiologiche definite. I composti fitochimici possono svolgere funzioni protettive dello status di salute in base a diversi meccanismi: azione antiossidante (polifenoli, carotenoidi, composti allilsolforati), azione ormonale (isoflavoni), stimolazione o inibizione di enzimi, interferenza con la duplicazione del DNA, effetto antibatterico, interferenza con assorbimento e sintesi del colesterolo (steroli vegetali). I fitochimici derivano dal metabolismo secondario delle piante e sono componenti minoritari degli alimenti [38].

Con il termine nutraceutico si possono definire quelle sostanze chimiche di derivazione naturale, presenti all'interno di alimenti, di cui è stata dimostrata l'attività benefica in termini di prevenzione o trattamento nei confronti di una o più patologie oppure di un più generale miglioramento dello stato di salute [39].

Molte classi di composti presenti in alimenti naturali o elaborati hanno effetti potenzialmente nutraceutici, tuttavia gli effetti benefici potenziali possono essere limitati dalla scarsa e variabile biodisponibilità. La biodisponibilità orale può essere limitata da diversi meccanismi chimici, fisici e fisiologici: rilascio dalla matrice alimentare, solubilità nei fluidi gastrointestinale (GIT), interazione con molecole, degradazione chimica o metabolica e permeabilità alle cellule epiteliali.

### **1.2.1 Composti fenolici**

I composti fenolici, o polifenoli, sono prodotti secondari del metabolismo delle piante e sono generalmente coinvolti in meccanismi di difesa contro le radiazioni ultraviolette e contro l'aggressione di patogeni. Negli alimenti, i polifenoli contribuiscono al colore, aroma, odore [40]. Negli ultimi anni sono aumentati gli studi epidemiologici che associano una dieta a lungo termine ricca di polifenoli ad effetti benefici complessivi sulla salute umana, in particolare riguardo alla prevenzione dallo sviluppo di tumori, malattie cardiovascolari, diabete, osteoporosi e malattie neurodegenerative [41].

Più di 8000 composti fenolici sono stati identificati in diverse specie vegetali: derivano da un intermedio comune, la fenilalanina, che metabolicamente deriva dalla via dell'acido shikimico. L'enzima PAL (phenylalanine ammonia liase) catalizza la perdita di ammoniaca e la formazione di un doppio legame portando alla formazione di acido *trans*-cinnamico; in seguito, l'introduzione di un gruppo ossidrilico in posizione *para* all'anello fenilico porta alla formazione di acido *p*-cumarico, il quale può subire ulteriori idrossilazioni e metilazione per originare diversi derivati.

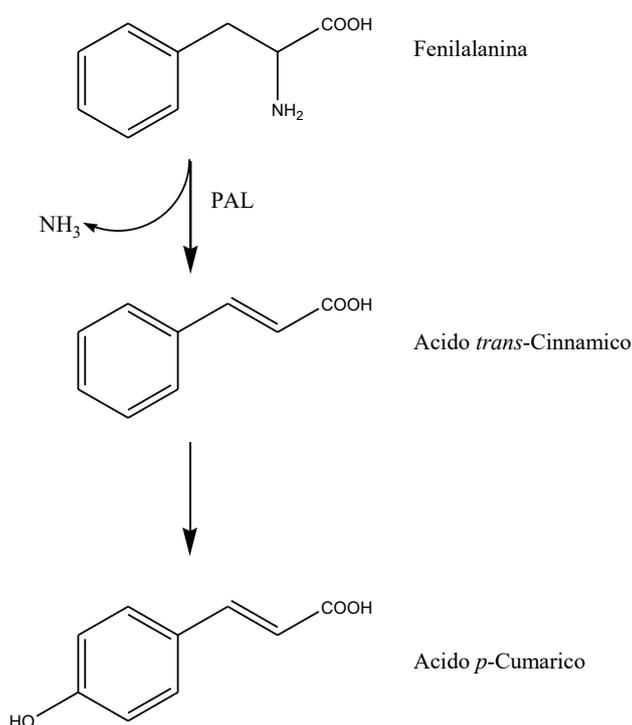


Figura 1.5  
Biosintesi di Acido *p*-Cumarico.

Parallelamente, la perdita di due molecole di carbonio dei fenilpropanoidi conduce alla biosintesi di derivati dell'acido benzoico. Convenzionalmente, i fenilpropanoidi ed i derivati dell'acido benzoico sono definiti acidi fenolici. La decarbossilazione degli acidi fenolici porta alla formazione di fenoli semplici <sup>[42]</sup>.

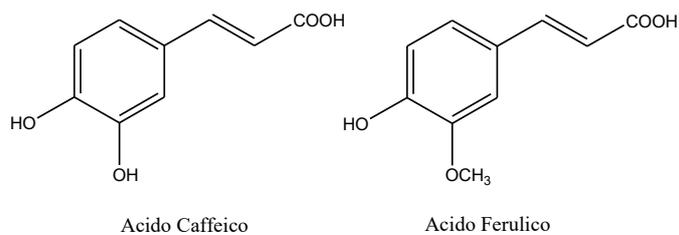


Figura 1.6  
Strutture di Acido Caffeico ed Acido Ferulico.

I fenilpropanoidi possono seguire due distinte vie metaboliche che portano alla formazione di flavonoidi, attraverso l'enzima calcone sintasi, oppure stilbeni, attraverso l'enzima stilbene sintasi. La formazione del tetraidrossicalcone è seguita da una ciclizzazione della molecola che porta alla generazione di diverse sottoclassi del gruppo dei flavonoidi: flavoni, flavonoli, isoflavoni, flavanonoli, catechine e antocianine [42].

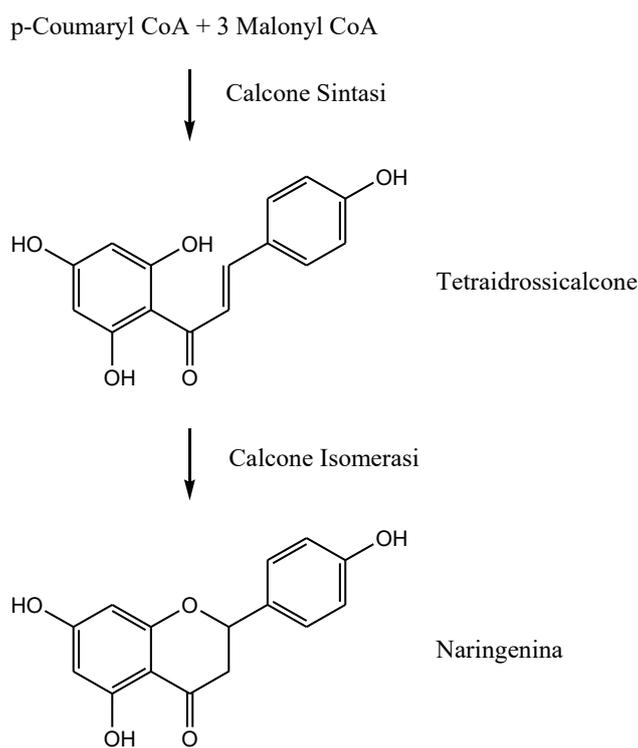
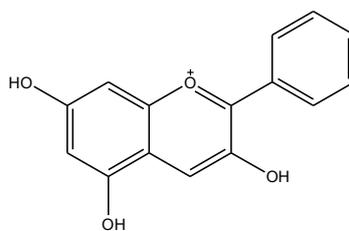


Figura 1.7  
Biosintesi dei flavanoni.

La molecola di base dalla quale prendono origine le varie sottoclassi di flavonoidi è la naringenina (un flavanone), che si forma dal calcione per opera dell'enzima calcione isomerasi



Derivante invece dal diidroflavonolo è la sottoclasse delle antocianidine, che glucosilate danno origine alle antocianine. Le antocianidine sono molto diffuse in natura, specialmente in frutti e fiori, cui conferiscono i colori blu, rosso e porpora. Possiedono spiccate proprietà antiossidanti [42].



Antocianidine

Figura 1.10

Struttura base delle antocianidine.

All'interno di ciascuna classe, esistono diverse molecole a seconda del numero e della disposizione di gruppi idrossilici o alchilici. Inoltre, ciascuna molecola può andare incontro a processi di glicosilazione generalmente catalizzati dalla luce. I flavonoli ed i flavoni sono presenti nelle piante soprattutto in forma glicosidica e quindi solubili: alcuni possono essere assorbiti a livello dell'intestino tenue o idrolizzati a formare i rispettivi agliconi. La frazione non assorbita diventa disponibile per i batteri del colon.

I lignani sono dimeri di acidi fenilpropanici e nelle piante agiscono principalmente come sostanze a funzione difensiva [39].

I flavonoli sono il gruppo maggiormente diffuso in natura, mentre i flavoni, strutturalmente simili, sono meno diffusi. I flavan-3-oli costituiscono la classe più complessa e variano da semplici monomeri (catechina) a oligomeri e polimeri, come lo proantocianidine.

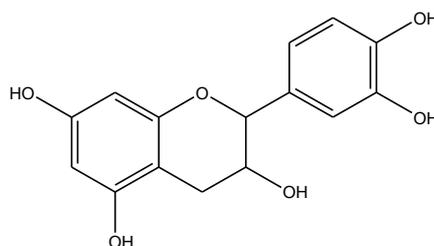


Figura 1.11

Struttura della Catechina (flavan-3-olo).

*In vitro*, i flavonoidi in generale possono eliminare le specie radicaliche dell'ossigeno ed esercitano effetti antinfiammatori, antiallergici ed antivirali, oltre ad avere proprietà anticarcinogene. Tuttavia, gli esperimenti *in vitro* spesso non tengono conto delle quantità effettivamente biodisponibili e del metabolismo della frazione assorbita [38,39,42].

I possibili meccanismi di azione antiossidante possono essere diretti o indiretti:

- Azione radical scavenging diretta: i flavonoidi possono inibire la fase di iniziazione, oppure reagire con radicali perossidici già formati inibendo la fase di propagazione ed i radicali flavonoidici intermedi che si formano possono reagire con altri radicali perossidici favorendo le reazioni di terminazione [39].
- Inibizione della formazione di nuovi radicali: inibizione della protein-chinasi C (es: isoflavoni) [39].
- Eliminazione di precursori radicalici: reazione diretta dei flavonoidi con perossido di idrogeno con conseguente prevenzione dalla formazione di nuovi radicali [43,44].
- Chelazione di metalli: alcuni metalli di transizione, come il ferro, possono catalizzare la formazione di radicali liberi; alcuni flavonoidi hanno proprietà chelanti e possono indirettamente inibire la formazione di radicali [39].
- Inibizione di enzimi pro-ossidanti: ad esempio l'inibizione dell'enzima xantina ossidasi che in certe condizioni genera radicale anione superossido [45].
- Aumento della concentrazione di antiossidanti endogeni: ad esempio l'enzima superossido dismutasi, responsabile dell'azione scavenger nei confronti del radicale anione superossido all'interno delle cellule [46].

Nelle foglie di *U. dioica* i composti fenolici principali rientrano nella classi degli acidi fenolici e dei flavonoli. Tra gli acidi fenolici sono predominanti due esteri dell'acido caffeico, l'acido clorogenico (acido 3-caffeilchinico, 3-CQA) e l'acido caffeilmalico (CMA). Il CMA (Fig. 1.13) è un costituente distintivo delle foglie di *U. dioica*, dato che non si trova nelle altre specie di ortica [30]. Pinelli *et al.* [29] riportano che 3-CQA e CMA rappresentano il 71,5% dei composti fenolici totali in ortica coltivata e il 76,5% in ortica spontanea.

Acido clorogenico ed acido caffeilmalico sono entrambi esteri dell'acido caffeico. Con il termine acido clorogenico si intende l'intera famiglia di esteri degli acidi *trans*-cinnamici con l'acido chinico: tra queste la famiglia più diffusa è quella dell'acido caffeico e l'isomero più caratteristico è l'acido 3-caffeilchinico, 3-CQA (Fig. 1.12). L'acido caffeico si può trovare sotto forma di mono-estere, oppure anche come di-estere, tri-estere e tetra-estere [47].

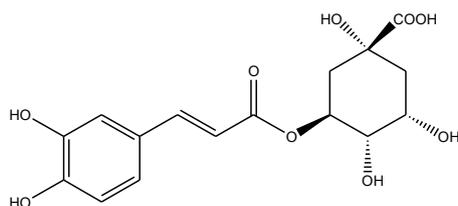


Figura 1.12

Formula di struttura di Acido Clorogenico (acido 3-caffeilquinico).

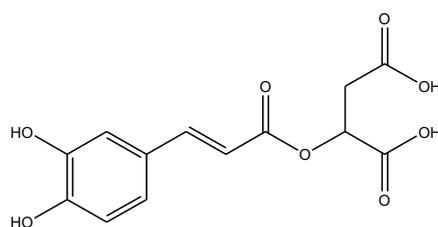


Figura 1.13

Formula di struttura di Acido Caffeilmalico.

La famiglia degli acidi clorogenici possiede una notevole diffusione in natura: in particolare caffè, cacao, tè verde e tè nero, mele, pere e frutta in generale, foglie di diverse specie vegetali (Brassicacee, Asteracee, spinacio) sono le principali risorse di acidi clorogenici [47].

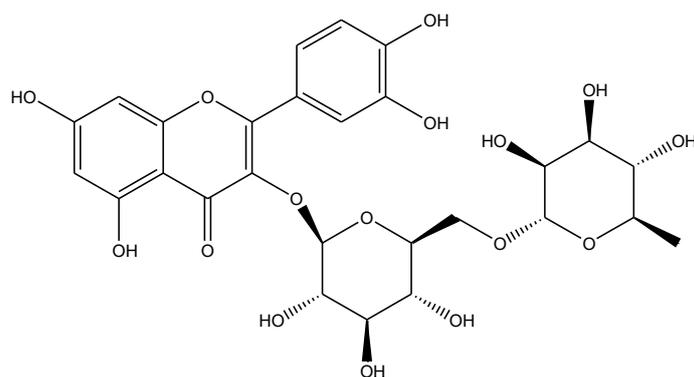


Figura 1.14

Formula di struttura della Rutina (quercetina 3-rutinoside).

I flavonoidi caratteristici delle foglie di *U. dioica* appartengono alla sottoclasse dei flavonoli e sono principalmente derivati 3-rutinosidi e 3-glucosidi di quercetina, kaempferolo e

isoramnetina. In particolare, il derivato 3-rutinoside della quercetina (rutina, Fig. 1.14) è il flavonoide presente in maggior concentrazione [5].

### 1.2.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono una classe di pigmenti organici molto abbondanti in natura, privi di azoto, che possono essere rinvenuti in animali, piante o in altri organismi fotosintetici come le alghe, funghi ed alcune specie di batteri.

Chimicamente sono dei terpenoidi, formati da 8 unità isopreniche ( $C_5H_8$ ) che si dividono in 2 sottogruppi principali:

- 1) Caroteni: carotenoidi non ossigenati a struttura idrocarburica dienica come ad esempio  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene, licopene; a loro volta i caroteni possono essere classificati in aciclici (es. licopene), monociclici (es.  $\gamma$ -carotene) e biciclici (es.  $\alpha$  e  $\beta$ -carotene).
- 2) Xantofille: derivati ossigenati dei caroteni come ad esempio luteina, zeaxantina, astaxantina,  $\beta$ -criptoxantina; nei vegetali le xantofille possono trovarsi in forma libera o esterificate con acidi grassi.

La struttura comune per tutti i carotenoidi è costituita da una catena di 40 atomi di carbonio legati tra loro da una serie di doppi legami alternati a legami semplici.

I carotenoidi possono essere lineari come il licopene, o possono aver subito una chiusura ad anello ad un'estremità come il  $\gamma$ -carotene, oppure a tutte e due come il  $\beta$ -carotene o la luteina.

La struttura *trans* dei carotenoidi è la più frequente in natura e può essere frequentemente soggetta ad isomerizzazione dando una configurazione *cis*. Questo cambio di configurazione può avere significativi effetti sulle proprietà fisiche e biochimiche della molecola. I carotenoidi sono molecole lipofile e non sono solubili in acqua ma sono solubili in solventi organici e in grassi e oli. La presenza di un gruppo idrossilico o chetonico conferisce alla molecola una maggiore polarità ma questi composti rimangono comunque idrofobici [48].

Il punto di partenza per la biosintesi dei carotenoidi è la condensazione di due molecole del precursore dei diterpeni, il geranyl-geranyl difosfato ( $C_{20}$ ) catalizzata dall'enzima phytoene sintasi che porta alla formazione di phytoene. Successivamente una serie di quattro reazioni di desaturazione ad opera della phytoene desaturasi porta alla formazione di doppi legami coniugati convertendo il phytoene (incolore) in licopene (rosso). Due reazioni di ciclizzazione convertono il licopene in  $\beta$ -carotene ad opera della licopene ciclasi. Le xantofille sono idrossidi derivati dai caroteni che si formano negli ultimi stadi della via biosintetica [48,49].

Alcuni carotenoidi sono precursori della vitamina A. Col termine vitamina A vengono definiti tutti i retinoidi che possiedono l'attività biologica del retinolo. La vitamina A è un nutriente liposolubile fondamentale per il processo fisiologico della visione, ma che possiede anche attività di regolazione dell'espressione genica ed importante per la riproduzione, lo sviluppo embrionale, la crescita e le funzioni immunitarie [38].

La deficienza di vitamina A è un grave problema nutrizionale a livello mondiale ed anche nei paesi industrializzati è il nutriente, insieme al ferro, i cui apporti hanno la maggior probabilità di essere inadeguati [38].

Dei carotenoidi presenti in natura circa 50 possiedono attività provitaminica; il più efficiente è il  $\beta$ -carotene. L'attività provitaminica è dovuta alla presenza nella molecola di un anello  $\beta$ -iononico non sostituito, che può essere scisso formando retinale (retinaldeide) e/o acido retinoico, forme fisiologiche della vitamina A. Il retinale agisce nel processo della visione.

$\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -criptoxantina (possiedono attività provitaminica), luteina, licopene e zeaxantina (non possiedono attività provitaminica), sono i sei più comuni carotenoidi presenti nella dieta. Il consumo di carotenoidi è inversamente relazionato all'incidenza di malattie cardiovascolari, cataratte e degenerazione della macula, zona centrale della retina, legata all'invecchiamento. Questi effetti protettivi sono stati attribuiti alle proprietà antiossidanti, tuttavia a dosi elevate potrebbero agire come pro-ossidanti e risultare quindi dannosi [50].

L'assorbimento dei carotenoidi nell'uomo avviene per diffusione passiva ed è influenzato dalla quantità di lipidi presenti nella dieta. In condizioni normali, la quantità di carotenoidi assorbiti può variare dal 5% al 50% dei carotenoidi ingeriti. Una frazione dei carotenoidi assorbiti viene trasformata negli enterociti in retinaldeide che viene poi ridotta a retinolo da una retinaldeide reduttasi NADH- o NADPH-dipendente. Negli enterociti e in tutte le cellule in grado di metabolizzare il retinolo, sono presenti specifiche proteine che legano il retinolo e i suoi metaboliti (Cellular Retinol Binding Protein, CRBP). Il legame con le CRBP impedisce che la vitamina si posizioni nelle membrane cellulari. All'interno degli enterociti, il retinolo viene esterificato con palmitato (50-60%), stearato (20-25%) o oleato (10-20%) dagli enzimi acil-CoA-retinolo aciltransferasi (ARAT) e lecitina-retinolo aciltransferasi (LRAT) [50,51].

I retinil-esteri e i carotenoidi lasciano gli enterociti come componenti dei chilomicroni e attraverso il sistema linfatico raggiungono la circolazione sanguigna. I chilomicroni entrano, attraverso un meccanismo di endocitosi, mediata da recettori, nelle cellule epatiche dove vengono metabolizzati. I retinil-esteri vengono idrolizzati a livello della membrana plasmatica o dei primi endosomi. I carotenoidi presenti nei chilomicroni possono essere convertiti in retinoidi oppure essere secreti dalle cellule come componenti delle VLDL. Il retinolo viene

trasferito al reticolo endoplasmatico dove si lega ad una proteina la *retinol binding protein* (RBP). Il complesso retinolo-RBP viene trasferito all'apparato di Golgi e quindi secreto dagli epatociti e trasferito alle cellule epatiche deputate al deposito di lipidi (cellule stellate o cellule di Ito) dove viene riesterificato e immagazzinato. Il fegato dei mammiferi contiene in condizioni normali tra il 50% e il 80% del retinolo presente nell'organismo, di cui il 90-95% si trova nelle cellule stellate sotto forma di retinil-esteri raggruppati in goccioline lipidiche citoplasmatiche. I livelli plasmatici di vitamina A sono sottoposti a controllo omeostatico tra 40 e 80 µg/dL. Il retinolo depositato nel fegato può essere riversato nel torrente circolatorio per mantenere i livelli plasmatici di vitamina A nel range di normalità. I retinil-esteri depositati nelle cellule stellate vengono idrolizzati ed il retinolo viene rilasciato legato alla RBP. Nel plasma il complesso retinolo-RBP si associa ad una prealbumina, la transtiretina. Normalmente circa il 95% del retinolo presente nel plasma è legato a proteine. Nel plasma non esistono proteine specifiche per i carotenoidi. Questi come gli altri lipidi, sono trasportati dalle lipoproteine plasmatiche. Il meccanismo con cui il retinolo circolante entra nelle cellule non è ancora del tutto chiarito. Nel plasma sono presenti modesti quantitativi di retinolo libero che sembrano essere in equilibrio con il retinolo legato all'RBP e che potrebbero essere disponibili per l'assorbimento da parte delle cellule con un meccanismo aspecifico non mediato da recettori. Tuttavia alcuni tipi di cellule (epiteliali della retina, parenchimali e stellate del fegato, della barriera ematoencefalica, della placenta) esprimono recettori specifici di membrana che riconoscono l'RBP. Probabilmente in queste cellule il complesso retinolo-RBP si associa con i recettori di membrana specifici rilasciando il retinolo a proteine citoplasmatiche di trasporto (CRBP). I carotenoidi trasportati dalle lipoproteine plasmatiche potrebbero invece rappresentare una fonte di vitamina A per le cellule che esprimono i recettori per le lipoproteine [38,50,51].

Nelle foglie di *U. dioica* i due carotenoidi principali sono luteina e β-carotene, assieme ad altre xantofille quali neoxantina e violaxantina. Uno studio condotto su foglie giovani ed adulte di *U. dioica* ha messo in evidenza come la luteina ed i suoi isomeri rappresentino più del 60% dei carotenoidi totali; inoltre il contenuto totale di carotenoidi tra foglie giovani e foglie adulte non presentava grandi differenze (51,4 mg/g di sostanza secca per le foglie giovani, 74,8 mg/g per le foglie adulte) [33].

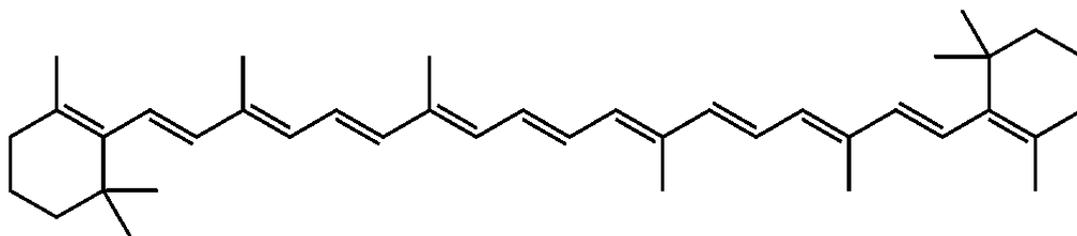


Figura 1.15  
Struttura chimica del  $\beta$ -carotene.

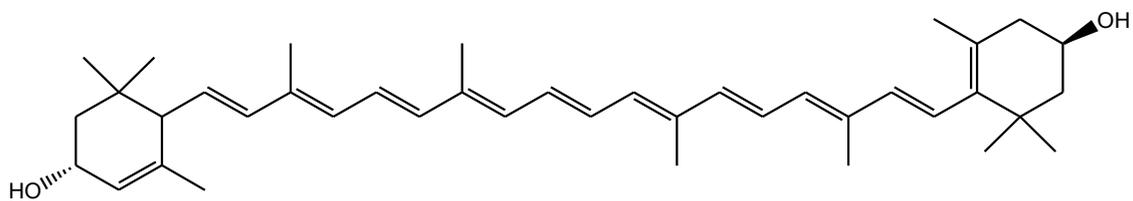


Figura 1.16  
Struttura chimica della luteina.

### 1.2.3 Biodisponibilità e Bioaccessibilità

#### *Digestione*

Il tratto gastrointestinale è la più estesa interfaccia tra il corpo e l'ambiente, ed è deputato ad assorbire i nutrienti ed a fornire protezione dagli agenti dannosi. Il tratto superiore comprende cavità orale, esofago, stomaco, duodeno, digiuno ed ileo, mentre il tratto inferiore comprende cieco, colon, retto e canale anale.

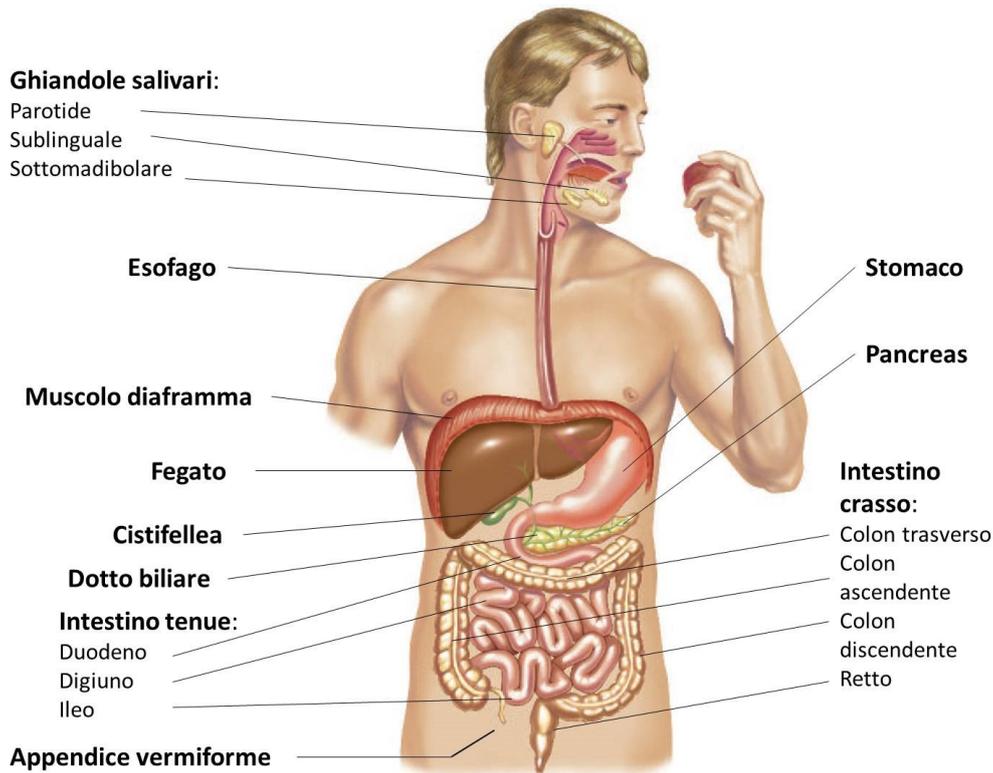


Figura 1.17

Apparato gastrointestinale umano.

Ogni parte del tratto gastrointestinale ha il proprio ruolo nella digestione: la bocca è responsabile della masticazione e del mescolamento del cibo con la saliva, che contiene enzimi come l'amilasi che catalizza l'idrolisi dell'amido in zuccheri; lo stomaco contiene enzimi come proteasi e lipasi che demoliscono proteine e lipidi, inoltre l'acido secreto abbassa il pH favorendo l'idrolisi; nel duodeno la secrezione di bicarbonato ed enzimi digestivi (tripsina, chimotripsina) proveniente dal pancreas neutralizza il pH acido del chimo e demolisce ulteriormente proteine, lipidi e carboidrati, mentre con l'introduzione degli acidi biliari dalla cistifellea vengono emulsionati i lipidi e si ha la formazione di micelle<sup>[52]</sup>. La parte finale della digestione avviene sulla superficie degli enterociti dell'intestino tenue, sulla cui membrana si

trovano enzimi come maltasi, saccarosio-isomaltasi, lattasi e peptidasi. I nutrienti prodotti dalla digestione sono principalmente assorbiti dagli enterociti del digiuno e in minore quantità da quelli dell'ileo. Oltre alla principale funzione di assorbimento dell'acqua, l'intestino crasso contiene un'importante popolazione microbica che contribuisce alla digestione dei componenti alimentari che non riescono ad essere digeriti dagli enzimi dei compartimenti precedenti <sup>[53]</sup>. Uno dei compiti di questi microorganismi è, ad esempio, la fermentazione di carboidrati e proteine complesse per produrre acidi grassi a catena corta ed altri metaboliti. Dopo l'assorbimento da parte degli enterociti, i composti possono essere ulteriormente degradati da enzimi intracellulari prima di essere immessi nella circolazione sistemica. I nutrienti idrosolubili sono prevalentemente rilasciati nel flusso sanguigno e finiscono al fegato tramite la vena porta, mentre i nutrienti liposolubili vengono assemblati in chilomicroni e trasportati nella linfa, dalla quale passeranno nel sangue dopo essere stati riprocessati.

#### *Biodisponibilità e Bioaccessibilità*

Molte classi di composti presenti in alimenti naturali o elaborati hanno effetti potenzialmente nutraceutici, tuttavia gli effetti benefici potenziali possono essere limitati dalla scarsa e variabile biodisponibilità <sup>[54]</sup>.

La biodisponibilità può essere definita come la frazione di una molecola ingerita disponibile al sito di azione per l'utilizzo nelle normali funzioni fisiologiche, per cui corrisponde alla porzione digerita, assorbita ed utilizzata in una condizione metabolica normale <sup>[55]</sup>. Essa è il risultato di tre processi fondamentali: digeribilità e solubilità della sostanza nel tratto gastrointestinale; assorbimento da parte delle cellule intestinali e passaggio nella circolazione sistemica; passaggio dalla circolazione al suo target o entità funzionale dove interagisce con biomolecole e genera risposte fisiologiche <sup>[56]</sup>. Il concetto di biodisponibilità comprende quello di bioaccessibilità e quello di bioattività.

La bioaccessibilità è definita come la frazione di un composto che viene rilasciata dalla sua matrice alimentare nel tratto gastrointestinale e che diventa quindi disponibile per l'assorbimento intestinale. Essa comprende la sequenza di eventi che hanno luogo durante la digestione del cibo per la trasformazione in materiale disponibile per essere assorbito, ma esclude il trasporto attraverso il tessuto epiteliale ed il metabolismo presistemico. La bioaccessibilità di un nutriente è quindi definita come la frazione disponibile per l'assorbimento in seguito ai processi digestivi, rispetto alla quantità inizialmente ingerita. La biodisponibilità perciò è strettamente influenzata dalla bioaccessibilità <sup>[37, 57]</sup>.

La bioattività prende in considerazione come un nutriente o un composto bioattivo viene trasportato e raggiunge il tessuto bersaglio, come interagisce con le biomolecole, il metabolismo o biotrasformazione che può subire e la generazione di marker e risposte fisiologiche che produce [56]. Può essere valutata con metodologie *in vitro*, *in vivo* ed *ex vivo*.

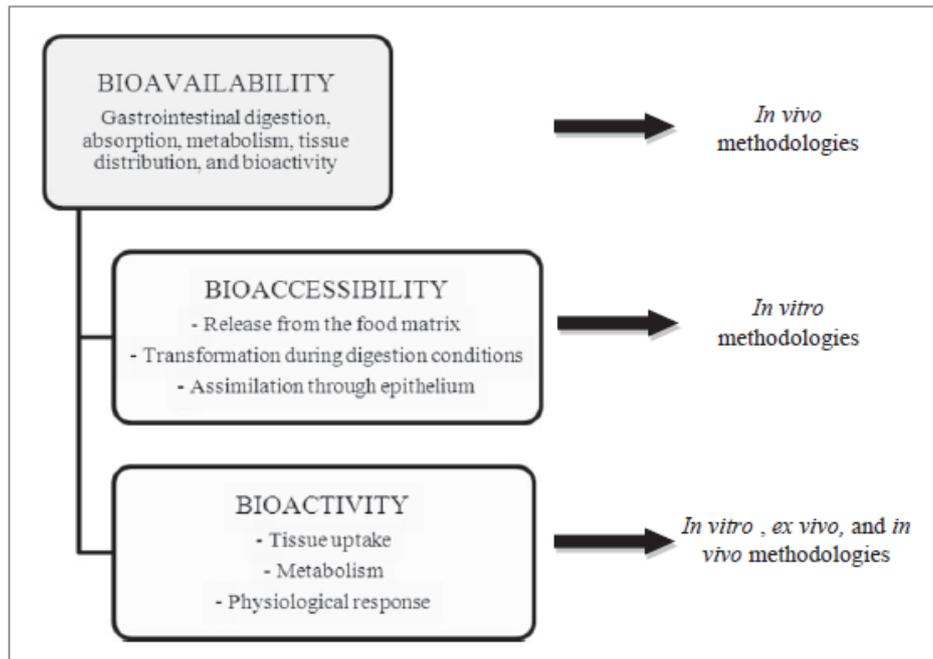


Figura 1.18  
Biodisponibilità, Bioaccessibilità e Bioattività [58].

La valutazione della biodisponibilità e della bioaccessibilità diventa quindi un passaggio fondamentale nello studio del potenziale nutraceutico di ciascuna molecola. Inoltre la biodisponibilità può essere limitata da diversi meccanismi chimici, fisici e fisiologici: rilascio dalla matrice alimentare, solubilità nei fluidi gastrointestinale, interazione con molecole, degradazione chimica o metabolica e permeabilità alle cellule epiteliali [54].

Gli studi *in vivo* sono considerati come riferimento per gli studi di biodisponibilità, poiché considerando tutte le variabili fisiologiche che si possono avere nell'organismo, consentono di valutare l'assorbimento, la cinetica di trasporto e la competizione del nutriente al sito di assorbimento. Essi hanno, però, diversi svantaggi, come la difficoltà di interpretazione dei dati, costi elevati, problemi etici, variazioni individuali dei valori e mancanza di standard certificati per comparare i dati ottenuti [59].

Per tale motivo negli ultimi anni sono stati sviluppati e proposti diversi metodi *in vitro* per valutare in maniera preliminare la bioaccessibilità di ciascun nutriente e più in generale di una

qualsiasi molecola venga ingerita attraverso l'alimentazione (es: contaminanti e sostanze potenzialmente pericolose); questi metodi *in vitro* sono poco costosi, veloci e permettono un maggior controllo delle variabili sperimentali rispetto a studi *in vivo* [60].

Inoltre i metodi *in vitro* consentono lo studio della bioaccessibilità valutando le possibili interazioni tra diverse componenti delle matrici alimentari, le tecniche di preparazione ed elaborazione degli alimenti e l'influenza del tipo di matrice alimentare [56].

I metodi *in vitro* per la valutazione della bioaccessibilità possono essere suddivisi in tre gruppi:

- Metodi di solubilizzazione
- Metodi di dialisi
- Modelli gastrointestinali dinamici

I metodi di solubilizzazione e dialisi vengono definiti metodi statici: sono i più semplici ed includono generalmente tre fasi digestive (orale, gastrica ed intestinale), ciascuna con un determinate condizioni iniziali, in cui i prodotti rimangono fermi in un singolo e statico bioreattore. Essi sono utili soprattutto per la valutazione della bioaccessibilità di un nutriente, in quanto dopo una prima fase di digestione può essere determinata la quantità di sostanza che si è solubilizzata. Questi metodi, tuttavia, simulano un numero molto limitato di parametri della digestione fisiologica e non riproducono processi fisici come la rottura, il mescolamento, l'idratazione, il progressivo cambio di condizioni e la peristalsi [59,61]. Non sono, perciò, in grado di valutare l'assorbimento, la cinetica di trasporto e l'eventuale competizione con altre sostanze al sito di assorbimento.

I modelli gastrointestinali dinamici sono più complicati e costosi però permettono di incorporare allo studio diversi parametri importanti per la simulazione della digestione (pH, temperatura, motilità gastrointestinale, masticazione, ecc.), permettono il campionamento dei fluidi gastrointestinali simulati ad ogni step della digestione (bocca, stomaco, intestino, colon) e soprattutto possono essere accoppiati a modelli di studio del trasporto transepiteliale (*Caco-2* cell model) per valutare oltre alla bioaccessibilità, anche la biodisponibilità potenziale [56,62].

I modelli dinamici si avvalgono di apparati controllati da programmi automatici che mirano a riprodurre nella maniera più realistica possibile la digestione fisiologica. In particolare si cerca di simulare le geometrie del tratto gastrointestinale (forme, volumi, orientamento), le forze fisiche implicate nella digestione (forze di taglio e frantumazione, pressione esercitata dalla peristalsi) e i parametri biochimici (concentrazione di cibo, pH, tipologia e concentrazione di secrezioni digestive) [52]. Ogni modello utilizza apparati e programmi di regolazione diversi dagli altri, ma in ogni caso il processo digestivo avviene in continuo e le condizioni dei diversi

compartimenti digestivi vengono variate gradualmente in maniera automatica dallo strumento; in questo modo, oltre ad avere una simulazione più fedele della digestione fisiologica, si possono effettuare prelievi di controllo a diversi tempi senza fermare il processo, ottenendo dati più realistici.

Negli ultimi anni numerosi modelli *in vitro* statici e dinamici sono stati messi a punto ed applicati per la valutazione della bioaccessibilità e della biodisponibilità di molecole potenzialmente bioattive di matrici alimentari [56,58]. In particolare, alcuni studi hanno fatto emergere la scarsa biodisponibilità delle molecole a proprietà antiossidanti e dei carotenoidi assunti attraverso il consumo di frutta e verdura, a causa di interazioni fisiche e chimiche di queste molecole con la frazione polisaccaridica insolubile (fibra dietetica) [37]. Questo risultato apparentemente in contrasto con le evidenze epidemiologiche sugli effetti salutistici benefici di queste molecole ha aperto il dibattito e lo approfondito lo studio sul destino di queste molecole in seguito all'assunzione con la dieta [51,63]. In particolare, ha progressivamente acquisito interesse lo studio dell'impatto di questi metaboliti secondari direttamente a livello dell'apparato gastrointestinale [64].

### 1.3 Alimenti funzionali

La conoscenza dei bisogni nutrizionali dell'uomo ha RIDOTTO le patologie da deficit nutrizionali nel mondo occidentale. Tuttavia, mettendo a confronto diversi regimi alimentari, tutti accettabili riguardo al loro contenuto di nutrienti, si osservano effetti diversi sulla salute umana <sup>[38]</sup>. Prima dell'entrata in vigore del Regolamento CE 1924/2006, il termine "alimenti funzionali" era quasi esclusivamente legato a prodotti di marca che affermavano o suggerivano in modo autoreferenziale di far bene alla salute o a prodotti creati appositamente per essere marcati con degli *health claims* <sup>[65]</sup>.

La definizione oggi comunemente accettata è quella dell'European Food Information Council (EUFIC), risale al 1999 ed è il frutto del lavoro di una commissione di esperti europei in nutrizione e medicina, che hanno lavorato per tre anni al progetto "FuFoSE" (Functional Food Science in Europe). Il lavoro conclusivo di tale commissione porta il nome di "*Consensus Document*" e stabilisce che "*un alimento può essere considerato funzionale se dimostra in maniera soddisfacente di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia. Gli alimenti funzionali devono dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta. Gli alimenti funzionali non sono pillole o pastiglie, ma prodotti che rientrano nelle normali abitudini alimentari*" <sup>[66,67]</sup>.

In sintesi, sono considerati funzionali gli alimenti comunemente presenti nella dieta che contengono componenti biologicamente attivi in grado di migliorare la salute o ridurre il rischio di malattie, quali ad esempio quelli contenenti determinati minerali, vitamine, acidi grassi o fibre alimentari oppure addizionati con principi attivi di origine vegetale, antiossidanti e probiotici.

Gli aspetti fondamentali degli alimenti funzionali possono essere riassunti <sup>[38]</sup>:

- gli alimenti funzionali sono definiti come capaci di esplicare effetti benefici su alcune funzioni bersaglio nell'organismo umano, in maniera da migliorare lo stato di salute e/o diminuire il rischio di malattia;
- devono essere consumati come parte del normale regime alimentare e non come pillole o supplementi;
- è necessario che abbiano effetti scientificamente provati;
- l'efficacia e la sicurezza devono essere verificate con l'utilizzo di adatti biomarker, atti a rilevarne gli effetti su parametri sensibili dell'organismo;

- è necessaria una solida evidenza sperimentale prima di pubblicizzare un alimento come capace di migliorare una qualche funzione fisiologica o di ridurre il rischio di malattia.

Gli alimenti funzionali possono essere classificati in base all'appartenenza alle seguenti tipologie:

- Alimenti naturali nel quale uno dei componenti è stato migliorato mediante condizioni speciali di coltura o selezione genetica (es: pomodoro ad elevato contenuto di licopene);
- Alimenti arricchiti in qualche componente in modo che produca un beneficio (ad esempio i probiotici);
- Alimenti dai quali sono stati eliminati uno o più componenti in modo da sottrarre o diminuire gli effetti avversi sulla salute;
- Alimento nei quali uno o più dei suoi componenti è stato modificato chimicamente per migliorare lo stato di salute del consumatore (ad esempio gli idrolizzati proteici addizionati nei preparati per lattanti, per ridurre il rischio allergenico);
- Alimento nei quali la biodisponibilità di uno o più dei suoi componenti è stata aumentata per migliorare l'assimilazione di un componente benefico;
- una qualsiasi combinazione delle precedenti.

Un'ulteriore classificazione degli alimenti funzionali li divide in due grandi gruppi:

- Alimenti che migliorano una specifica funzione fisiologica e non intervengono in malattie o stati patologici;
- Alimenti che riducono il rischio di una malattia.

Dal punto di vista puramente funzionale possiamo distinguerli, a seconda dei principi attivi in essi contenuti, in:

- antiossidanti attivi nella difesa da stress ossidativi;
- antimutageni, anticarcinogenici, detossificatori;
- antimicrobici e antivirali, stimolatori della funzione del tratto gastrointestinale e di ausilio nella digestione, antinfiammatori (es: probiotici, prebiotici);
- ipocolesterolemici, anti ipertensivi (es: steroli vegetali e acidi grassi omega 3 per la riduzione del colesterolo LDL e il controllo del metabolismo lipidico);
- neuroregolatori;
- a ridotta attività allergenica.

Gli alimenti funzionali rappresentano un segmento di mercato in rapidissima evoluzione e particolarmente promettente, seppure non sia semplice fornire delle stime precise del mercato globale anche a causa della mancanza di una definizione universalmente accettata di questi prodotti.

L'introduzione di *claims* nutrizionali e salutistici rappresenta, ad ogni modo, una grande opportunità per l'industria agroalimentare per riposizionare i propri prodotti e per svilupparne di nuovi <sup>[38,68]</sup>.

## 2. SCOPO

L'utilizzo alimentare delle piante spontanee è stato definito fitoalimurgia (dal greco *phytón* = pianta e dal latino *alimenta urgentia*, alimentazione in caso di necessità, urgenza alimentare). Le piante alimurgiche sono piante erbacee spontanee che, soprattutto in passato, rappresentavano una fondamentale risorsa alimentare per le popolazioni locali, soprattutto rurali. Tale abitudine alimentare, principalmente, traeva origini da uno stato di necessità, data la cronica indigenza in cui versava la popolazione rurale e talora quella cittadina <sup>[69]</sup>.

Con il termine Ortica si fa riferimento all'insieme di piante erbacee appartenenti al genere *Urtica* L., famiglia delle Urticaceae, diffuse in maniera pressoché ubiquitaria nelle regioni temperate. La specie maggiormente diffusa è la perenne *U. dioica* distribuita in Europa, Nord Africa, Asia, Nord e Sud America <sup>[1]</sup>, principalmente conosciuta e studiata nel settore tessile e fitoterapico: è una pianta spontanea commestibile ubiquitaria, nota per essere un alimento ad utilizzo alimurgico nella tradizione povera contadina, dove viene consumata tal quale o inserita in ricette come zuppe, risotti, ripieni e impasti verdi, spesso in sostituzione dello spinacio.

L'interesse riguardo allo sviluppo della coltivazione dell'ortica sta crescendo grazie alle potenzialità multisettoriali dei prodotti che si possono ricavare dalla pianta: radici, steli e foglie rappresentano la biomassa utilizzabile nei settori tessile, fitoterapico, cosmetico ed alimentare. Inoltre, le caratteristiche agronomiche rendono la pianta di ortica una coltivazione a basso impatto ambientale potenzialmente adatta per zone attualmente incolte <sup>[13]</sup>.

Una delle motivazioni che spingono a concentrare le attenzioni sulla ricerca alimentare è la rivalutazione che ai giorni nostri l'ortica ha subito nel settore industriale alimentare, in particolare come ingrediente innovativo nella produzione di pasta alimentare speciale.

Gli alimenti funzionali rappresentano un segmento di mercato in rapidissima evoluzione e particolarmente promettente, seppure non sia semplice fornire delle stime precise del mercato globale anche a causa della mancanza di una definizione universalmente accettata di questi prodotti. In genere, sono considerati funzionali gli alimenti comunemente presenti nella dieta che contengono componenti biologicamente attivi in grado di migliorare la salute o ridurre il rischio di malattie, quali ad esempio quelli contenenti determinati minerali, vitamine, acidi grassi o fibre alimentari oppure addizionati con principi attivi di origine vegetale, antiossidanti e probiotici <sup>[38,67]</sup>.

Le foglie di *U. dioica* sono un'eccellente risorsa di minerali, proteine, vitamina C e dei gruppi B e K. Inoltre sono ricche di metaboliti secondari di interesse nutraceutico, in particolare i

composti fenolici ed i carotenoidi <sup>[1,5]</sup>. Queste caratteristiche conferiscono alle foglie di ortica un notevole potenziale dietetico e nutrizionale e per tale motivo si rende necessaria una maggiore ricerca sul valore nutritivo delle foglie e dei prodotti elaborati ottenuti dal loro utilizzo come ingrediente.

Lo scopo del progetto di ricerca è quello di valutare l'utilizzo di ortica come nuovo alimento funzionale e come ingrediente per la preparazione di nuovi alimenti funzionali, con particolare attenzione alla produzione di pasta alimentare speciale. La pasta è considerata un'ottima fonte di carboidrati ed una fonte moderata di proteine e vitamine <sup>[70]</sup>. Tuttavia, considerata la sua notevole diffusione in svariati regimi alimentari, la pasta può essere fortificata con specifici ingredienti per aumentarne il valore nutrizionale e renderla un alimento funzionale <sup>[70-72]</sup>.

La prima parte del progetto ha previsto la valutazione nutrizionale di campioni di ortica spontanea del comprensorio Emiliano-Romagnolo. Il lavoro è stato suddiviso nella parte di analisi bromatologica per la creazione di una etichetta nutrizionale e nella parte di valutazione generale delle proprietà antiossidanti.

La ricerca è proseguita con uno studio specifico sulle due classi di metaboliti secondari a proprietà nutraceutiche caratteristici delle foglie di *U. dioica*: composti fenolici e carotenoidi. Presso il Centro di Ricerca per le Colture Industriali (CRA-CIN) di Rovigo è stato creato un campo sperimentale per lo studio agronomico delle condizioni di coltivazione e crescita di *U. dioica* ed *U. urens*. Sulla specie *dioica* sono stati caratterizzati i principali composti fenolici e carotenoidi, successivamente quantificati durante le fasi di sviluppo vegetativo con l'obiettivo di studiarne il tempo balsamico.

La seconda parte del progetto di ricerca riguarda lo studio dell'ortica come ingrediente per pasta alimentare speciale con la finalità di valutare il mantenimento di nutrienti primari, polifenoli e carotenoidi dalla materia prima al prodotto elaborato.

L'identificazione e la quantificazione dei composti bioattivi non è sufficiente per avere un quadro preciso dell'efficacia nutrizionale di un prodotto alimentare: diverse classi di composti, tra cui polifenoli e carotenoidi, presenti in alimenti naturali o trasformati hanno effetti potenzialmente nutraceutici, tuttavia gli effetti benefici possono essere limitati dalla scarsa e variabile biodisponibilità <sup>[54,58]</sup>. Il destino delle molecole bioattive assunte attraverso la dieta mediante diverse matrici alimentari è fondamentale nell'ottica dello studio del potenziale effetto funzionale dovuto all'utilizzo di ortica in ambito alimentare.

La bioaccessibilità è la frazione di una molecola che viene rilasciata dalla matrice alimentare nel tratto gastrointestinale, si solubilizza e diventa disponibile per l'assorbimento: la

bioaccessibilità influenza strettamente la biodisponibilità, definita come la frazione di una molecola ingerita disponibile al sito di azione per l'utilizzo nelle normali funzioni fisiologiche. La bioaccessibilità dei composti fenolici e dei carotenoidi caratteristici delle foglie di ortica è stata valutata mettendo a punto ed applicando un modello gastrointestinale dinamico per simulare *in vitro* l'assunzione e la digestione di alcuni prodotti alimentari a base di ortica. Questa parte del lavoro è stata condotta presso il "Laboratory of Food Chemistry and Toxicology" della Universitat de València, Facultat de Farmàcia.

Riguardo ai composti fenolici, i meccanismi fisiologici alla base dei potenziali effetti benefici sono tutt'ora oggetto di studi ed approfondimenti <sup>[41,73,74]</sup> e l'impatto di queste molecole direttamente a livello gastrointestinale è di crescente interesse <sup>[64]</sup>. Per tali motivi è stato valutato l'assorbimento dei composti fenolici a livello delle cellule epiteliali intestinali utilizzando il modello cellulare *Caco-2* ed è stata misurata la capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati nei confronti del radicale anione superossido, utilizzando il metodo della fotochemiluminescenza (Photochem<sup>®</sup>).

La valutazione del destino delle molecole bioattive ingerite grazie all'utilizzo di ortica (*U. dioica*) a fini alimentari completa lo studio di questa pianta erbacea spontanea, utilizzata in passato a scopi fitoalimurgici, come nuovo alimento funzionale.

## 3. METODI

### 3.1 Analisi Bromatologiche

#### 3.1.1 Determinazione del contenuto di umidità

I pesafiltri vuoti e numerati sono stati pesati, riempiti coi campioni, sottoposti a nuova pesata e successivamente posti in stufa a 120°C overnight fino a peso costante. In seguito sono stati raffreddati in un essiccatore fino a raggiungere la temperatura ambiente.

Si procede calcolando il peso secco ed il relativo contenuto in acqua dei campioni. Il risultato dell'umidità è espresso in percentuale peso/peso (% p/p).

#### 3.1.2 Determinazione del contenuto proteico totale

Si esegue con il tradizionale metodo Kjeldahl utilizzando un apparecchio semiautomatico (digestore, distillatore). Inizialmente si procede con la mineralizzazione del campione: un'aliquota di sostanza secca circa esattamente pesata viene posta in un provettone con 0,7g di ossido di rame, 10g di solfato di potassio e 25mL di acido solforico 96%, quindi si lascia mineralizzare per 40 minuti ad una temperatura di 400 °C. Tutto l'azoto presente si trasforma in  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Al termine della mineralizzazione si lascia raffreddare e si aggiungono 10mL di acqua deionizzata e 25mL di tiosolfato di sodio. Il solfato d'ammonio, fatto reagire in eccesso di base forte, libera ammoniacca, che viene distillata in corrente di vapore e raccolta in beuta. In questa beuta, è contenuto  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in quantità e concentrazione nota. Retrotitolando con NaOH 0,5 N si risale alla quantità di azoto, che moltiplicata per un fattore di conversione (6,25) esprime direttamente la quota proteica <sup>[75]</sup>.

#### 3.1.3 Determinazione della frazione minerale totale

Si esegue trattando il campione essiccato circa esattamente pesato in muffola a 570 °C per 6 ore. La parte organica prima carbonizza, poi si ossida completamente ad acqua e anidride carbonica, le quali evaporano mentre la parte inorganica rimane e rappresenta la frazione minerale totale. Il quantitativo di ceneri si ottiene per differenza con la tara iniziale della capsula e rapportando il valore a 100.

### 3.1.4 Determinazione del contenuto minerale specifico

L'analisi della componente minerale si effettua utilizzando uno spettrofotometro atomico Perkin Elmer 1100B in configurazione fiamma ad aria/acetilene. Prima dell'analisi spettrofotometrica il campione deve essere sottoposto a mineralizzazione per mineralizzare tutta la matrice e solubilizzare tutti i metalli presenti sotto forma di sali nitrati.

La mineralizzazione prevede l'aggiunta di 5mL di HNO<sub>3</sub> concentrato al campione circa esattamente pesato, il tutto posto all'interno di provettoni muniti di refrigerante a ricaduta, con lo scopo di condensare i vapori che si formano durante la mineralizzazione e recuperare così eventuali metalli trascinati via dai vapori stessi. I provettoni sono posti all'interno del mineralizzatore che provvederà al loro riscaldamento in 4 step secondo lo schema di temperature sotto riportato:

	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
<b>Step 1</b>	50	20
<b>Step 2</b>	90	20
<b>Step 3</b>	140	20
<b>Step 4</b>	200	80

Tabella 3.1

Parametri del programma di riscaldamento del processo di mineralizzazione.

Al termine del processo di mineralizzazione, tutte le molecole organiche sono ossidate a H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, mentre tutti i metalli presenti si sono convertiti nei rispettivi sali nitrati.

Terminato il processo il sistema viene lasciato raffreddare, si aggiunge 1mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 40% p/v e si esegue uno step di riscaldamento per 20 minuti a 200 °C (fase di strippaggio). Una volta raffreddato il campione mineralizzato viene trasferito in un matraccio da 20mL, lavando bene il provettone con alcune aliquote di acqua deionizzata MilliQ. Si agita per omogeneizzare la soluzione e si filtra il tutto con filtro di carta Whatman senza ceneri. Accanto a questi campioni si prepara un controllo (bianco), applicando la medesima procedura, in assenza di campione. I campioni così preparati e portati a volume di 20mL vengono analizzati, dopo opportuna diluizione, allo spettrofotometro ad assorbimento atomico.

Si prepara per ogni metallo da analizzare una retta di taratura con opportuni standard a concentrazione nota e si costruisce la retta secondo la legge di Lambert-Beer che associa a determinati valori di assorbanza i rispettivi valori di concentrazione. Costruita la retta, generalmente con 3 standard a concentrazione crescente, si possono leggere i campioni mineralizzati opportunamente diluiti. Lo strumento fornirà automaticamente il valore di concentrazione in ppm della soluzione.

## 3.2 Analisi sulla componente ad attività antiossidante

### 3.2.1 Estrazione della frazione ad attività antiossidante

Le molecole ad attività antiossidante caratteristiche delle foglie di *U. dioica* sono principalmente acidi fenolici e flavonoidi [5]. Generalmente queste classi di molecole sono estratte da piante naturali mediante estrazione solido-liquido utilizzando come solventi di estrazione alcoli (metanolo, etanolo), acetone, etere etilico ed acetato di etile. Tuttavia, gli acidi fenolici maggiormente polari non possono essere estratti in maniera esaustiva con miscele di solventi organici e per tale motivo sono raccomandate miscele idroalcoliche [76]. Inoltre, altri fattori come pH, temperatura, rapporto volumetrico campione-solvente ed estrazioni ripetute sono fondamentali riguardo all'esaustività dell'estrazione [76].

#### *Estrazione su foglie di ortica*

In frutta e verdura la maggior parte di composti fenolici si trovano in forma libera oppure in forma coniugate (es: con molecole glicosidiche) di natura solubile. In questo tipo di matrici generalmente la frazione solubile rappresenta almeno l'80% dei composti fenolici totali [77].

Il metodo di estrazione della frazione solubile ad attività antiossidante messo a punto ed applicato prevede la pesata di circa 2g di sostanza fresca all'interno di tubi falcon da 50mL. Si aggiunge 20mL di miscela estrattiva costituita da 80% di MeOH e 20% di H<sub>2</sub>O a cui si aggiunge lo 0,1% v/v di acido formico (HCOOH). Si pone il tutto in agitazione costante a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce per 30 minuti. Al termine si centrifuga a 5000rpm per 5 minuti e si separa il liquido surnatante dal residuo solido. Sul residuo solido si ripetono altri 2 step estrattivi ciascuno di 30' con 15mL di miscela estrattiva. Le fasi liquide vengono unite all'interno di tubi falcon da 50mL e conservate in congelatore a -20°C fino al momento dell'analisi.

Nel caso di estrazione su ortica in polvere ad utilizzo alimentare o nutraceutico si applica il medesimo metodo, riducendo opportunamente la pesata iniziale.

#### *Estrazione su pasta*

Nelle matrici alimentari di origine cerealicola la frazione insolubile costituita dai *bound phenolics* può rappresentare più del 50% della frazione fenolica totale. In queste matrici i composti fenolici si legano chimicamente a molecole di natura polisaccaridica e non vengono estratti mediante le estrazioni solido-liquido con miscele di solventi organici [77].

Per estrarre la frazione insolubile dai campioni di pasta è stato ottimizzato il metodo proposto da Pérez-Jiménez e Saura-Calixto [78]: 5g di pasta sono stati circa esattamente pesati, posti in tubi falcon da 50mL ed estratti tre volte con 15mL di miscela estrattiva idroalcolica (80% MeOH 20% H<sub>2</sub>O addizionata di 0,1% HCOOH) utilizzando un Ultraturrax Ika T18 basic (Staufen, Germania) per 5 minuti. Al termine di ciascuno step il campione è stato centrifugato a 5000rpm per 5 minuti a 4°C ed il surnatante recuperato. Al termine dei 3 step i surnatanti sono stati uniti e collezionati in tubi falcon e rappresentano l'estratto chimico della frazione solubile. Sul residuo dell'estrazione chimica è stata eseguita un'estrazione enzimatica: il pellet viene risospeso con 40mL di acqua e si aggiungo 0,5mL di soluzione gastrica (1g pepsina + 25mL HCl 0,1N) e 2mL di soluzione duodenale (0,1g pancreatina + 0,625g sali biliari + NaHCO<sub>3</sub> 0,5N). Il tutto viene incubato a 37°C per 4h, al termine si centrifuga e si recupera il surnatante. L'estrazione enzimatica viene ripetuta per un totale di 2 step al termine dei quali si uniscono i surnatanti che rappresentano l'estratto enzimatico della frazione insolubile (figura 3.1).

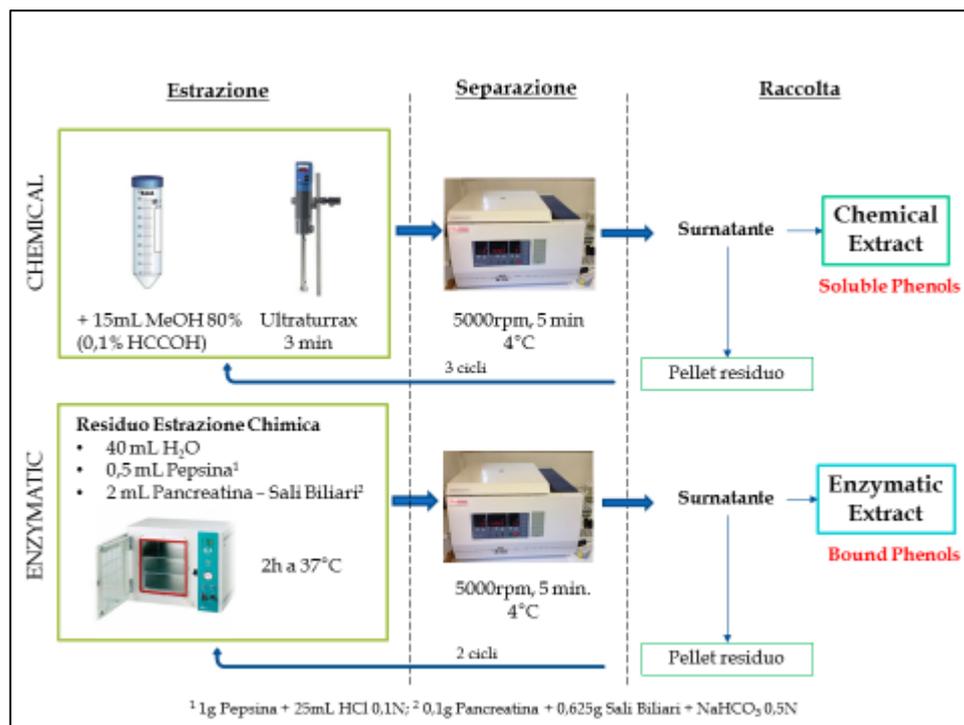


Figura 3.1

Rappresentazione schematica del metodo di estrazione della frazione ad attività antiossidante.

### 3.2.2 Determinazione del contenuto totale di polifenoli

Il contenuto totale di polifenoli è determinato utilizzando il reattivo di Folin–Ciocalteu [79]. Questo reattivo è una miscela di due acidi, molibdenico e tungstico, che si legano ai gruppi -OH presenti, in particolare a quelli fenolici (selezione resa possibile grazie all'aggiunta di una soluzione al 10% di carbonato di sodio). Il legame tra i due componenti forma un complesso di colore blu che può essere dosato spettrofotometricamente. Un'aliquota di estratto è posta in matraccio da 10mL, nel quale sono addizionati 2,5ml di H<sub>2</sub>O deionizzata e 500μL di reattivo di Folin-Ciocalteu. Si lascia riposare al buio per 5 minuti e si aggiungono 2mL di carbonato di sodio al 10% p/v e si porta a volume con acqua deionizzata. Si lasciano al buio per 90 minuti e poi si procede con la lettura spettrofotometrica a 700 nm. Contemporaneamente ai campioni si preparano un bianco e la retta di taratura utilizzando come standard la (+)-catechina in concentrazioni crescenti: 0,5, 1, 2,5, 5 e 7,5ppm. Il contenuto di polifenoli nel campione viene espresso in μg di catechina equivalente per g di campione.

### 3.2.3 Attività antiossidante nei confronti del radicale ABTS

#### *Metodo ABTS*

La capacità antiossidante è determinata in funzione dell'inibizione del radicale stabile ABTS<sup>•+</sup>. L'inibizione del radicale avviene in soluzione acquosa per aggiunta di un estratto alla soluzione contenente il radicale.

Preparazione del radicale ABTS<sup>•+</sup>: si prepara una soluzione 0,07mM di ABTS. 5mL della soluzione sono miscelati a 88 μL di una soluzione K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 140mM. La soluzione ottenuta è diluita sino ad ottenere un'assorbanza di circa 0,700abs a 734 nm. Il radicale preparato è stabile per 12h a temperatura ambiente e protetto della luce.

Preparazione dello standard di riferimento trolox: si prepara una soluzione madre 2mM di trolox in etanolo. Dalla soluzione madre si preparano diluizioni da 0 a 500 μM in etanolo, per preparare la retta di taratura che relaziona la percentuale di inibizione con le concentrazioni di trolox. Un'aliquota pari a 1,40mL di radicale ABTS viene posta in cuvette al quarzo di 10 mm di cammino ottico e si effettua la lettura a 734 nm, ottenendo così il valore dell'assorbanza a tempo zero. Si addizionano 70 μL delle differenti concentrazioni di standard e si misura l'assorbanza dopo 30 minuti. Si ottiene così il valore di assorbanza finale, che viene utilizzata per calcolare la % di inibizione.

$$\% \text{ inibizione ABTS}^{\bullet+} = [(A_{t=0 \text{ min}} - A_{t=30 \text{ min}}) / A_{t=0 \text{ min}}] * 100$$

Dove  $A_{t=0 \text{ min}}$  è l'assorbanza prima dell'aggiunta di standard o campione e  $A_{t=30 \text{ min}}$  è l'assorbanza dopo 30 minuti dall'aggiunta di standard o campione.

Per l'analisi dei campioni sono utilizzati 50 $\mu$ L di estratto opportunamente diluito. Dalla percentuale di inibizione si risale alla capacità antiossidante totale, espressa in  $\mu$ M di trolox equivalente, riferita al radicale ABTS.

#### *Metodo ABTSd*

Nei cereali buona parte dei componenti fenolici ad attività antiossidante sono legati alla frazione polisaccaridica insolubile; queste molecole rientrano nel gruppo dei *bound phenolics*. Per tale motivo questi non risultano estraibili mediante macerazione con miscele di solventi e di conseguenza i metodi di analisi della frazione antiossidante basati su di uno step estrattivo non tengono in considerazione l'apporto di questa frazione insolubile [77]. Recentemente è stato sviluppato un metodo per la determinazione della capacità antiossidante basato sull'interazione diretta tra la matrice ed il radicale ABTS $^{\bullet+}$  (metodo ABTS diretto, ABTSd) [80].

Preparazione del radicale ABTS $^{\bullet+}$ : Si realizza una soluzione acquosa 0,07mM di ABTS $^{\bullet+}$  e la si lascia per 24 ore alla temperatura di 4°C. Trascorso questo tempo si addiziona persolfato di potassio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 140mM, che serve per attivare il radicale, il quale viene poi opportunamente diluito con etanolo.

La procedura consiste nel pesare circa esattamente 50mg di matrice (sostanza secca) alla quale si aggiungono 4,5mL di EtOH 50% e 4,5mL di soluzione ABTS $^{\bullet+}$  e si lascia al buio per 30 minuti. Terminata l'attesa si centrifuga a 4000rpm per 2 minuti, quindi si preleva il surnatante e si effettua la misurazione dell'assorbanza con lo spettrofotometro a  $\lambda = 734\text{nm}$ . Si calcola la % di inibizione da cui si ricava la capacità antiossidante espressa in funzione dello standard di riferimento trolox, usato per la costruzione della retta di taratura.

$$\% \text{ inibizione ABTS}^{\bullet+} = [(A_{t=0 \text{ min}} - A_{t=30 \text{ min}}) / A_{t=0 \text{ min}}] * 100$$

Il campione solido deve essere finemente macinato prima dell'analisi ed eventualmente diluito con cellulosa microcristallina, un solido inerte che non reagisce con il radicale ABTS, per rientrare nell'intervallo della retta di taratura.

### 3.2.4 Attività antiossidante nei confronti del radicale DPPH

Questo metodo è simile al metodo ABTS ma cambia il tipo di radicale. Il principio è l'inibizione del radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH<sup>•</sup>) da parte delle sostanze antiossidanti.

Preparazione del radicale DPPH: si prepara una soluzione 0,06mM di DPPH in metanolo. Il radicale preparato è stabile per 12h a temperatura ambiente e protetto della luce.

Preparazione dello standard di riferimento trolox: si prepara una soluzione madre 2mM di trolox in metanolo. Dalla soluzione madre si preparano diluizioni da 0,05 a 1mM in metanolo, utilizzate per effettuare la retta di taratura che relaziona la percentuale di inibizione con le concentrazioni di trolox. Un'aliquota pari a 1,45mL di radicale DPPH è posta in cuvette di quarzo di 10 mm di cammino ottico e si effettua la lettura a 515 nm, ottenendo così il valore dell'assorbanza al tempo zero. Si aggiungono 50 µL delle differenti concentrazioni di standard e si misura l'assorbanza dopo 15 minuti. Si ottiene così il valore di assorbanza utilizzata per calcolare la % di inibizione secondo la formula:

$$\% \text{ inibizione DPPH} = [(A_{t=0 \text{ min}} - A_{t=15 \text{ min}}) / A_{t=0 \text{ min}}] * 100$$

Dove  $A_{t=0 \text{ min}}$  è l'assorbanza prima dell'aggiunta di standard o campione e  $A_{t=15 \text{ min}}$  è l'assorbanza dopo 30 minuti dall'aggiunta di standard o campione.

Allo stesso modo si procede aggiungendo alla soluzione di DPPH 50µL di estratto opportunamente diluito. Ottenuta la percentuale di inibizione si risale alla capacità antiossidante dei campioni nei confronti del radicale DPPH, espressa in mM di trolox equivalenti.

### 3.2.5 Determinazione della capacità antiossidante nei confronti del radicale anione superossido – Metodo della Fotochemiluminescenza (Photochem<sup>®</sup>)

Il metodo della fotochemiluminescenza (PCL) consente la quantificazione della capacità antiossidante di sostanze pure ed estratti liquidi di matrici complesse di varia origine (sintetica, vegetale, animale e umana), in fase lipidica (metodo ACL, Antioxidant Capacity Lipid soluble) e in fase acquosa (metodo ACW, Antioxidant Capacity Water soluble). Il metodo PCL è basato su un'accelerazione delle reazioni ossidative *in vitro* di circa 1000 volte rispetto alle condizioni normali grazie alla presenza di un opportuno fotosensibilizzatore. La metodologia sfrutta le caratteristiche di Photochem<sup>®</sup>, uno strumento commercializzato da Analytic Jena AG (Jena, Germania) e basato sull'autossidazione fotoindotta del luminol accompagnata da un'intensa chemiluminescenza. L'esposizione di una sostanza fotosensibile (presente nel kit di lavoro) ad una radiazione UV, genera radicali liberi, i quali reagendo con la sostanza chemiluminescente

(luminol), emettono fotoni misurati da un fotomoltiplicatore che quantifica la produzione di radicali liberi.



Figura 3.2

Il sistema Photochem® (Analytic Jena; AG, Germania).

La presenza di antiossidanti inibisce l'autossidazione del luminol, dovuta all'interazione con il radicale  $O_2^{\bullet-}$  generato per via fotochimica. In presenza di sostanze che reagiscono come trappole per radicali l'intensità della fotochemiluminescenza viene attenuata in funzione della loro concentrazione [81,82].

In base al sistema di misurazione utilizzato (PCL-ACL o PCL-ACW) si ottengono due diverse curve. Utilizzando il sistema ACW si otterranno delle curve con una tipica fase iniziale in cui la chemiluminescenza non è registrabile (fase Lag). Maggiore è la concentrazione in antiossidanti del campione più lunga è la fase Lag e la lunghezza della fase viene determinata dalla tangente al punto di flesso delle risultanti curve. Il punto dove la tangente interseca l'asse delle ascisse definisce la durata della fase Lag.

A differenza del sistema precedentemente descritto, il metodo ACL non presenta una fase Lag: la curva parte istantaneamente e si presenta come una tipica curva di saturazione raggiungendo il plateau dopo pochi minuti. In questo caso la capacità antiossidante viene misurata dall'area sottesa alla curva a confronto con il bianco (Figura 3.3).

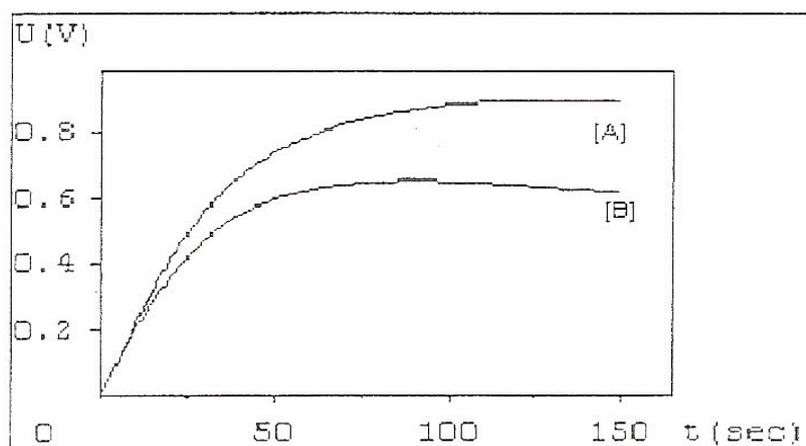


Figura 3.3

Esempio di curva di misurazione con il metodo PCL-ACL.

Il test di fotochemiluminescenza è stato eseguito secondo la metodica descritta da Popov e Lewin <sup>[83]</sup>. La composizione della miscela di reazione per il metodo PCL-ACL è riportata in tabella 3.2.

Reagente	1	2	3-WS	4-WS	Campione
<b>Bianco</b>	2300	200	25	0	0
<b>Calibrazione</b>	2300 - X	200	25	X	0
<b>Misure</b>	2300 - Y	200	25	0	Y

Tabella 3.2

Composizione della miscela di reazione del metodo PCL-ACL in  $\mu\text{L}$ . X = quantità di standard per la retta di taratura. Y = quantità di campione.

I reagenti 1, 2, 3 e 4 sono forniti in originale dalla ditta Analytic Jena (Germania). Il reagente 3-WS (Luminol Work Solution) è preparato aggiungendo  $750\mu\text{L}$  di reagente 2 al reagente 3. Tale soluzione è sufficiente per 40 misurazioni. Il reagente 4-WS (Trolox Work Solution) è preparato aggiungendo  $500\mu\text{L}$  di reagente 1 al reagente 4, con successiva diluizione 1:100. La durata dell'analisi è di 180 secondi; la capacità antiossidante viene misurata dall'integrale al di sotto della curva ed è espressa in nM trolox equivalente.

### 3.3 Analisi cromatografiche

#### 3.3.1 Analisi dei composti fenolici in HPLC-UV e LC-ESI-MS

I principali composti fenolici presenti nelle foglie di *U. dioica* sono stati determinati quantitativamente utilizzando un HPLC Shimadzu serie VP dotato di forno termostato, pompa quaternaria e detector UV a lunghezza d'onda fissa. Per la separazione è stata utilizzata una colonna cromatografica Kinetex C18 150 x 4,6 mm (Phenomenex), con un diametro dei pori interni di 5µm e dotata di filtro pre-colonna.

Le condizioni cromatografiche sviluppate e applicate sono riportate in tabella 3.3.

<b>Fase mobile</b>	A: H <sub>2</sub> O (0,1% acido formico) B: Acetonitrile
<b>Gradiente</b>	0': A 90%; B 10% 0'-25': A 75%; B 25% 25'-26': A 5%; B 95% 26'-30': isocratica
<b>Tempo di ricondizionamento</b>	6'
<b>Durata corsa</b>	36'
<b>Flusso</b>	0,800 mL/min
<b>Temperatura</b>	30°C
<b>λ detector</b>	352
<b>Iniezione</b>	10 µL

Tabella 3.3

Metodo HPLC-UV per l'analisi dei composti fenolici caratteristici di ortica.

La quantificazione dei composti fenolici è stata effettuata sugli estratti della componente antiossidante (sezione 3.2.1): su di un'aliquota opportuna il solvente è stato evaporato (Rotavapor) ed il residuo recuperato con un volume definito di fase mobile. Prima dell'iniezione in HPLC il campione è stato filtrato con filtri Minisart RC 25 con diametro pori di 0,45µm.

I dati cromatografici sono stati elaborati con il software Shimadzu Class-VP versione 7.2.1 SP1. L'analisi qualitativa è stata condotta in HPLC-UV per confronto dei tempi di ritenzione con quelli degli standard analitici a disposizione.

L'analisi qualitativa è stata completata mediante analisi LC-ESI-MS utilizzando un HPLC Agilent 1200 dotato di degasatore, pompa binaria, autocampionatore termostato ed accoppiato con rivelatore di massa a trappola ionica 6310A con sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI). Le condizioni cromatografiche applicate e la colonna utilizzata sono le stesse dell'analisi HPLC-UV.

Il volume di iniezione per l'analisi MS è di 5µL ed all'uscita della colonna cromatografica il flusso è sottoposto a split 1:5. La temperatura di desolvatazione impostata a 350°C, con voltaggio del capillare a 3500 V e azoto utilizzato come *drying gas* (flusso 8 L/min) e *nebulising gas* (pressione 25psi). L'acquisizione degli spettri di massa è stata condotta in ionizzazione negativa, con full-scan mode nel range  $m/z$  100-800 Da. Gli spettri MS<sup>n</sup> sono stati acquisiti automaticamente con elio come gas di collisione.

### 3.3.2 Analisi dei carotenoidi in HPLC-UV

#### *Estrazione*

Diversi metodi estrattivi sono stati studiati e messi a punto per l'estrazione dei carotenoidi da differenti matrici alimentari [84]. I caroteni si trovano generalmente in forma libera nelle matrici alimentari, mentre le xantofille possono trovarsi in forma libera oppure esterificate con acidi grassi. L'esterificazione ne aumenta la stabilità [84]. La saponificazione basica ad alte temperature permette l'idrolisi dei carotenoidi esterificati, semplificandone l'analisi qualitativa e quantitativa in HPLC [85]. La reazione di saponificazione deve essere effettuata sulla matrice solida o liquida e successivamente, mediante un'estrazione liquido-liquido si separa la frazione organica, contenente i carotenoidi in forma libera, dalla fase acquosa. La saponificazione permette inoltre di rimuovere le clorofille, interferenti dell'analisi cromatografica [33], [84].

Il metodo estrattivo applicato in questo lavoro è stato modificato partendo dalle condizioni proposte da Panfili *et al.* [85]. La reazione di saponificazione è stata effettuata all'interno di tubi falcon da 50mL. Ciascun campione è stato essiccato in stufa a 60°C overnight prima di essere sottoposto al metodo estrattivo.

Al campione secco circa esattamente pesato sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- 5mL Pirogallolo (60g/L in EtOH);
- 2mL EtOH assoluto;
- 2mL NaCl (10g/L);
- 2mL KOH (600g/L).

Il tutto è stato sottoposto ad agitazione in Ultraturrax® per 3 minuti e successivamente in agitazione per 45 minuti a 70°C all'interno di un bagnetto agitante termostato (Memmert, Schwabach, Germania).

Al termine della reazione i tubi vengono raffreddati in ghiaccio per 5 minuti ed alla soluzione vengono aggiunti 15mL di NaCl (10g/L). Successivamente l'estratto saponificato viene sottoposto ad ulteriore estrazione liquido-liquido: vengono aggiunti 15mL di miscela Esano/Acetato d'Etile (9:1) e si separano le fasi in imbuto separatore. Alla fase acquosa vengono aggiunti altri 15mL di miscela organica, si separano le fasi e si uniscono le due fasi organiche. L'estratto è stato sottoposto ad evaporazione del solvente e recupero con volume noto di acetonitrile. Prima dell'iniezione in HPLC il campione è stato filtrato con filtri Minisart RC 25 con diametro pori di 0,45µm.

#### *Analisi cromatografica*

<b>Fase mobile</b>	A: H <sub>2</sub> O B: Acetonitrile C: Tetraidrofurano (THF)
<b>Gradiente</b>	0': A 30%; B 50%; C 20% 0'-12': A 5%; B 50%; C 45% 12'-20': A 5%; B 20%; C 75% 20'-21': A 30%; B 50%; C 20%
<b>Tempo di ricondizionamento</b>	6'
<b>Durata corsa</b>	27'
<b>Flusso</b>	0,700 mL/min
<b>Temperatura</b>	30°C
<b>λ detector</b>	450
<b>Iniezione</b>	10 µL

Tabella 3.4

Metodo HPLC-UV per l'analisi dei carotenoidi.

L'analisi dei principali carotenoidi è stata eseguita utilizzando un HPLC Shimadzu serie VP dotato di forno termostato, pompa quaternaria e detector UV a lunghezza d'onda fissa. Per la

separazione è stata utilizzata una colonna cromatografica Kinetex C18 150 x 4,6 mm (Phenomenex), con un diametro dei pori interni di 5 $\mu$ m e dotata di filtro pre-colonna.

Le condizioni cromatografiche sono state sviluppate partendo da indicazioni di letteratura [84] e sono riportate in tabella 3.4.

I dati cromatografici sono stati elaborati con il software Shimadzu Class-VP versione 7.2.1 SP1. L'analisi qualitativa è stata condotta per confronto dei tempi di ritenzione con quelli degli standard analitici corrispondenti di luteina e  $\beta$ -carotene.



Figura 3.4

Immagine dello strumento HPLC-UV utilizzato per l'analisi cromatografica dei composti fenolici e dei carotenoidi.

### 3.4 Studi di Bioaccessibilità e trasporto transepiteliale

Lo studio della bioaccessibilità di composti fenolici e carotenoidi su prodotti alimentari a base di ortica è stata eseguita applicando un modello dinamico in modo da simulare le fasi della digestione gastrointestinale secondo il metodo proposto da Ferrer *et al.* [86]. Relativamente ai composti fenolici è stato inoltre studiato il trasporto transepiteliale attraverso il modello cellulare *Caco-2*.

Gli studi di bioaccessibilità e trasporto transepiteliale si sono svolti presso il “Laboratory of Food Chemistry and Toxicology” dell’Universitat de València, Facultat de Farmàcia, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Publica, Ciències de l’Alimentació, Toxicologia Y Medicina Legal.

#### 3.4.1 Modello gastrointestinale dinamico *in vitro*

La digestione è condotta all’interno di un biofermentatore Infors (Bottmingen, Svizzera) con 5L di capacità totale (Fig. 3.5) dotato di due turbine ( $\varnothing$  45 mm) che permettono il mantenimento di una agitazione costante e non turbolenta, ideale per simulare i movimenti fisiologici a livello gastrointestinale. Durante tutto la simulazione l’agitazione è mantenuta a 50rpm e la temperatura di incubazione a 37°C. Il sistema è dotato inoltre di due pompe peristaltiche per l’aggiunta di una soluzione acida (HCl 0,5N) e di una soluzione basica (NaHCO<sub>3</sub> 0,5N): il controllo del pH avviene in tempo reale attraverso un elettrodo immerso nella soluzione ed un software collegato allo strumento. Il software Iris 5.0 (Infors AG CH-4103, Bottmingen, Svizzera) permette il controllo in tempo reale della temperatura del sistema, della velocità di agitazione e del pH. Lo strumento è dotato infine di un sistema di iniezione soluzioni e di un sistema di prelievo per campionamenti.



Figura 3.5

Biofermentatore utilizzato per la digestione dinamica *in vitro*.

### *Fase salivare*

Il campione opportunamente preparato viene posto all'interno di appositi sacchetti di plastica e vengono aggiunti 60mL di saliva artificiale condizionata a 37°C e preparata nel seguente modo:

- 10mL KCl (89,6 g/L)
- 10mL KSCN (20 g/L)
- 10mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (88.8 g/L)
- 10 mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (57 g/L)
- 1.7 mL NaCl (175,3 g/L)
- 20 mL NaHCO<sub>3</sub> (84,7 g/L)
- 8 mL di urea (25 g/L)
- 290 mg of  $\alpha$ -amylase (Sigma-Aldrich)
- si porta a volume 500mL con H<sub>2</sub>O deionizzata.

Il tutto viene posto all'interno di uno Stomacher IUL Instrument (Barcellona, Spagna) e omogenizzato per 30s. Al termine il contenuto del sacchetto viene versato all'interno del biofermentatore (Fig. 3.5) e vengono aggiunti 900mL di acqua a 37°C.

### *Fase gastrica*

Tramite il software si imposta l'agitazione a 50rpm e la temperatura del sistema a 37°C. Questi valori rimarranno costanti durante tutta la simulazione. Il pH viene impostato ad un valore pari a 2,5 ed al raggiungimento dell'ambiente acido vengono aggiunti 5mL di soluzione gastrica attraverso l'apposito sistema di iniezione. La soluzione gastrica è preparata dissolvendo 1g di pepsina (674 U/mg, P7000, Sigma Aldrich) in 25mL di HCl 0,1N. Al termine dell'incubazione di 2h un aliquota di 50mL viene prelevata e centrifugata a 4000rpm per 5 minuti a 4°C. Il surnatante viene separato dal pellet residuo e rappresenta il fluido simulato al termine della fase gastrica.

### *Fase duodenale*

Il pH viene impostato a 6,8 ed al suo raggiungimento vengono aggiunti 12,5mL di soluzione duodenale preparata dissolvendo 0,1g di pancreatina (762 U/mg, P1750, Sigma Aldrich), 0,625g di sali biliari (B8631, Sigma Aldrich) in 25mL di NaHCO<sub>3</sub> 0,1N. Il tutto viene incubato per 2h ed al termine un'aliquota di 50mL viene prelevata e centrifugata a 4000rpm per 5 minuti a 4°C. Il surnatante viene separato dal pellet residuo e rappresenta il fluido simulato al termine della fase duodenale.

### Simulazione metabolismo a livello del colon

La simulazione del metabolismo a livello della flora batterica intestinale è stata eseguita all'interno del biofermentatore aggiungendo 10mL di soluzione batterica alla concentrazione di  $10^{14}$  CFU/mL e mantenendo il tutto in agitazione per 48h. La soluzione batterica è costituita da un mix di 13 colture di batteri probiotici: *Lactobacillus animalis* CECT 4060T, *Lb. casei* CECT 4180, *Lb. casei rhamnosus* CECT 278T, *Lb. plantarum* CECT 220, *Lb. ruminis* CECT 4061T, *Lb. casei casei* CECT 277, *Bifidobacterium breve* CECT 4839T, *Bif. adolescentis* CECT 5781T and *Bif. bifidum* CECT 870T, *Corinebacterium vitaeruminis* CECT 537, *Streptococcus fecalis* CECT 407, *Eubacterium crispatus* CECT 4840 and *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1324, ottenuti da Spanish Type Culture Collection (CECT Valencia, Spagna). La soluzione viene conservata a  $-80^{\circ}\text{C}$  e, quando necessario, si eseguono almeno due ripristini in terreno MRS broth in condizioni di anaerobiosi.

Durante le 48h sono stati eseguiti 3 campionamenti a tempi di 2h, 24h e 48h. Le aliquote di 50mL vengono prelevate e centrifugate a 4000rpm per 5 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il surnatante viene separato dal pellet residuo e rappresenta il fluido simulato del metabolismo colonico utilizzabile per la determinazione della bioaccessibilità durante tempi diversi di metabolismo batterico intestinale.

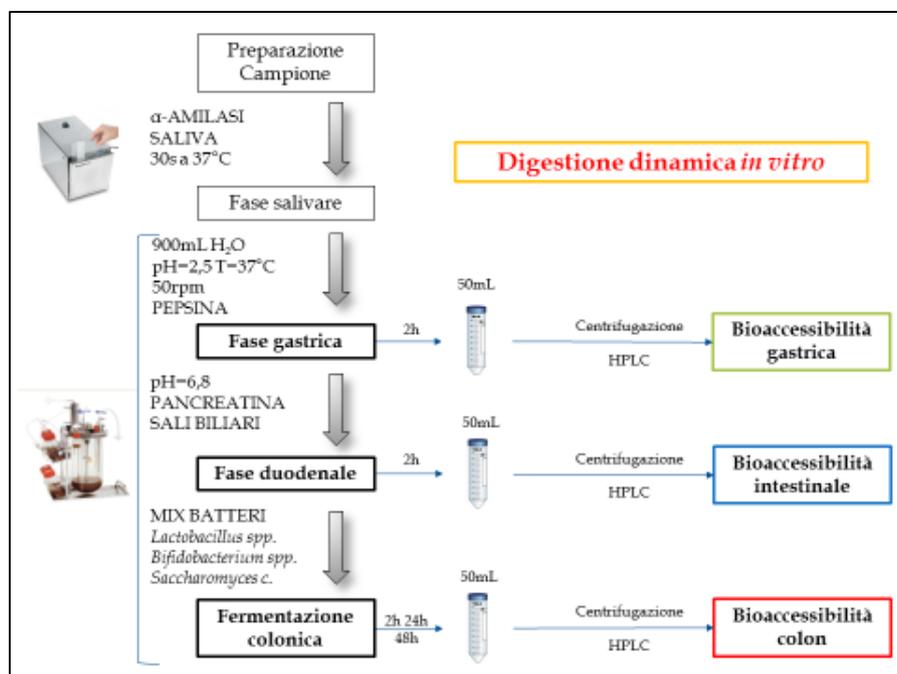


Figura 3.6

Rappresentazione schematica del modello gastrointestinale dinamico *in vitro* per la determinazione della bioaccessibilità dei composti fenolici.

### 3.4.2 Studio del trasporto transepiteliale mediante modello cellulare *Caco-2 monolayer*

Le *Caco-2* sono una linea di cellule intestinali umane che, differenziate in coltura per 20 giorni, acquisiscono caratteristiche morfologiche e funzionali tipiche degli enterociti dell'intestino tenue. Il modello di cellule intestinali umane *Caco-2* è tra quello più largamente utilizzato per studi di trasporto e tossicità di farmaci, nutrienti e xenobiotici a livello intestinale. Le cellule *Caco-2*, originariamente isolate da adenocarcinoma del colon, se opportunamente sottoposte a coltura differenziano in un monostrato di cellule polarizzate, accoppiate da giunzioni, che esprimono molte caratteristiche morfologiche e funzionali dell'epitelio assorbente dell'intestino tenue [62,87].

Lo studio del trasporto transepiteliale è stato eseguito sui fluidi duodenali simulati per determinare l'assorbimento a livello dell'intestino tenue.

Le cellule *Caco-2* sono state coltivate in monostrato utilizzando piatti di coltura in polistirene di 9 cm<sup>2</sup> riempiti con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a cui sono aggiunti 25mM HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico), 1% NEAA (Aminoacidi non essenziali), 100 U/mL di penicillina, 100 mg/mL di streptomina, 2,5 mg/mL amfotericina B e il 10% FCS inattivato al calore. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Le condizioni di incubazione sono le seguenti: pH 7.4, 37°C e 5% CO<sub>2</sub> in un ambiente di umidità relativa 95%.

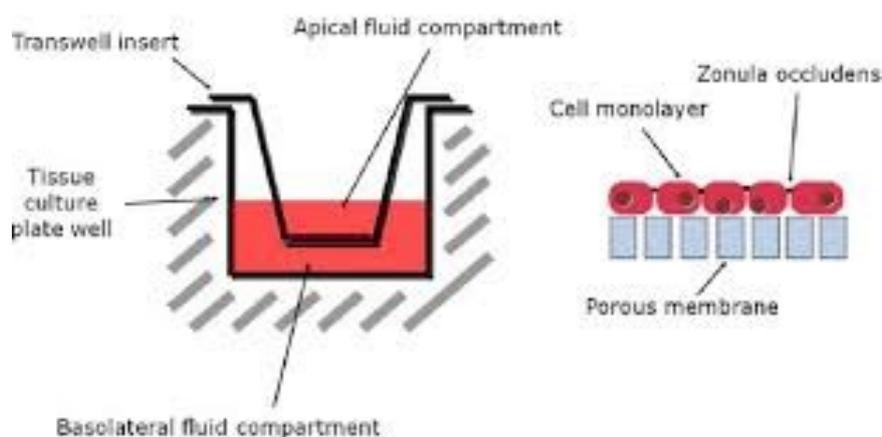


Figura 3.7

Rappresentazione del modello *Caco-2 monolayer* per lo studio del trasporto transepiteliale.

Le cellule *Caco-2* sono state seminate in un supporto permeabile Transwell (Corning, NY, USA) di 12mm di diametro munito di 6 pozzetti ( $25 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup>), con una dimensione dei pori di 0,4 mm (figura 3.7). Le cellule sono state coltivate per 21 giorni fino a differenziazione completa ed il medio di coltura è stato rinnovato ogni 2-3 giorni. Al termine, il medio di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lavate due volte con tampone HBSS-HEPES (buffer di trasporto). Al comparto basolaterale sono stati aggiunti 0,5mL di buffer di trasporto, mentre al comparto apicale si aggiungo 1,5mL di fluido duodenale simulato diluito 1:2 con tampone HEPES-HBSS.

Per determinare il trasporto transepiteliale sono stati eseguiti campionamenti del fluido basolaterale a tempi di 1h, 2h, 3h e 4h. Al termine delle 4 ore di incubazione è stato campionato anche il fluido apicale.

### 3.4.3 Analisi HPLC

#### *Bioaccessibilità e trasporto transepiteliale composti fenolici*

I fluidi gastrointestinali simulati sono stati conservati in congelatore a -20°C fino al momento dell'analisi cromatografica. Per ciascun campionamento (fase gastrica, fase duodenale, fase colon 2h, 24h e 48h) un'aliquota di 2mL viene filtrata direttamente su filtri per HPLC con diametro 0,22 µm ed analizzata in HPLC-UV applicando le condizioni analitiche descritte in tabella 3.3. I campionamenti del fluido basolaterale eseguiti durante le 4h di incubazione ed il campionamento del fluido apicale sono stati conservati a -20°C fino all'analisi cromatografica. Quest'ultima è stata eseguita direttamente sulle aliquote campionate in seguito a filtrazione su filtri per HPLC (diametro 0,22µm).

L'identificazione e l'analisi quantitativa di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina è stata realizzata utilizzando un HPLC Merck (Darmstadt, Germany) Hitachi LaChrom Elite, costituito da pompa ternaria, autocampionatore e detector diode array (DAD) L-7455; per la separazione è stata utilizzata una colonna C18 Teknokroma Brisa LC (150 × 4.6 mm, 3µm). I dati sono stati acquisiti mediante il software Merck – Hitachi Chromatography Data Station Software D-7000.

La determinazione della bioaccessibilità per ciascuna fase della digestione simulata si calcola riportando il quantitativo presente alla quantità inizialmente ingerita. Ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

### *Bioaccessibilità carotenoidi*

Per ciascun campionamento (fase gastrica, fase duodenale, fase colon 2h, 24h e 48h) i carotenoidi vengono estratti mediante un'estrazione liquido-liquido secondo il seguente protocollo: a 15mL di fluido simulato sono aggiunti 2,5mL di NaCl (10 g/L) e 15mL di EtOH 95%. Il tutto viene agitato manualmente e si aggiungono 15mL di miscela Esano/Acetato d'Etile 9:1 addizionata con 0,1% p/v di BHT. Si separano le fasi in imbuto separatore e sulla fase acquosa si ripete l'estrazione con altri 15mL di miscela organica. Le fasi organiche vengono unite ed il solvente evaporato al rotavapor. Il residuo è recuperato con un volume noto di acetonitrile e purificato su filtri per HPLC con diametro 0,22 µm. Infine il campione viene iniettato in HPLC-UV secondo il metodo descritto nella sezione 3.3.2. La determinazione della bioaccessibilità per ciascuna fase della digestione simulata si calcola riportando il quantitativo presente alla quantità inizialmente ingerita.

### **3.5 Analisi Statistica**

I dati raccolti sono stati analizzati statisticamente utilizzando il programma di analisi statistica SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). I valori sono stati considerati significativi per  $p < 0.05$ . In base al set di dati da analizzare sono stati utilizzati i seguenti test parametrici e non parametrici: ANOVA, test di Kruskal-Wallis e test post-hoc di Tukey.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Caratterizzazione di Ortica spontanea

Lo studio sull'ortica come pianta alimurgica è cominciato dalla caratterizzazione dell'ortica spontanea da cui non si può risalire con certezza alla varietà, dato che la *dioica* è certamente la più diffusa, ma può trovarsi in forme ibride a causa della riproduzione spontanea. La caratterizzazione iniziale ha riguardato l'analisi bromatologica della materia prima ad utilizzo alimurgico, le foglie apicali, che a fini alimentari venivano raccolte principalmente nel periodo primaverile <sup>[88]</sup>.

I campioni di ortica spontanea (wild) sono stati raccolti manualmente nel mese di Aprile 2013 in 4 comuni (tabella 4.1): il campionamento presso il comune di Malalbergo (BO) è stato effettuato in due zone (Argine ed Oasi) per un totale di 5 gruppi di zone geografiche distinte (Gruppi). In ciascuna zona geografica sono stati effettuati un minimo di 2 campionamenti per un totale di 14 campioni di Ortica spontanea.

Sigla	Zona geografica	Note	Gruppo
W1	Malalbergo (BO)	Zona Argine	M
W2	Malalbergo (BO)	Zona Argine	M
W3	Malalbergo (BO)	Zona Argine	M
W4	Malalbergo (BO)	Zona Argine	M
W5	Malalbergo (BO)	Zona Oasi	MT
W6	Malalbergo (BO)	Zona Oasi	MT
W7	Malalbergo (BO)	Zona Oasi	MT
W8	Malalbergo (BO)	Zona Oasi	MT
W9	Santa Maria in Punta (RO)	Argine Fiume Po	SMP
W10	Santa Maria in Punta (RO)	Argine Fiume Po	SMP
W11	Ferrara	Città	SG
W12	Ferrara	Città	SG
W13	Castelmassa (RO)	Argine Fiume Po	CSM
W14	Castelmassa (RO)	Argine Fiume Po	CSM

Tabella 4.1

Elenco campioni di ortica spontanea raccolti durante il mese di Aprile 2013.

Durante ciascun campionamento sono state raccolte le foglie apicali, staccandole manualmente dal fusto. Per ciascuna zona di campionamento sono state raccolte foglie da differenti piante per un quantitativo di circa 1Kg di materiale fresco, in modo da eseguire un campionamento rappresentativo. I campioni raccolti sono stati conservati in congelatore a -20°C fino al momento delle analisi. La sostanza secca è stata ottenuta essiccando in stufa ciascun campione a 120°C per circa 16 ore.

La fase iniziale di messa a punto dei metodi analitici è stata condotta separatamente su un campione di ortica spontanea raccolto presso Sant'Agostino (FE) a Marzo 2013, denominato campione W0. Il campione W0 è stato usato esclusivamente per la messa a punto dei metodi di analisi bromatologica e per lo studio delle migliori condizioni di estrazione della componente ad attività antiossidante.

#### 4.1.1 Analisi bromatologica

L'analisi bromatologica su 14 campioni di ortica ha riguardato la determinazione del contenuto di umidità, del contenuto proteico totale attraverso il metodo ufficiale Kjeldhal, della frazione minerale totale e della composizione specifica in macroelementi ed oligoelementi.

In tabella 4.2 è riportato il contenuto di umidità, proteine totali e frazione minerale totale. I risultati sono espressi per gruppo di campioni.

<b>Gruppo</b>	<b>Umidità</b> (g/100g peso fresco)			<b>Proteine</b> (g/100g peso secco)			<b>Frazione minerale totale</b> (g/100g peso secco)		
<b>M</b>	80,10	±	0,83	27,81	±	0,02	15,68	±	0,04
<b>MT</b>	77,82	±	2,26	24,45	±	2,39	19,18	±	1,49
<b>SMP</b>	82,40	±	0,05	27,76	±	0,26	16,27	±	0,24
<b>SG</b>	76,19	±	0,89	21,76	±	2,21	13,00	±	1,72
<b>CSM</b>	77,05	±	1,03	26,88	±	0,74	18,34	±	0,04

Tabella 4.2

Caratterizzazione bromatologica in campioni di ortica spontanea raggruppati per zona geografica di provenienza (media ± ds).

Il contenuto di umidità medio per i gruppi di campioni oggetto di analisi è compreso tra il 76,19% del gruppo SG e l'82,40% del gruppo SMP. Il gruppo SG presenta inoltre il minor contenuto proteico totale (21,6% su peso secco) ed il minor contenuto in ceneri (13,00% su

peso secco). Analizzando statisticamente tutti i 14 campioni oggetto di studio il contenuto di umidità medio risulta essere di  $78,5 \pm 2,5\%$ , il contenuto proteico medio su peso secco di  $25,4 \pm 2,7\%$ , il contenuto totale in ceneri di  $17,3 \pm 2,5\%$ . Confrontando statisticamente i risultati in base ai gruppi di provenienza mediante applicazione del test non parametrico di Kruskal-Wallis (SPSS® 22.0), risultano differenze statisticamente significative riguardo al contenuto totale di umidità ( $p=0,009$ ) ed al contenuto totale di ceneri ( $p=0,031$ ).

L'analisi specifica della frazione minerale indica che le foglie di ortica spontanea sono ricche in particolare di potassio, calcio e magnesio, tutti presenti nell'ordine di alcuni mg su g di sostanza secca (tabella 4.3). Il sodio invece è contenuto nell'ordine di  $\mu\text{g/g}$ . L'alto contenuto di potassio ed il basso contenuto in sodio è un indicatore a favore dell'effetto protettivo potenziale delle foglie nei confronti di disfunzioni cardiovascolari e neoplastiche [1].

<b>Gruppo</b>	<b>Potassio</b> (mg/g secco)	<b>Calcio</b> (mg/g secco)	<b>Magnesio</b> (mg/g secco)	<b>Sodio</b> ( $\mu\text{g/g}$ secco)
<b>M</b>	34,39 ± 2,73	23,70 ± 4,51	4,43 ± 0,40	21,82 ± 18,22
<b>MT</b>	33,33 ± 3,92	29,83 ± 4,33	4,07 ± 0,64	39,61 ± 28,10
<b>SMP</b>	38,07 ± 0,44	28,46 ± 1,75	4,09 ± 0,11	42,18 ± 2,84
<b>SG</b>	33,90 ± 0,39	16,47 ± 0,37	2,20 ± 0,19	58,39 ± 40,90
<b>CSM</b>	32,52 ± 0,54	27,72 ± 0,31	3,87 ± 0,17	29,72 ± 2,18

Tabella 4.3

Contenuto di macroelementi in campioni di ortica spontanea raggruppati per zona geografica di provenienza (media  $\pm$  ds).

Il calcio è il minerale presente in maggior quantità nell'organismo, il 99% si trova in denti e ossa, la quota libera rimanente partecipa a numerose funzioni; coagulazione, eccitabilità neuromuscolare, contrazione muscolare, liberazione di insulina e come catalizzatore. L'assorbimento intestinale è regolato dalla vitamina D. L'integrazione di calcio è utile in caso di osteoporosi, ipertensione e gravidanza. Le principali fonti sono acqua, latte e derivati, ortaggi a foglia verde e cereali. Nel mondo vegetale però sono presenti fattori antinutrizionali che ne pregiudicano l'assorbimento come l'acido fitico e ossalico. Anche dosi elevate di Mg, Zn e fibre possono influenzare negativamente l'assorbimento [38].

Il magnesio è un minerale molto importante che partecipa a centinaia di reazioni enzimatiche che regolano molte funzioni cellulari come la produzione di energia, la sintesi di proteine e la

moltiplicazione cellulare. Attiva la pompa sodio-potassio, regola il battito cardiaco e la pressione arteriosa, mantiene calcio e fosforo in soluzione prevenendo a formazione di calcoli renali. La carenza porta a una maggiore predisposizione verso cardiopatie, ipertensione, calcoli renali, cancro, insonnia, sindrome premestruale, crampi, affaticamento, irritabilità, disturbi della conduzione nervosa. Calcio, diuretici, insulina e digitalici influiscono negativamente sull'assorbimento del magnesio [38].

Dai risultati espressi in tabella 4.4 si evidenzia inoltre il buon contenuto delle foglie di ortica in alcuni oligoelementi essenziali per alcune funzioni fisiologiche, in particolare ferro e manganese. Il contenuto specifico minerale sui campioni analizzati è risultato paragonabile a quelli precedentemente disponibili in letteratura scientifica [28].

<b>Gruppo</b>	<b>Ferro</b> (µg/g secco)	<b>Manganese</b> (µg/g secco)	<b>Rame</b> (µg/g secco)	<b>Zinco</b> (µg/g secco)
<b>M</b>	385,4 ± 58,1	52,67 ± 8,43	8,42 ± 2,04	5,28 ± 0,71
<b>MT</b>	159,2 ± 59,3	23,22 ± 6,38	11,17 ± 2,06	4,57 ± 0,91
<b>SMP</b>	103,8 ± 0,3	37,60 ± 1,11	15,17 ± 0,63	6,56 ± 0,44
<b>SG</b>	102,3 ± 19,9	25,62 ± 2,19	10,01 ± 0,43	6,59 ± 0,29
<b>CSM</b>	324,3 ± 9,5	60,06 ± 0,07	13,27 ± 0,49	6,00 ± 0,82

Tabella 4.4

Contenuto di oligoelementi in campioni di ortica spontanea raggruppati per zona geografica di provenienza (media ± ds).

Il Ferro è costituente essenziale dell'emoglobina e della mioglobina. E' deputato al trasporto di ossigeno e biossido di carbonio, è costituente essenziale di enzimi che svolgono un ruolo chiave nella produzione di energia, nella sintesi di DNA, di collagene, nella produzione di anticorpi, nella conversione del βcarotene in vitamina A [38].

Il Manganese opera in molti sistemi enzimatici coinvolti nel controllo della glicemia, nel metabolismo energetico e nella funzione degli ormoni tiroidei. Fa parte inoltre dell'enzima antiossidante superossidodismutasi (SOD) [38].

Lo Zinco fa parte di oltre 200 complessi enzimatici ed è necessario per il corretto funzionamento di molti ormoni, inclusa insulina, ormone della crescita e ormoni sessuali. Lo zinco dei vegetali è poco biodisponibile in quanto legandosi all'acido fitico può formare un complesso insolubile che non viene assorbito [38].

Il Rame è coinvolto in numerose reazioni enzimatiche dell'organismo e si trova diffusamente in tutti gli alimenti, principalmente nei legumi. Una carenza di questo elemento può manifestarsi su diversi tessuti dell'organismo, può provocare anemia da carenza di ferro poiché permette al ferro di poter essere assorbito, trasportato dal sangue e utilizzato. Alte dosi di vitamina C, Zinco e Ferro possono ridurre l'assorbimento [38].

L'analisi dei metalli pesanti (Ni, Pb, Cd e Cr) ha evidenziato valori al di sotto del limite di rilevanza dello strumento. Questi metalli si trovano quindi in concentrazioni non pericolose per la salute del consumatore.

L'analisi statistica dei risultati basata sul gruppo di provenienza evidenzia differenze statisticamente significative tra i 5 gruppi riguardo al contenuto dei microelementi: ferro ( $p=0,002$ ), manganese ( $p=0,002$ ), rame ( $p=0,017$ ) e zinco ( $p=0,023$ ). Inoltre anche il contenuto di calcio è statisticamente differente tra i vari gruppi di campioni analizzati ( $p=0,030$ ). Queste differenze sono da imputarsi alle specifiche caratteristiche del terreno da cui la pianta di ortica assorbe i minerali durante la fase di sviluppo vegetativo.

#### **4.1.2 Analisi sulla frazione ad attività antiossidante**

Le proprietà antiossidanti delle foglie di varie specie di ortica sono state studiate in diversi lavori scientifici [19,20,89] e sono da ricondurre principalmente alla presenza di composti fenolici. Sui campioni di ortica spontanea è stata estratta la frazione solubile ad attività antiossidante sulla quale è stato valutato il contenuto totale in polifenoli ed è stata studiata la capacità antiossidante nei confronti del radicale DPPH e del radicale  $O_2^{\bullet-}$  (metodo Photochem®).

L'estrazione della frazione solubile ad attività antiossidante dalle foglie di ortica è stata messa a punto sul campione W0. Inizialmente sono state confrontate le estrazioni per macerazione con tre miscele idroalcoliche a differenti percentuali. Il campione fresco circa esattamente pesato è stato sottoposto ad estrazione overnight in agitazione a temperatura ambiente con le seguenti fasi estrattive:

7. MeOH 80% - H<sub>2</sub>O 20% + 0,1% HCOOH
8. MeOH 50% - H<sub>2</sub>O 50% + 0,1% HCOOH
9. MeOH 20% - H<sub>2</sub>O 80% + 0,1% HCOOH

Il contenuto di polifenoli è stato valutato sugli estratti mediante il metodo Folin-Ciocalteu (sezione 3.2.2). I risultati sono riportati nel grafico 4.1.

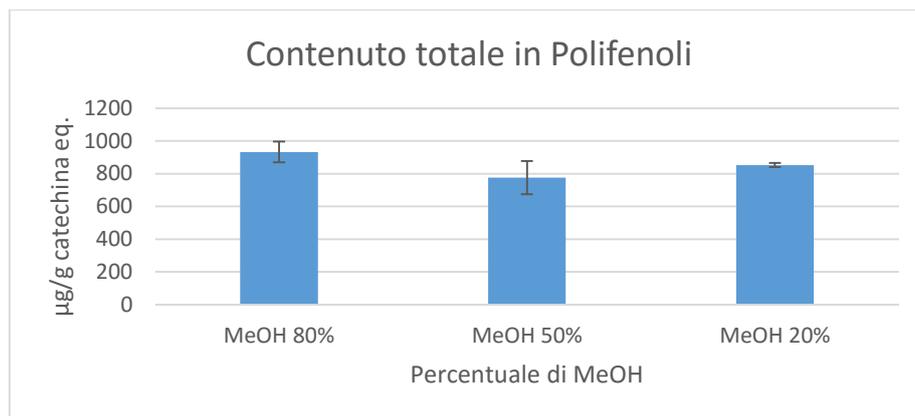


Grafico 4.1

Effetto della % di MeOH sull'estrazione di polifenoli dal campione W0. Contenuto in polifenoli espresso in µg di catechina eq. per g di campione fresco (N=4).

I risultati ottenuti non indicano un'influenza significativa della concentrazione di MeOH sul contenuto totale in polifenoli a seguito di estrazione mediante macerazione overnight. Tuttavia, l'estrazione con MeOH 80% mostra il risultato maggiore, 933 µg/g di catechina eq. per g di campione fresco. La composizione della miscela idroalcolica è stata perciò fissata a MeOH 80%, H<sub>2</sub>O 20% con l'aggiunta dello 0,1% di acido formico.

A seguire, l'estrazione per macerazione overnight è stata messa a confronto con una estrazione a step ripetuti. Sono stati eseguiti 4 step consecutivi di macerazione per 30 minuti ad agitazione costante. Ciascun estratto è stato analizzato separatamente prima di essere unito agli step estrattivi precedenti. La prova è stata eseguita sul campione fresco e sul campione sottoposto a liofilizzazione.

I risultati riportati nel grafico 4.2 indicano come siano necessari più step estrattivi per ottenere un'estrazione il più possibile esaustiva: al quarto step la frazione estratta risulta bassa per cui si è deciso di fissare il numero di step estrattivi necessari a 3. Inoltre, il confronto tra estrazione su fresco ed estrazione su liofilizzato evidenzia una perdita di circa il 14% del contenuto polifenolico totale in seguito al processo di liofilizzazione del campione.

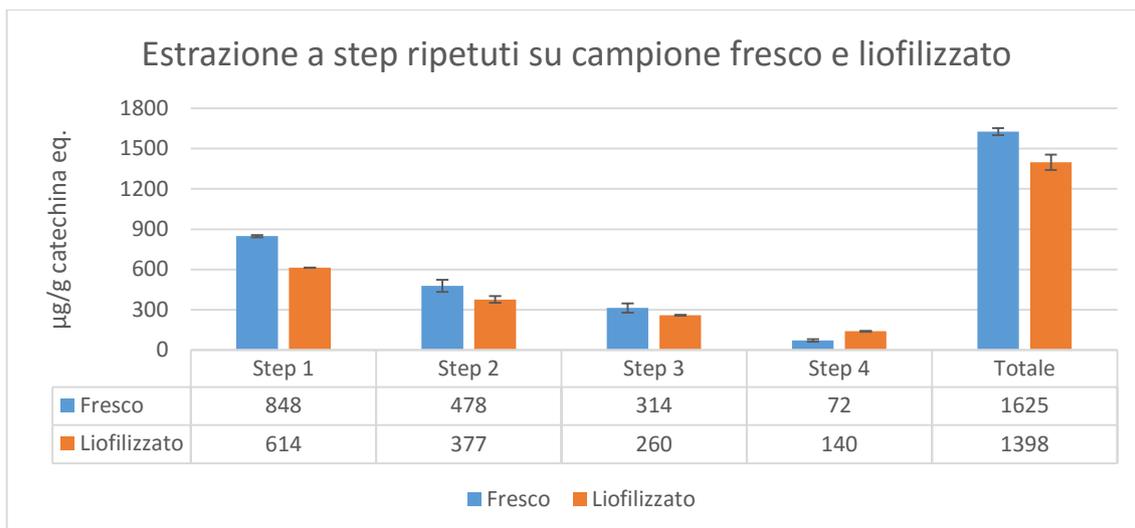


Grafico 4.2

Contenuto totale in polifenoli in seguito ad estrazione a step ripetuti. Valutazione dell'effetto del processo di liofilizzazione del campione W0 (N=4).

A seguito di queste prove è stato perciò standardizzato il metodo estrattivo che nel proseguimento del lavoro prevedrà 3 step di macerazione con miscela estrattiva MeOH 80% - H<sub>2</sub>O 20% + 0,1% di acido formico (sezione 3.2.1).

Sugli estratti della frazione ad attività antiossidante dei campioni oggetto di studio (W1-W14) è stato determinato il contenuto polifenolico totale e la capacità antiossidante mediante il saggio DPPH (sezione 3.2.4) ed il metodo della fotochemiluminescenza PCL-ACL (sezione 3.2.5).

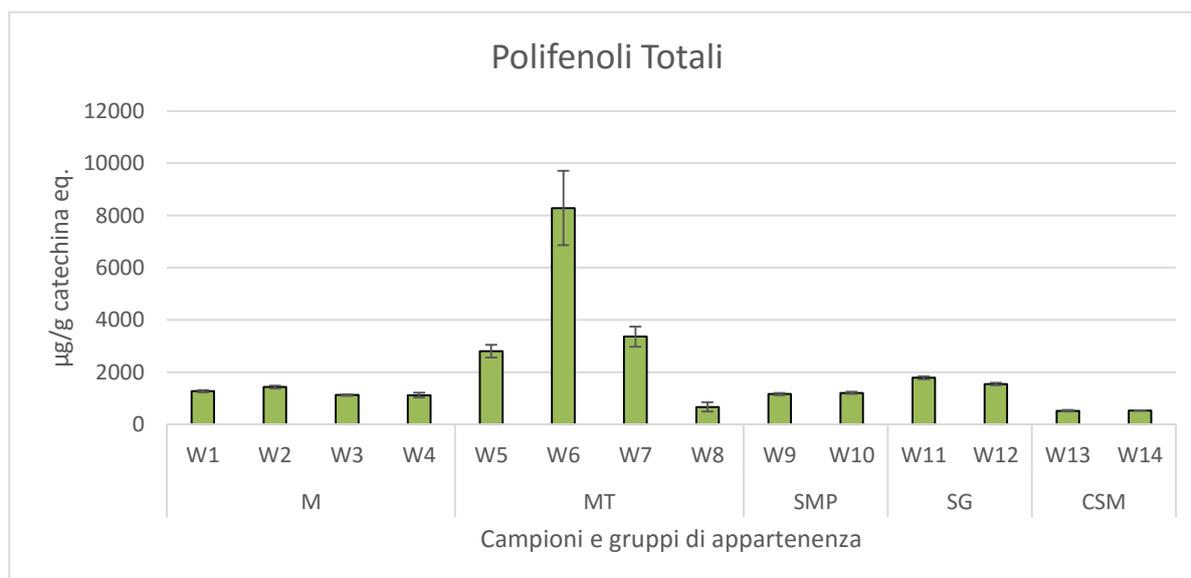


Grafico 4.3

Contenuto totale in polifenoli (µg/g catechins eq. ± ds, N=6) in foglie di ortica spontanea.

Riguardo al contenuto polifenolico totale (grafico 4.3) sono emerse differenze significative tra i campioni analizzati. In particolare, i campioni W5, W6 e W7 presentano un contenuto polifenolico statisticamente maggiore rispetto a tutti gli altri campioni. Valutando statisticamente il contenuto in polifenoli totali non sono emerse differenze significative nel contenuto totale in base al gruppo di provenienza ( $p=0,081$ ).

La capacità antiossidante nei confronti del radicale DPPH risulta parzialmente correlabile al contenuto polifenolico totale (coefficiente di correlazione = 0,864). Dal grafico 4.4 emerge che i campioni W5, W6 e W7 presentano il potere antiossidante maggiore, come nel caso del contenuto totale in polifenoli. Il risultato è ulteriormente confermato dal metodo della fotochemiluminescenza (PCL-ACL) che permette la determinazione del potere scavenger nei confronti del radicale anione superossido (grafico 4.5). Il risultato dell'analisi PCL-ACL è correlabile al contenuto fenolico (coefficiente di correlazione = 0,950) ed al metodo DPPH (coefficiente di correlazione = 0,898).

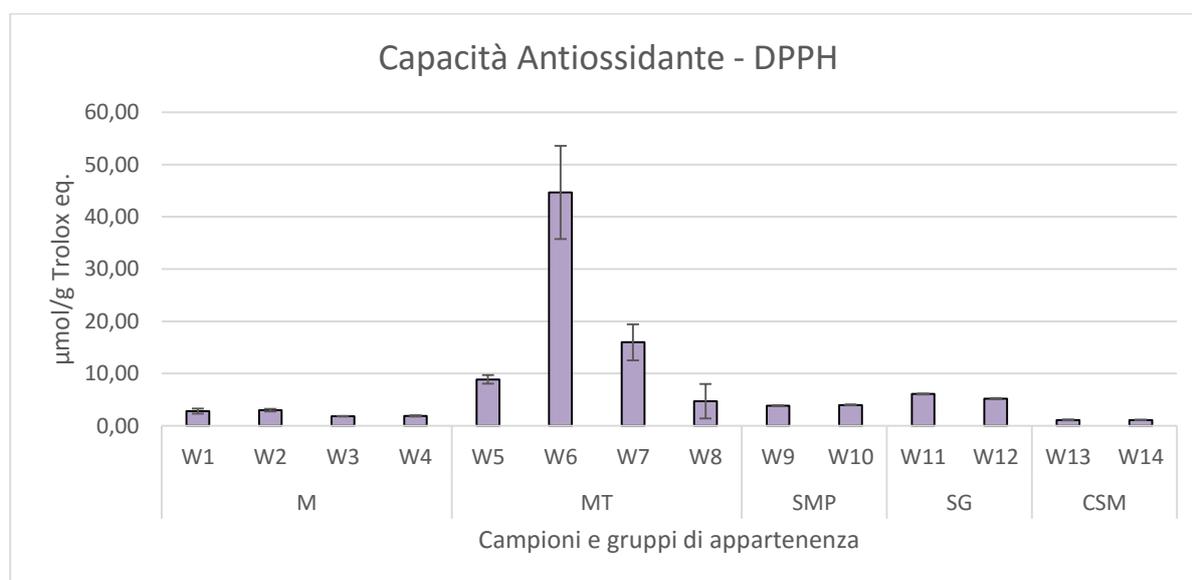


Grafico 4.4

Capacità antiossidante nei confronti del radicale DPPH ( $\mu\text{mol/g Trolox eq.} \pm \text{ds}$ ,  $N=6$ ) di foglie di ortica spontanea.

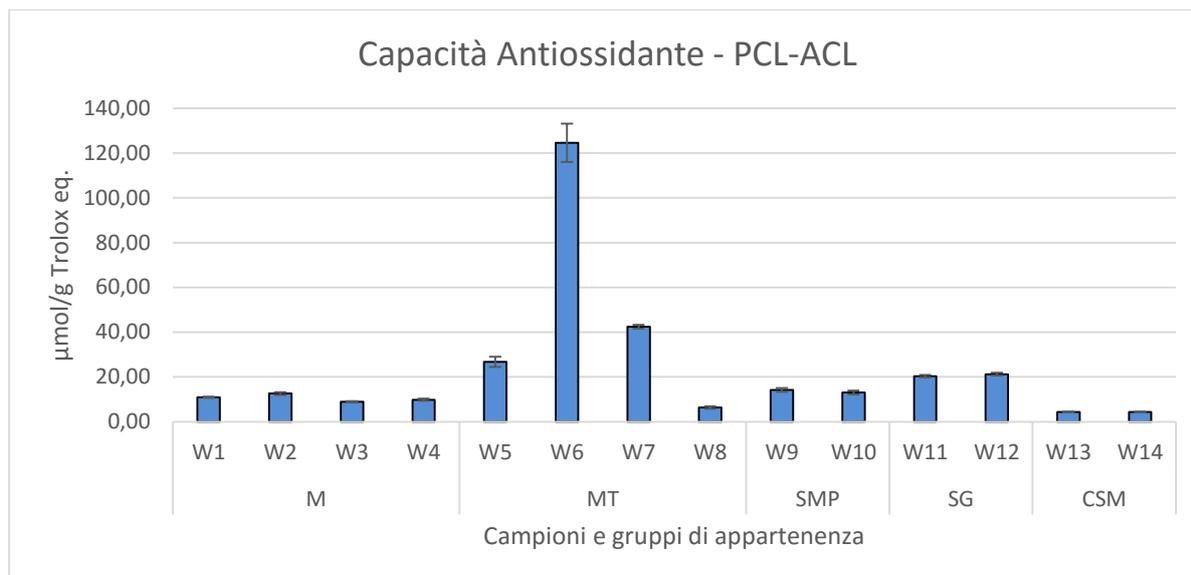


Grafico 4.5

Capacità antiossidante nei confronti del radicale  $O_2^{\bullet-}$  ( $\mu\text{mol/g Trolox eq.} \pm \text{ds}$ ,  $N=6$ ) di foglie di ortica spontanea.

L'analisi statistica dei risultati basata sul gruppo di provenienza, mette in evidenza differenze statisticamente significative riguardo alla determinazione del potere antiossidante nei confronti del radicale DPPH ( $p=0,002$ ) e del radicale  $O_2^{\bullet-}$  ( $p=0,037$ ). Questo indica che la provenienza geografica influisce sul potere antiossidante dei campioni oggetto di studio; ciò è dovuto al differente stato di maturazione delle piante al momento della raccolta. Nonostante la defogliazione sia avvenuta in un ristretto arco temporale, le condizioni di crescita e maturazione di piante spontanee è influenzato dalle specifiche condizioni del terreno e dell'ambiente circostante. Il diverso tempo di maturazione influenza il metabolismo secondario della pianta, per cui il contenuto totale in polifenoli può variare notevolmente anche all'interno di campioni provenienti dalla stessa zona geografica (es: gruppo MT). Inoltre, la produzione di questi metaboliti secondari può essere influenzata da segnali di stress esterni che inducono la pianta ad aumentarne la produzione come meccanismo di difesa.

Lo studio su campioni di ortica spontanea ha indicato come le foglie di ortica siano ricche di proteine e di elementi importanti per le fisiologiche funzioni dell'organismo, in particolare calcio, magnesio, ferro e manganese. Inoltre, lo studio delle proprietà antiossidanti ha evidenziato come queste siano variabili in base alla zona geografica di provenienza, indicando un'influenza significativa dello stadio vegetativo su biosintesi ed accumulo di composti fenolici da parte della pianta.

## 4.2 Studio di composti fenolici e carotenoidi in *Urtica dioica* coltivata

Il lavoro è proseguito con la creazione di un campo sperimentale presso il Centro di Ricerca per le Colture Industriali (CRA-CIN) di Rovigo; in questo campo sperimentale è iniziato lo studio sulle condizioni di coltivazione delle varietà *Urtica dioica* e *Urtica urens*. La coltivazione di varietà a semente certificata ha permesso di controllare le fasi di sviluppo vegetativo e di studiare in maniera specifica due tra le principali classi di metaboliti secondari costitutive delle foglie di ortica: i composti fenolici ed i carotenoidi [5]. Su queste due classi è stata studiata la composizione specifica ed il contenuto è stato valutato durante l'accrescimento delle piante nel primo anno di coltivazione.

### 4.2.1 Coltivazione in campo sperimentale

La pianta di ortica non possiede particolari esigenze climatiche, può essere coltivata in molti Paesi europei e sopravvive durante la stagione invernale grazie ai rizomi sotterranei [90]. L'elevata piovosità primaverile ne favorisce la crescita [36] e la pianta preferisce terreni umidi ricchi di sostanze organiche azotate e di fosfati [11].

La propagazione è possibile sia attraverso semina sia attraverso propagazione vegetativa. Tuttavia, i semi sono molto piccoli e le operazioni di semina possono risultare problematiche e condurre a risultati non soddisfacenti. Inoltre, le giovani piante sono molto suscettibili alle infestanti, per cui è richiesto un notevole lavoro di preparazione del terreno [13].

	<i>U. dioica</i>	<i>U. urens</i>
Semente	B and T World Seeds, France	B and T World Seeds, France
Germinazione	Serra, lenta	Serra, veloce
Trapianto	1 mese	2-3 settimane
Data trapianto	Aprile 2014	Aprile 2014
Ciclo di vita	Perenne	Annuale

Tabella 4.5

*U. dioica* ed *U. urens* coltivate presso il campo sperimentale del CRA-CIN di Rovigo.

Il campo di coltivazione sperimentale è stato creato presso il Centro di Ricerca per Colture Industriali di Rovigo (CRA-CIN), ed il personale del Centro si è occupato in prima persona delle fasi di germinazione, trapianto e crescita delle piante.

Per la coltivazione sono state utilizzate le due varietà maggiormente diffuse in Italia: *U. dioica* ed *U. urens*. Le sementi certificate sono state acquistate (B and T World Seeds, Francia). La fase di germinazione è stata condotta in apposita serra e successivamente le piante sono state trapiantate direttamente a mano in campo. La varietà *urens* mostra una germinazione più veloce rispetto alla varietà *dioica* (tabella 4.5). Durante il primo anno di coltivazione il terreno non è stato fertilizzato e le piante non sono state irrigate manualmente.

Lo studio agronomico della crescita vegetativa ha indicato che la varietà *urens* è soggetta ad una crescita molto rapida e che il suo ciclo vegetativo è breve e porta alla morte della pianta successivamente alla perdita dei semi. Dai semi caduti nel terreno originano nuove piante (figura 4.1). Inoltre, la quantità di massa fogliare prodotta dalla varietà *urens* è decisamente minore rispetto a quella prodotta dalla varietà *dioica*. Le piante di *U. urens* coltivate non hanno superato i 25cm di altezza, mentre le piante di *U. dioica* hanno raggiunto altezze di 80-90cm (figura 4.2).



Figura 4.1

Germinazione di *U. urens* per riproduzione via seme.

Le piante di *U. dioica* mostrano una crescita più lenta, però non muoiono al termine della produzione dei semi, bensì raggiungono una fase di quiescenza, gradualmente perdono le foglie e successivamente riprendono con una nuova fase di sviluppo vegetativo dando vita ad nuovo ciclo. Le piante di *U. dioica* possono perciò essere considerate perenni.

Questi risultati indicano che la varietà *dioica* presenta le caratteristiche migliori per essere proposta a livello di coltivazione al fine dello sfruttamento delle parti aeree (foglie e fusto).



Figura 4.2

Immagine del campo sperimentale presso il CRA-CIN di Rovigo.

A sinistra *U. dioica*, a destra *U. urens*.

Sulla varietà *U. dioica* sono stati effettuati campionamenti durante le fasi di sviluppo vegetativo. In ciascun campionamento sono state raccolte le foglie apicali, staccandole manualmente dal fusto. Per ciascun campionamento sono state raccolte foglie da differenti piante per un quantitativo di circa 1Kg di materiale fresco, in modo da eseguire un campionamento rappresentativo. In tabella 4.5 sono riportati i campionamenti effettuati:

Varietà	Data	Sigla campione	Fase del ciclo vegetativo
<i>U. dioica</i>	10/05	UD-V	Fase vegetativa
	14/06	UD-F	Fioritura
	10/07	UD-S	Seme
	24/08	UD-Q	Quiescenza

Tabella 4.6

Raccolta e sigla dei campioni di *U. dioica* coltivata durante le diverse fasi del ciclo vegetativo.

Sui campioni di *U. dioica* sono state studiate le due principali classi di metaboliti secondari presenti nelle foglie di ortica, i composti fenolici ed i carotenoidi.

#### 4.2.2 Analisi qualitativa e quantitativa dei composti fenolici

I campioni raccolti sono stati conservati in congelatore a -20°C fino al momento delle analisi. Su ciascun campione è stato determinato il contenuto di umidità ed è stata estratta la frazione ad attività antiossidante come descritto nella sezione 3.2.1.

Su questa frazione è stato inizialmente svolto uno screening delle proprietà antiossidanti eseguendo la determinazione del contenuto polifenolico totale (metodo Folin-Ciocalteu, sezione 3.2.2) e la determinazione della capacità antiossidante nei confronti del radicale ABTS (sezione 3.2.3). I risultati sono riportati nel grafico 4.6.

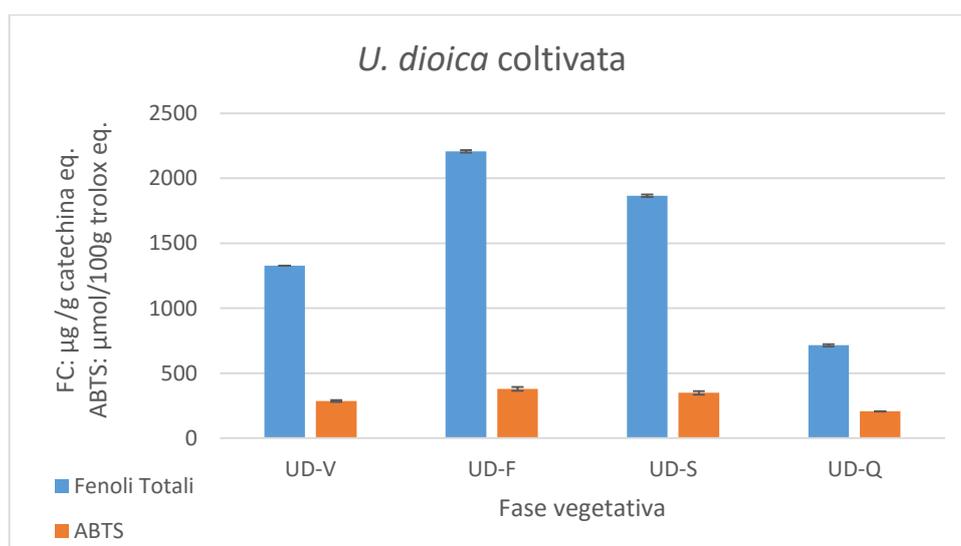


Grafico 4.6

Contenuto totale in polifenoli e capacità antiossidante (ABTS) di foglie di *U. dioica* coltivata, durante diverse fasi dello sviluppo vegetativo. UD-V: fase vegetativa; UD-F: fase di fioritura; UD-S: fase di maturazione seme; UD-Q: fase di quiescenza. (N=6)

Dalla prima valutazione delle proprietà antiossidanti emerge come ci sia un incremento del contenuto in polifenoli tra la fase vegetativa e la fase di fioritura, dopodiché si nota un progressivo calo durante la fase di maturazione dei semi e la fase di quiescenza. La capacità antiossidante nei confronti del radicale ABTS segue lo stesso andamento del contenuto polifenolico, tuttavia con differenze relative minori.

La fase di fioritura pare essere il periodo vegetativo nel quale le foglie contengono il maggior contenuto di sostanze fenoliche: in questo periodo il metabolismo della pianta è vigoroso e questi metaboliti vengono prodotti in grandi quantità.

In questa fase del lavoro è stato sviluppato ed applicato un metodo cromatografico HPLC per la separazione, l'identificazione e la quantificazione delle molecole a natura fenolica contenute negli estratti della frazione ad attività antiossidante.

Il metodo cromatografico descritto nella sezione 3.3.1 ha permesso di separare ed identificare alcuni dei polifenoli caratteristici delle foglie di *U. dioica*.

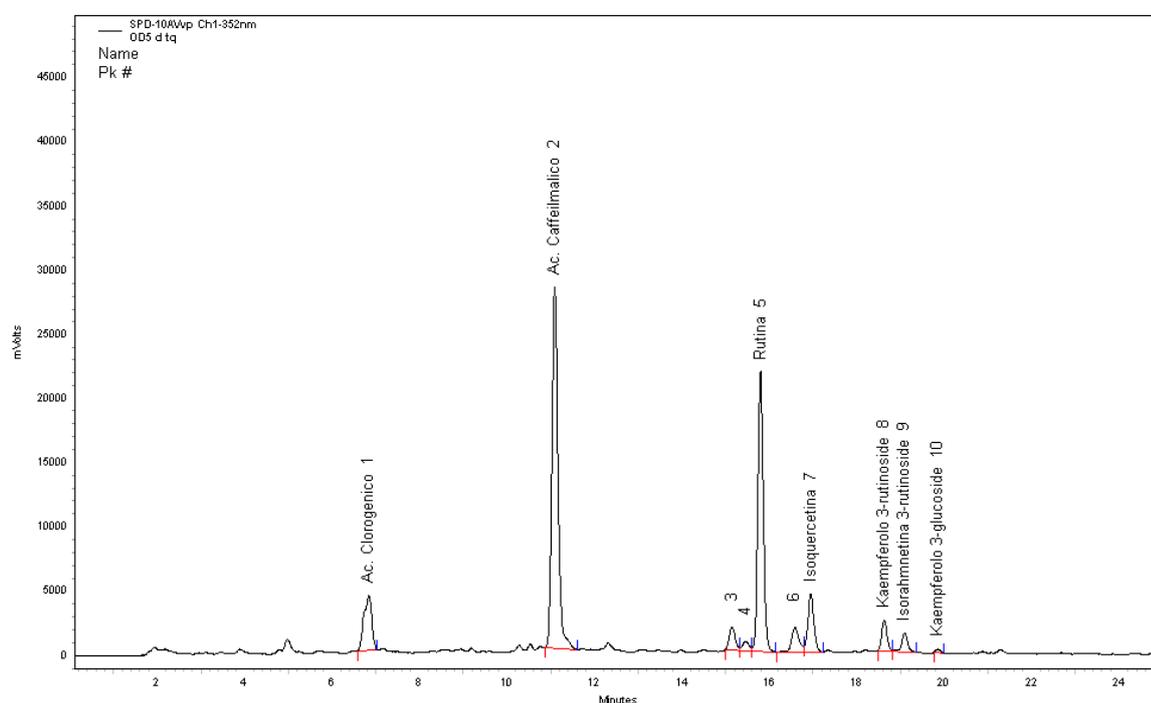


Figura 4.3

Separazione cromatografica dei composti fenolici del campione UD-F.

In figura 4.3 è riportato il cromatogramma a  $\lambda=352\text{nm}$  ottenuto dalla separazione cromatografica della frazione fenolica del campione UD-F. L'analisi qualitativa è stata condotta in HPLC-UV per confronto dei tempi di ritenzione e prove di fortificazione utilizzando alcuni standard analitici a disposizione (acido clorogenico, rutina, isoquercetina, kaempferolo 3-rutinoside) ed in LC-MS per analisi degli spettri di frammentazione a confronto con quelli degli standard analitici a disposizione e con le informazioni presenti in letteratura scientifica.

Il lavoro ha permesso di identificare sette composti fenolici, di cui due acidi fenolici e cinque flavonoidi. I composti identificati sono riportati in tabella 4.7.

Segnale	Composto	t <sub>R</sub> (min)	MS (m/z) [M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (m/z)
1	Ac. Clorogenico (Ac. caffeilquinico)*	6.8	353.0	190.9 (100), 173.1 (20)
2	Acido Caffeilmalico	11.1	295.0	178.9 (100), 133.1 (45)
3	n.i.	15.1	279.0	163.0 (100)
4	n.i.	15.5	403.1	223.0 (13), 179.0 (100)
5	Rutina (Quercetina 3-rutinoside)*	15.8	609.1	300.6 (100), 270.7 (32)
6	n.i.	16.6	529.2	485.0 (73), 427.1 (100)
7	Isoquercetina (Quercetina 3-glucoside)*	16.9	463.0	301.0 (100), 150.9 (12)
8	Kaempferolo 3-rutinoside*	18.6	593.1	286.0 (100), 255.9 (72), 196.0 (58)
9	Isorhamnetina 3-rutinoside	19.1	623.2	315.0 (100), 299.6 (16), 255.0 (10)
10	Kaempferolo 3-glucoside	19.8	447.0	284.9 (100)

Tabella 4.7

Identificazione MS e MS<sup>2</sup> di composti fenolici in foglie di *U. dioica*.

\* confermati da standard analitico. n.i.: non identificato.

Il segnale 1 è stato riconosciuto come acido clorogenico: questa molecola esiste sotto forma di differenti isomeri posizionali di cui il principale è l'acido 3-caffeilquinico (figura 4.4). In questo lavoro non è stato possibile identificare l'isomero presente, quindi è stato usato il nome comprensivo di tutta la famiglia, cioè acido clorogenico. Lo ione molecolare [M-H]<sup>-</sup> ha un rapporto *m/z* di 353.0 ed il principale frammento prodotto corrisponde alla scissione della molecola di acido quinico (*m/z*=190.9) [91].

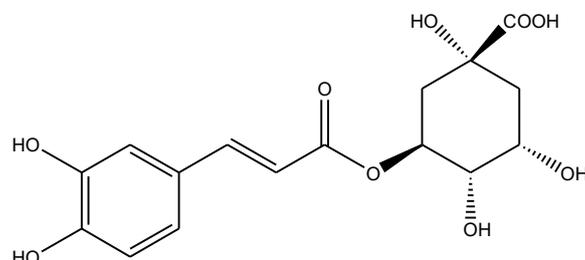


Figura 4.4

Struttura dell'acido clorogenico (acido 3-caffeilquinico).

Il segnale 2 rappresenta il picco ad altezza maggiore del cromatogramma e corrisponde all'acido caffeilmalico (figura 4.5), acido fenolico caratteristico delle foglie di *U. dioica* [5]. Non avendo a disposizione lo standard analitico, il riconoscimento è stato confermato esclusivamente con l'analisi LC-MS confrontata con dati di letteratura.

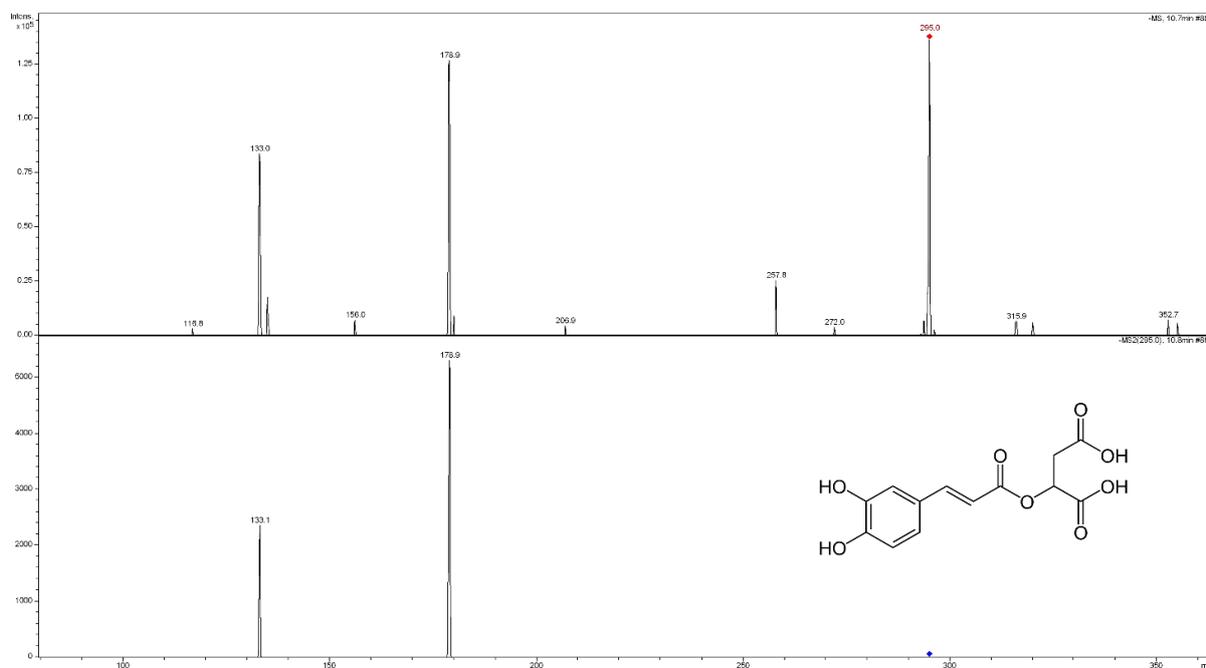


Figura 4.5

Spettro MS ed MS<sup>2</sup> di acido caffeilmalico in UD-F.

Lo ione molecolare ha  $m/z=295.0$  ed i frammenti generati corrispondono alla scissione della molecola di acido malico ( $m/z=133.1$ ) e di acido caffeico ( $m/z=178.9$ ). I dati ottenuti corrispondono a quelli precedentemente indicati in letteratura scientifica [91,92]. L'acido caffeilmalico non è molto diffuso in natura: è stato identificato nelle piante *Chelidonium majus* L. e *Corydalis lutea* L. [93] e nelle foglie di lattuga *Lactuca sativa* L. [94] e fico *Ficus carica* L. [95].

Il segnale numero 5 avente tempo di ritenzione  $t_r=15,8$  min corrisponde al flavonolo rutina. Il riconoscimento è confermato dalla corrispondenza del tempo di ritenzione e da prove di fortificazione in HPLC-UV e dagli spettri MS ed MS<sup>2</sup> (figura 4.6). Il frammento a  $m/z=300.6$  corrisponde alla molecola aglicone, la quercetina. La rutina è il principale derivato glucosidico della molecola di quercetina, che il flavonolo a maggior diffusione in frutta e verdura. La rutina si trova in grandi quantità nel grano saraceno, in foglie di thè, menta piperita, eucalipto e

spinacio, in foglie del genere *Rheum*, nelle piante del genere *Citrus*, nel vino rosso e in altre fonti vegetali [96].

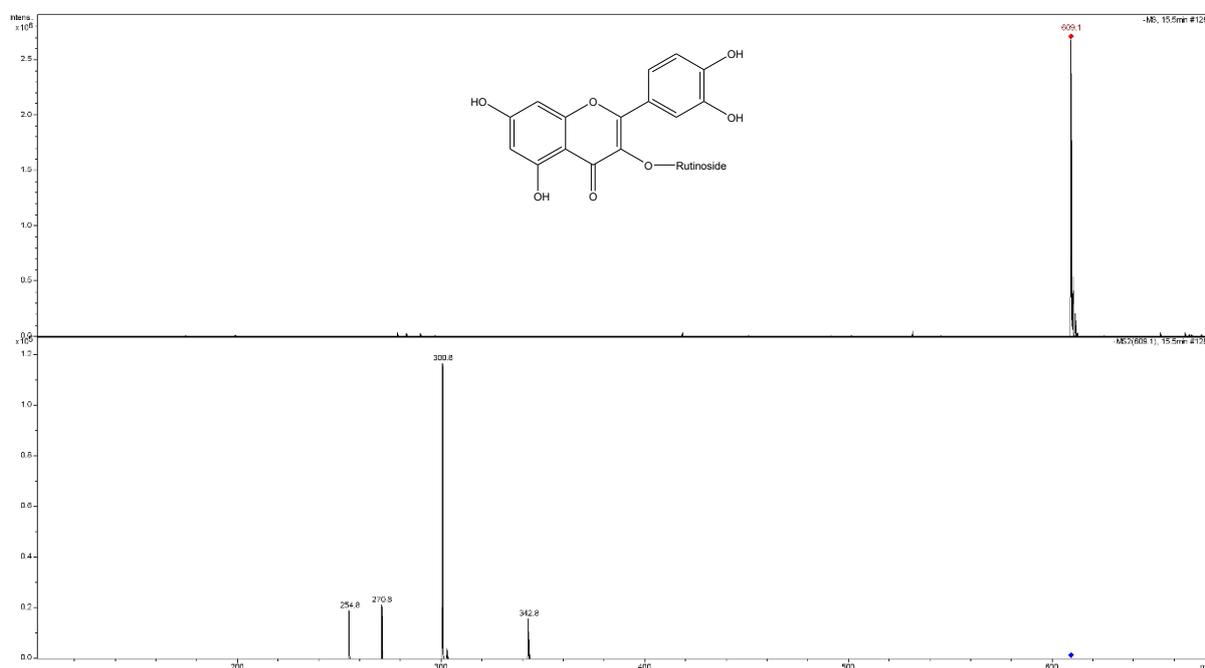


Figura 4.6

Spettro MS ed MS<sup>2</sup> di rutina in UD-F.

Il segnale numero 7 al tempo di ritenzione  $t_r=16,9$  min corrisponde al flavonoide isoquercetina. Il riconoscimento in HPLC-UV è stato confermato dall'analisi MS ed MS<sup>2</sup>. Lo ione molecolare presenta un rapporto massa carica pari a  $m/z=463.0$  ed il frammento a  $m/z=301.0$  si genera per rottura della legame glucosidico e corrisponde alla molecola di quercetina.

Il segnale numero 8 ( $t_r=18,6$  min) è stato identificato come kaempferolo 3-rutinoside, un flavonoide. Prove di fortificazione in HPLC-UV integrate con l'analisi in spettrometria di massa ne hanno confermato l'identità. Il frammento a  $m/z=286.0$  corrisponde alla molecola aglicone, il kaempferolo, che rispetto alla molecola di quercetina presenta un gruppo fenolico in meno in posizione 3'.

Al tempo di ritenzione  $t_r=19,1$  min è stata identificata mediante l'analisi in MS la molecola di isorhamnetina 3-rutinoside ( $[M-H]^- = 623.2$ ), segnale numero 9. I frammenti generati corrispondono alla molecola aglicone ( $m/z=315.0$ ) ed a rotture confermate in letteratura ( $m/z=299.6$  e  $215.0$ ) [91].

Infine, è presente anche la molecola di kaempferolo 3-glucoside (segnale 10) al tempo di ritenzione  $t_r=19,8$  min. Non è stato possibile identificare i segnali numero 3,4 e 6.

L'identificazione dei principali composti fenolici caratteristici delle foglie di *U. dioica* conferma dati precedenti di letteratura [29,30,91,92]: la frazione fenolica è composta principalmente da due acidi idrossicinnamici, acido clorogenico ed acido caffeilmalico, e da flavonoidi glicosilati di quercetina, kaempferolo e isorhamnetina.

Terminata la caratterizzazione è stata eseguita la quantificazione in HPLC-UV sugli estratti dei campioni di *U. dioica* precedentemente descritti in tabella 4.6.

Inizialmente sono state costruite le rette di taratura degli standard analitici a disposizione: acido clorogenico, rutina, isoquercetina e kaempferolo 3-rutinoside. Per ciascuno standard di riferimento è stata preparata una soluzione madre 1000µg/mL in MeOH dalla quale sono state ottenute le soluzioni utilizzate per la costruzione della retta di calibrazione: 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL. Per la retta di taratura di acido clorogenico è stata iniettata anche la soluzione 20 µg/mL. Ciascuna iniezione è stata ripetuta in triplo.

La quantificazione di acido caffeilmalico, isorhamnetina 3-rutinoside e kaempferolo 3-glucoside, è stata eseguita utilizzando le rette di taratura delle molecole aventi il cromoforo simile ed applicando la correzione del peso molecolare. Di seguito sono riportate le rette di taratura ottenute:

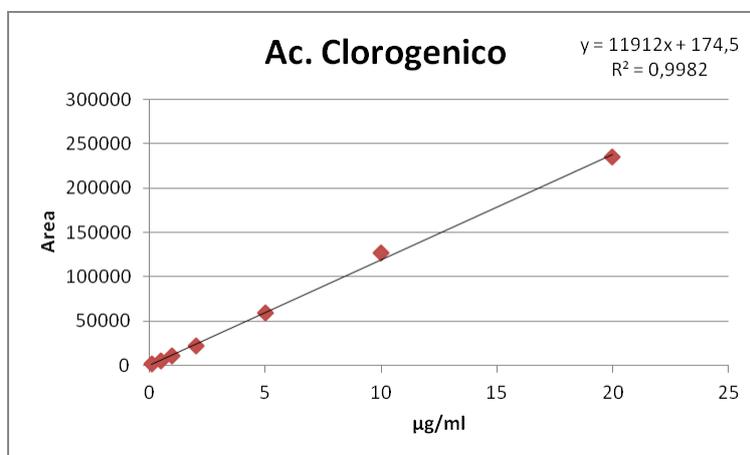


Figura 4.7

Retta di taratura in HPLC-UV di acido clorogenico.

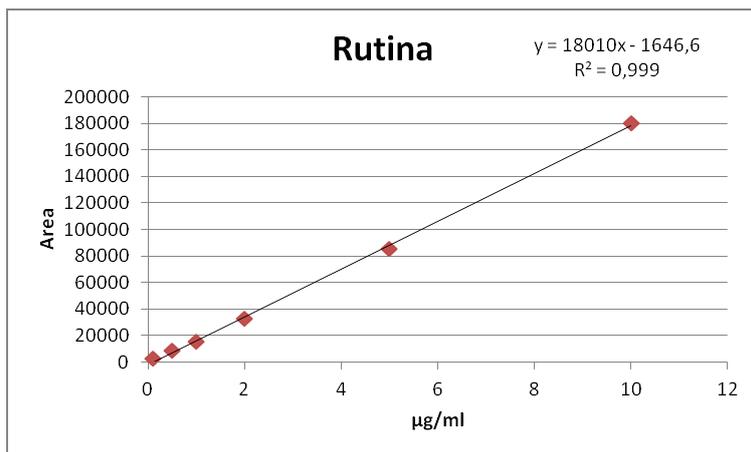


Figura 4.8  
 Retta di taratura in HPLC-UV di Rutina.

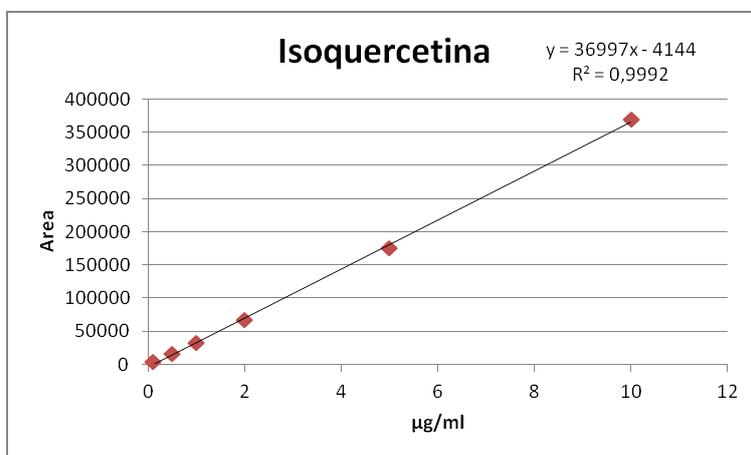


Figura 4.9  
 Retta di taratura in HPLC-UV di isoquercetina.

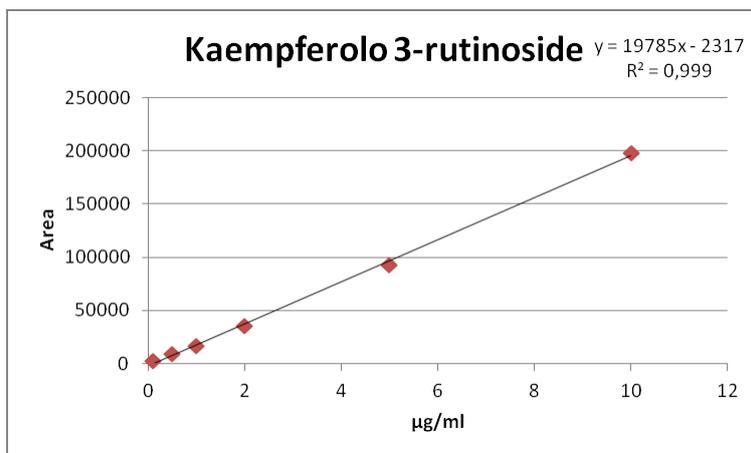


Figura 4.10  
 Retta di taratura in HPLC-UV di kaempferolo 3-rutinoside.

In tabella 4.8 sono riportati i risultati della quantificazione dei principali composti fenolici sulle foglie del campione di *U. dioica* coltivato nel campo sperimentale di Rovigo.

<b>Polifenoli</b>	<b>UD-V</b>	<b>UD-F</b>	<b>UD-S</b>	<b>UD-Q</b>
<b>Acido Clorogenico</b>	31,5 ± 1,1	149,5 ± 0,0	68,3 ± 1,7	26,0 ± 0,1
<b>Acido Caffeilmalico</b>	414,6 ± 9,0	786,3 ± 2,9	289,1 ± 3,4	41,1 ± 0,7
<b>Rutina</b>	35,5 ± 0,2	346,5 ± 1,2	88,6 ± 1,5	15,1 ± 0,0
<b>Isoquercetina</b>	7,0 ± 0,0	42,2 ± 0,2	10,8 ± 0,0	2,6 ± 0,0
<b>Kaempferolo 3-rutinoside</b>	6,8 ± 0,2	41,2 ± 0,7	33,2 ± 0,7	4,0 ± 0,1
<b>Isorhamnetina 3-rutinoside</b>	8,2 ± 0,4	28,1 ± 0,5	35,6 ± 0,2	13,4 ± 0,1
<b>Kaempferolo 3-glucoside</b>	nd	8,8 ± 1,7	nd	nd
Fenoli totali (saggio Folin-Ciocalteu) <sup>a</sup>	1328 ± 0,0	2207 ± 9,7	1865 ± 9,5	715 ± 8,4

Tabella 4.8

Quantificazione di composti fenolici in foglie di *U. dioica* coltivata, durante le diverse fasi di sviluppo vegetativo. Risultati espressi come µg/g di sostanza fresca (media ± ds, N=6).

nd, non determinabile (<LOD); <sup>a</sup> µg/g catechina equivalente.

I risultati indicano che la maggior concentrazione di ciascun fenolo considerato si trova durante la fase di fioritura della pianta (grafico 4.7), come confermato dalla quantificazione fenolica totale mediante il saggio Folin-Ciocalteu (grafico 4.6). I polifenoli principali risultano essere l'acido caffeilmalico (786,3 µg/g di sostanza fresca durante la fase di fioritura, UD-F), la rutina (346,5 µg/g, UD-F) e l'acido clorogenico (149,5 µg/g, UD-F). Isoquercetina, kaempferolo 3-rutinoside e isorhamnetina 3-rutinoside si trovano in concentrazioni inferiori. Kaempferolo 3-glucoside è stato quantificato solo sul campione UD-F.

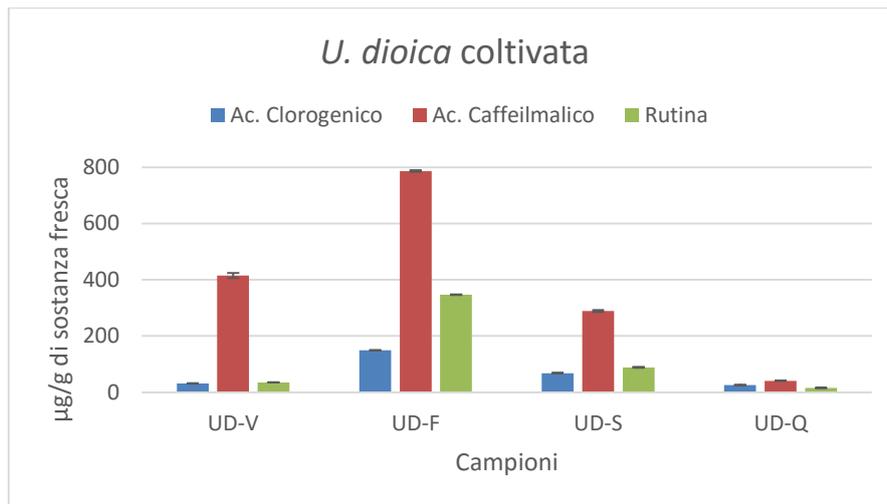


Grafico 4.7

Contenuto di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina durante la fasi di crescita vegetativa.

UD-V: fase vegetativa; UD-F: fase di fioritura;

UD-S: fase di maturazione seme; UD-Q: fase di quiescenza.

Il contenuto totale determinato con il metodo Folin-Ciocalteu risulta più alto della somma dei singoli polifenoli identificati. Il risultato è aspettato perché la quantificazione con il metodo Folin è riferita ad uno standard di riferimento, la catechina, e quindi rappresenta una stima del contenuto totale. Inoltre il reattivo di Folin-Ciocalteu può reagire con molecole riducenti anche se queste non presentano gruppi fenolici [97,98].

### 4.2.3 Analisi qualitativa e quantitativa dei carotenoidi

Al pari dei composti fenolici, i carotenoidi rappresentano una classe di metaboliti secondari ad interesse nutraceutico caratteristica delle foglie di *U. dioica*.

Nelle foglie di *U. dioica* i due carotenoidi principali sono luteina e  $\beta$ -carotene, assieme ad altre xantofille quali neoxantina e violaxantina. Uno studio condotto su foglie giovani ed adulte di *U. dioica* ha messo in evidenza come la luteina ed i suoi isomeri rappresentino più del 60% dei carotenoidi totali; inoltre il contenuto totale di carotenoidi tra foglie giovani e foglie adulte non presentava grandi differenze (51,4 mg/g di sostanza secca per le foglie giovani, 74,8 mg/g per le foglie adulte) [33].

Il metodo estrattivo applicato in questo lavoro è stato modificato partendo dalle condizioni proposte da Panfili *et al.* [85] ed è descritto nella sezione 3.3.2. La reazione di saponificazione a caldo permette l'idrolisi delle clorofille, semplificando notevolmente l'analisi HPLC.

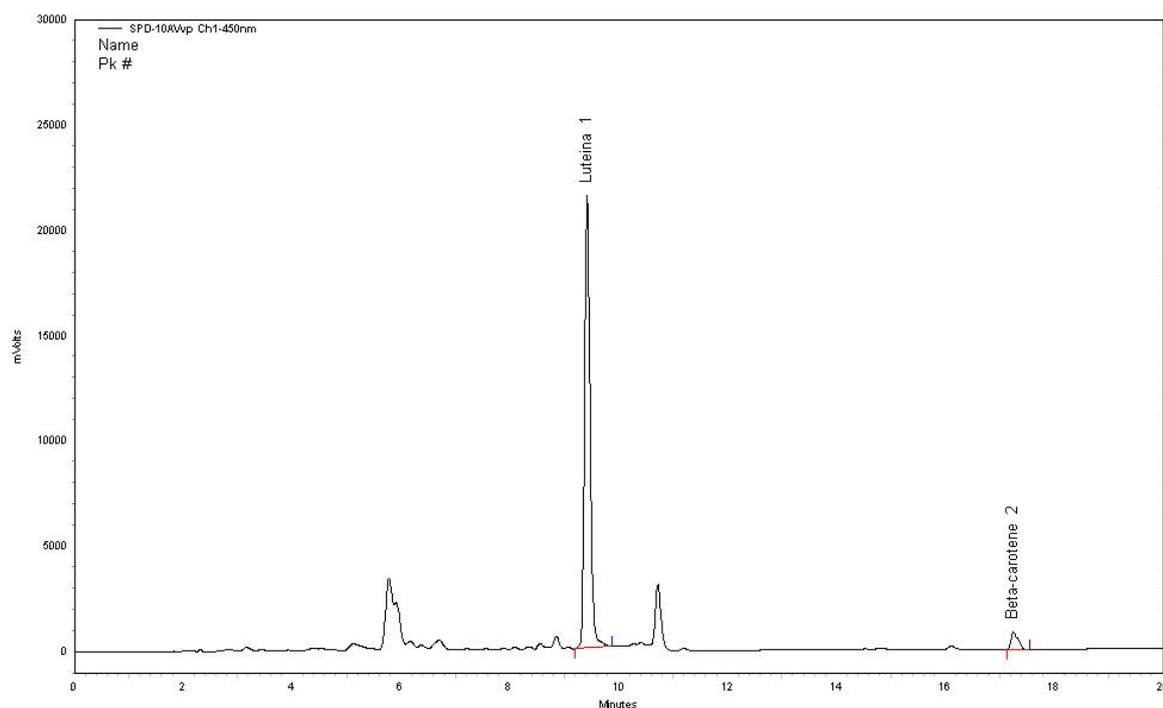


Figura 4.11

Separazione cromatografica dei carotenoidi nel campione UD-F.

In figura 4.8 è riportato il cromatogramma della separazione cromatografica dei carotenoidi sull'estratto del campione UD-F. Si notano quattro segnali principali che assorbono alla lunghezza d'onda di 450nm. Ne sono stati identificati due, corrispondenti alla xantofilla luteina ( $t_R=9,69\text{min}$ ) ed al  $\beta$ -carotene ( $t_R=18,02\text{min}$ ). L'identificazione è stata perfezionata per

confronto dei tempi di ritenzioni dei corrispondenti standard analitici e mediante prove di fortificazione sugli estratti ottenuti.

Gli standard di riferimento luteina e  $\beta$ -carotene sono stati solubilizzati con una soluzione di acetonitrile (ACN) e tetraidrofurano (THF) 50:50 in modo da ottenere la soluzione madre a 1000 $\mu$ g/mL: da questa sono state preparate le soluzioni per la costruzione delle rette di taratura, utilizzando come solvente ACN. Per la retta di taratura della luteina sono state preparate soluzioni con le seguenti concentrazioni: 0,05  $\mu$ g/mL, 0,1  $\mu$ g/mL, 0,5  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 2  $\mu$ g/mL. Per la retta di taratura del  $\beta$ -carotene sono state preparate soluzioni con le seguenti concentrazioni: 0,005  $\mu$ g/mL, 0,01  $\mu$ g/mL, 0,05  $\mu$ g/mL, 0,1  $\mu$ g/mL, 0,2  $\mu$ g/mL. Ciascuna iniezione è stata ripetuta in doppio.

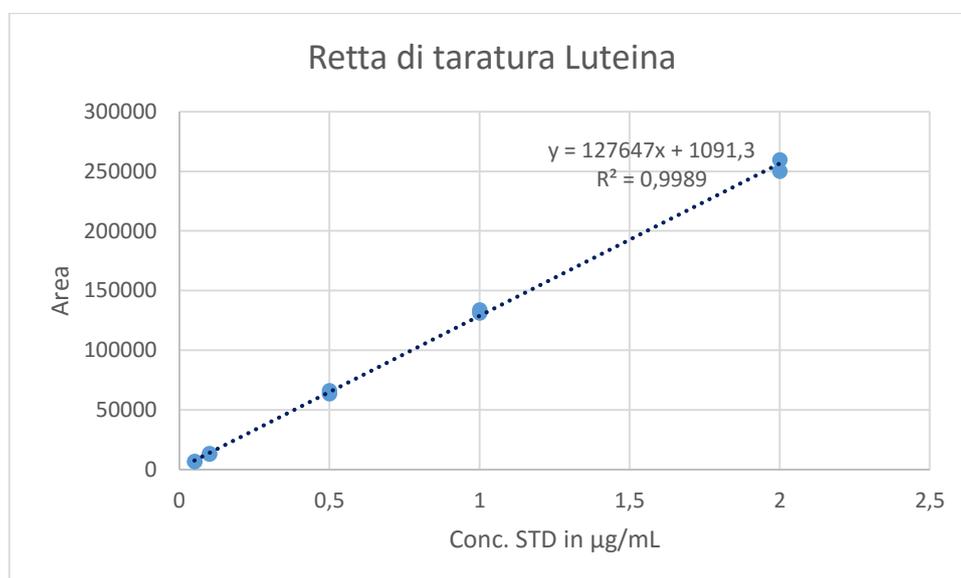


Figura 4.12

Retta di taratura in HPLC-UV di luteina.

In figura 4.12 e 4.13 sono riportate le rette di taratura della luteina e del  $\beta$ -carotene in HPLC-UV con lunghezza d'onda del detector a 450nm.

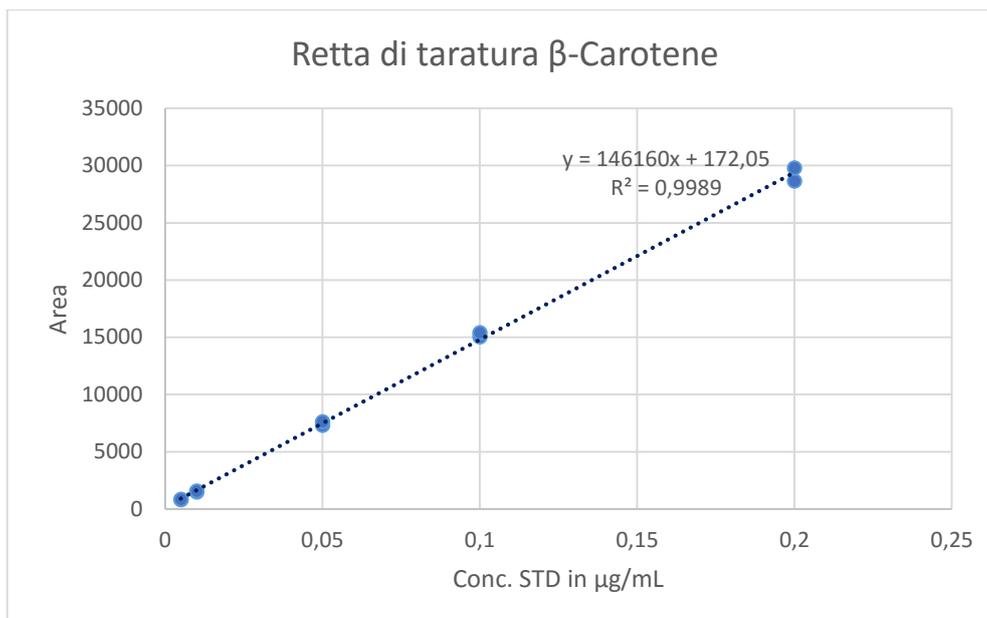


Figura 4.13

Retta di taratura in HPLC-UV di β-carotene.

Una volta costruite le rette di taratura sono stati analizzati i campioni di *U. dioica* coltivata (tabella 4.6), da cui i carotenoidi sono stati estratti secondo il metodo descritto nella sezione 3.3.2.

Carotenoidi	UD-V	UD-F	UD-S	UD-Q
Luteina	159,0 ± 9,1	184,0 ± 29,5	51,3 ± 7,7	77,6 ± 5,9
β-carotene	2,3 ± 0,5	6,7 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1

Tabella 4.9

Quantificazione di luteina e β-carotene in foglie di *U. dioica* coltivata, durante diverse fasi dello sviluppo vegetativo. UD-V: fase vegetativa; UD-F: fase di fioritura; UD-S: fase di maturazione seme; UD-Q: fase di quiescenza. Risultati espressi come µg/g di sostanza secca (media ± ds, N=6).

I risultati, riportati nella tabella 4.9, indicano una progressiva biosintesi di luteina e β-carotene durante la fase vegetativa e di fioritura, durante la quale si trovano le concentrazioni maggiori. Nella fase di maturazione del seme il contenuto in carotenoidi diminuisce in maniera importante; infine la loro sintesi riprende già durante la fase di quiescenza.

Come per i composti fenolici, anche il tempo balsamico dei carotenoidi si colloca durante la fase di fioritura. Durante questa fase del ciclo vegetale le foglie presentano il maggior contenuto

di molecole a natura fenolica e di carotenoidi, importanti metaboliti secondari a proprietà nutraceutiche. Per tale motivo la fase di fioritura risulta il momento migliore per la raccolta delle foglie destinate ad un utilizzo alimentare. Inoltre, nel periodo di crescita vegetativa la pianta presenta la maggior quantità di foglie, che tendono ad essere perse durante la fase di quiescenza. Come proposto da Di Virgilio *et al.* <sup>[13]</sup>, è possibile pianificare una sequenza di raccolta del materiale aereo della pianta di *U. dioica* durante un anno di coltivazione, in modo da ottenere prodotti differenti per diversi settori industriali. La raccolta delle foglie durante la fase di fioritura (tarda primavera) può condurre all'utilizzo nel settore alimentare oppure farmaceutico/cosmetico per l'estrazione di principi attivi e coloranti (clorofille). A seguire si può ipotizzare la potatura degli steli ad estate inoltrata, per l'estrazione della fibra tessile. In seguito la pianta di *U. dioica* riprende una fase di fioritura che culmina in autunno (Ottobre): in queste periodo possono essere raccolte le foglie per un utilizzo prettamente alimentare. La valutazione del contenuto di sostanze fenoliche e carotenoidi nei successivi anni di coltivazione della pianta rimane di grande interesse, perché non ancora approfondito in maniera soddisfacente dalla comunità scientifica <sup>[5]</sup>.

### 4.3 L'ortica come ingrediente per pasta alimentare speciale

La definizione “pasta alimentare speciale” significa che tra gli ingredienti della pasta non figurano soltanto semola ed acqua, bensì altri ingredienti mescolati all'impasto o usati come ripieno, che sono leggibili in etichetta in ordine decrescente di peso. In questa categoria rientrano anche le paste all'uovo, che per legge devono essere preparate con semola di grano duro (fatta eccezione per quelle fresche) con l'aggiunta di almeno 4 uova intere di gallina, prive di guscio, per un peso complessivo non inferiore a 200g di uova per kg di semola <sup>[99]</sup>. Altri esempi di paste speciali sono le paste colorate come quella verde agli spinaci, quella rossa al pomodoro e quella nera al nero di seppia, ma anche le paste ripiene come ravioli e tortellini.

Dal punto di vista nutrizionale, la pasta è un alimento che contiene almeno il 60% di carboidrati, di cui oltre il 45% sotto forma di carboidrati complessi (amido) e trascurabili quantità di lipidi. Il contenuto proteico è mediamente del 12%, mentre nel caso della pasta all'uovo questo valore aumenta di circa due punti percentuali. Le proteine della pasta, però, come per la maggior parte dei derivati dei cereali, non hanno un alto valore biologico, in quanto carenti di aminoacidi essenziali come la lisina. Il contenuto di vitamine e sali minerali è piuttosto basso, poiché questi elementi sono localizzati principalmente negli strati esterni della cariosside che vengono eliminati con la molitura <sup>[99]</sup>. In generale, la pasta è considerata un'ottima fonte di carboidrati ed una fonte moderata di proteine e vitamine <sup>[70]</sup>. Tuttavia, considerata la sua notevole diffusione in svariati regimi alimentari, la pasta può essere fortificata con specifici ingredienti per aumentarne il valore nutrizionale e renderla un alimento funzionale <sup>[70-72]</sup>.

Attualmente l'ortica sta subendo una rivalutazione nel settore industriale alimentare, in particolare quale ingrediente innovativo nella produzione di pasta alimentare speciale. Inizialmente l'utilizzo è nato con l'intento della produzione di pasta verde, in alternativa all'utilizzo largamente diffuso dello spinacio. Tuttavia, dato il potenziale nutrizionale delle foglie di ortica si può ipotizzare un beneficio in termini di apporto di nutrienti primari, in particolare sali minerali, di composti fenolici e di carotenoidi derivato dall'utilizzo delle foglie di ortica come ingrediente funzionale.

Per tali motivi in questa parte del lavoro, l'attenzione è stata rivolta allo studio di pasta speciale a base di ortica, posta a confronto con la pasta tradizionale, e si sono valutate le differenze in termini di apporto proteico e minerale ed in termini di apporto generale e specifico di molecole ad attività antiossidante.

### 4.3.1 Apporto proteico, minerale e studio delle proprietà antiossidanti

In questa fase del lavoro sono state poste a confronto tre coppie di campioni di pasta. La prima coppia, acquistata dal commercio e di provenienza industriale, consiste in mezzane all'uovo (sigla M) e mezzane all'uovo con l'aggiunta del 2,5% di ortica disidratata (sigla M-O).

Provenienza	Sigla	Campione	Ingredienti
Commerciale	M	Mezzane all'uovo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Semola di grano duro</li><li>• 24% uovo</li></ul>
	M-O	Mezzane all'uovo e ortica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Semola di grano duro</li><li>• 24% uovo</li><li>• 2,5% ortica disidratata</li></ul>
Laboratorio	PF1	Pasta fresca	<ul style="list-style-type: none"><li>• Farina 0</li><li>• Acqua</li><li>• 5% ortica</li></ul>
	PF1-O	Pasta fresca con ortica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Farina 0</li><li>• Acqua</li><li>• 5% ortica</li></ul>
	PF2	Pasta fresca all'uovo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Farina 0</li><li>• Acqua</li><li>• Uovo</li><li>• 5% ortica</li></ul>
	PF2-O	Pasta fresca all'uovo con ortica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Farina 0</li><li>• Acqua</li><li>• Uovo</li><li>• 5% ortica</li></ul>

Tabella 4.10

Campioni oggetto di studio per la valutazione delle caratteristiche bromatologiche e delle proprietà antiossidanti di pasta speciale all'ortica a confronto con pasta tradizionale e pasta all'uovo.

Le restanti due coppie di campioni consistono in pasta fresca preparata in laboratorio utilizzando gli ingredienti riportati in tabella 4.10. E' stata preparata pasta fresca (sigla PF1) con la corrispondente pasta fresca all'ortica (sigla PF1-O) e pasta fresca all'uovo (PF2) con la

corrispondente pasta fresca all'uovo addizionata di ortica (PF2-O). Nelle paste all'ortica preparate in laboratorio è stato addizionato il 5% in peso di ortica foglie fresche (campione W0). Le foglie di ortica sono state lavate e sbollentate in padella per 10 minuti: l'acqua di cottura è stata scolata e le foglie umide utilizzate come ingrediente. Gli impasti preparati sono stati stesi, tagliati a strisce ed essiccati a 45°C.

Tutti i campioni, prima di essere sottoposti ad analisi, sono stati ulteriormente essiccati a 60°C per 16 ore in modo da ottenere il materiale totalmente privo di umidità senza favorire l'instaurarsi della reazione di Maillard. Infine il materiale secco è stato finemente macinato con un mulino a coltelli Grindomix GM200 (Retsch, Dusseldorf, Germania).

Campione	Contenuto proteico			Frazione minerale totale		
	(µg/100g)			(µg/100g)		
<b>Pasta all'uovo</b>						
<b>M</b>	12,56	±	0,12	1,09	±	0,08
<b>M-O</b>	13,52	±	0,06	1,62	±	0,03
<b>Pasta fresca</b>						
<b>PF1</b>	11,11	±	0,09	0,53	±	0,02
<b>PF1-O</b>	13,39	±	0,11	1,84	±	0,08
<b>Pasta fresca all'uovo</b>						
<b>PF2</b>	14,33	±	0,05	0,97	±	0,02
<b>PF2-O</b>	15,36	±	0,08	2,01	±	0,01

Tabella 4.11

Contenuto proteico e frazione minerale totale in campioni di pasta all'ortica (M-O, PF1-O, PF2-O) confrontati coi rispettivi campioni non fortificati (M, PF1, PF2); media ± ds, N=6.

I risultati riportati in tabella 4.11 indicano che l'aggiunta dell'ortica come ingrediente per pasta alimentare speciale determina in tutti in casi studiati un aumento del contenuto proteico e della frazione minerale totale. In particolare, l'aumento maggiormente significativo si ha nel contenuto in ceneri, che aumenta di circa il 60% nel campione di provenienza commerciale, raddoppia nella pasta fresca all'uovo e triplica nella pasta fresca.

Riguardo all'analisi specifica della componente minerale nella pasta fortificata con ortica si ha un aumento del contenuto di potassio, calcio e magnesio tra i macroelementi (tabella 4.12) e di tutti gli oligoelementi presi in considerazione: ferro, rame, zinco e manganese (tabella 4.13).

Campioni	Potassio (mg/g)	Calcio (mg/g)	Magnesio (mg/g)	Sodio (mg/g)
<b>Pasta all'uovo</b>				
<b>M</b>	2,66 ± 0,03	0,21 ± 0,00	0,43 ± 0,01	0,34 ± 0,01
<b>M-O</b>	3,32 ± 0,14	0,71 ± 0,00	0,61 ± 0,06	0,32 ± 0,05
<b>Pasta fresca</b>				
<b>PF1</b>	1,23 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<b>PF1-O</b>	1,89 ± 0,02	2,89 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,06 ± 0,00
<b>Pasta fresca all'uovo</b>				
<b>PF2</b>	1,49 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,01
<b>PF2-O</b>	1,98 ± 0,33	2,34 ± 0,08	0,58 ± 0,00	0,27 ± 0,03

Tabella 4.12

Valutazione dell'apporto di macroelementi in campioni di pasta all'ortica (M-O, PF1-O, PF2-O) confrontati coi rispettivi campioni non fortificati (M, PF1, PF2); media ± ds, N=6.

Il contenuto di potassio, calcio, magnesio, ferro, manganese e rame aumenta in modo significativo in seguito all'aggiunta di ortica come ingrediente in tutti i campioni analizzati. Il contenuto di zinco aumenta in maniera significativa nel caso dei campioni di pasta all'uovo di provenienza commerciale, mentre rimane invariato nei campioni di pasta fresca prodotti in laboratorio. Il contenuto di sodio rimane invariato in tutti i campioni analizzati.

Campioni	Ferro (µg/g)	Manganese (µg/g)	Zinco (µg/g)	Rame (µg/g)
<b>Pasta all'uovo</b>				
<b>M</b>	11,5 ± 2,7	9,4 ± 0,1	14,8 ± 1,1	2,6 ± 0,3
<b>M-O</b>	48,4 ± 8,6	10,9 ± 0,1	28,1 ± 3,3	3,3 ± 0,0
<b>Pasta fresca</b>				
<b>PF1</b>	19,2 ± 5,5	6,9 ± 0,1	9,7 ± 2,7	1,4 ± 0,0
<b>PF1-O</b>	54,0 ± 5,2	13,7 ± 0,0	9,6 ± 2,2	2,5 ± 0,1
<b>Pasta fresca all'uovo</b>				
<b>PF2</b>	34,9 ± 11,7	6,7 ± 0,1	11,3 ± 0,1	1,5 ± 0,0
<b>PF2-O</b>	70,7 ± 13,7	13,0 ± 0,2	14,9 ± 5,3	2,4 ± 0,8

Tabella 4.13

Valutazione dell'apporto di oligoelementi in campioni di pasta all'ortica (M-O, PF1-O, PF2-O) confrontati coi rispettivi campioni non fortificati (M, PF1, PF2); media ± ds, N=6.

Sugli stessi campioni è stato determinato il contenuto totale di polifenoli ed è stata valutata la capacità antiossidante nei confronti del radicale ABTS.

Dal grafico 4.8 si osserva che per ciascuna coppia di campioni, quelli contenenti ortica esprimono un quantitativo polifenolico maggiore rispetto ai campioni che non la contengono: M-O (1508 $\mu\text{g/g}$ ) ha un contenuto polifenolico totale superiore del 32% rispetto M (1141 $\mu\text{g/g}$ ), PF1-O (838 $\mu\text{g/g}$ ) del 28% rispetto a PF1 (652 $\mu\text{g/g}$ ) e PF2-O (952 $\mu\text{g/g}$ ) del 16% rispetto PF2 (821,756 $\mu\text{g/g}$ ).

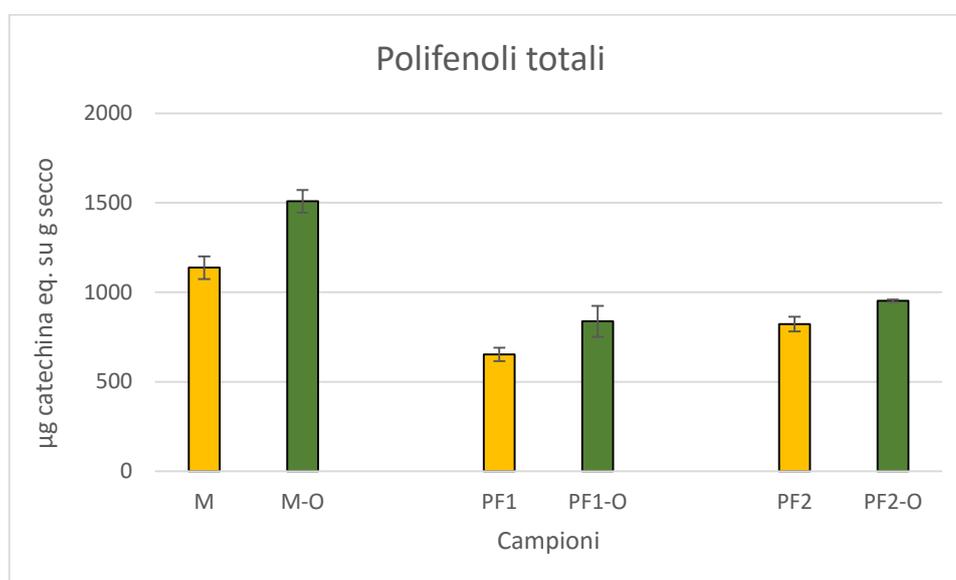


Grafico 4.8

Contenuto totale di polifenoli in campioni di pasta (media  $\pm$  ds, N=6). M, mezzane all'uovo; PF1, pasta fresca; PF2, pasta fresca all'uovo; M-O, PF1-O, PF2-O, campioni di pasta fortificata con ortica.

L'utilizzo dell'ortica come ingrediente per la produzione di pasta alimentare speciale determina un aumento del contenuto polifenolico totale determinato con il metodo Folin-Ciocalteu, rispetto alla corrispondente pasta tradizionale o pasta all'uovo.

Il potere antiossidante è stato valutato perfezionando ed applicando un metodo di determinazione diretta, partendo da indicazioni di letteratura [100,101]. Nei cereali e nelle matrici a base cerealicola buona parte dei componenti fenolici ad attività antiossidante sono legati alla frazione polisaccaridica insolubile e *bound phenolics* [77]. Queste molecole non risultano estraibili mediante macerazione con miscele di solventi e di conseguenza i metodi di analisi della frazione antiossidante basati su di una fase estrattiva non tengono in considerazione l'apporto di questa frazione insolubile [78]. Il metodo ABTSd, descritto nella sezione 3.2.3,

permette di determinare il potere antiossidante totale mediante interazione diretta tra la matrice da analizzare e la soluzione contenente il radicale ABTS [80].

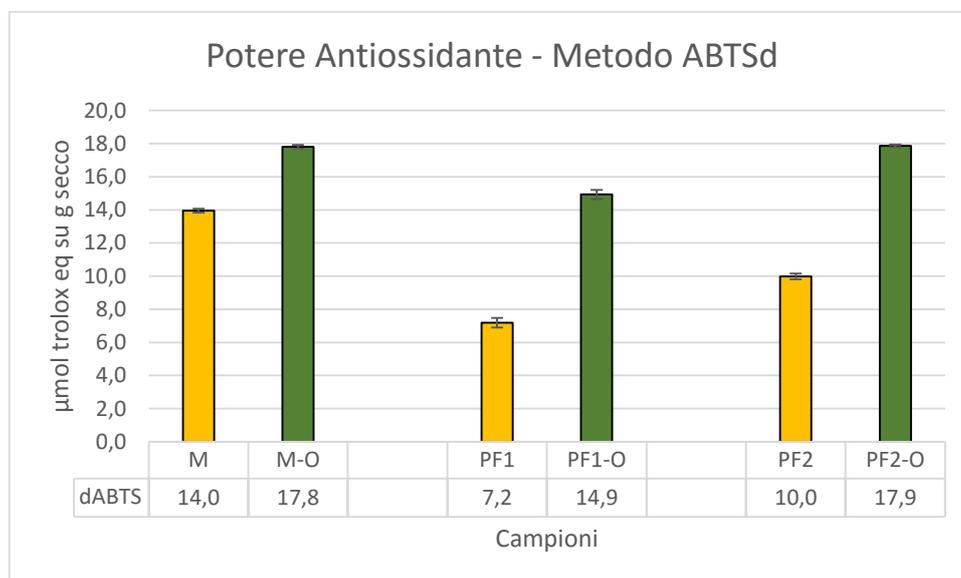


Grafico 4.9

Capacità antiossidante nei confronti del radicale ABTS di campioni di pasta (media  $\pm$  ds, N=6), determinata attraverso il metodo diretto ABTSd. M, mezzane all'uovo; PF1, pasta fresca; PF2, pasta fresca all'uovo; M-O, PF1-O, PF2-O, campioni di pasta fortificata con ortica.

I risultati riportati nel grafico 4.9 indicano un aumento del potere antiossidante della pasta fortificata con ortica nei confronti dei rispettivi campioni di controllo. Nel caso dei campioni PF1 il potere antiossidante nei confronti del radicale ABTS risulta doppio nella pasta con ortica, mentre nel caso dei campioni PF2 si ha un aumento del 79%. Nei campioni commerciali (M) l'aumento percentuale risulta del 27%.

I risultati indicano che i polifenoli presenti nelle foglie di ortica sono efficacemente trasferiti ad un prodotto elaborato come la pasta e questo trasferimento si riflette in un aumento significativo del potere antiossidante nei campioni fortificati, sia nel caso di pasta secca commerciale preparata utilizzando ortica in forma di polvere disidratata sia nel caso di pasta secca preparata utilizzando foglie di ortica precedentemente cotte.

### 4.3.2 Studio specifico dei composti fenolici e dei carotenoidi

I composti fenolici ed i carotenoidi principali caratteristici delle foglie di ortica (varietà *dioica*) sono stati identificati in una fase precedente del lavoro (sezione 4.2). Il proseguimento dello studio dell'ortica come ingrediente per pasta alimentare speciale ha previsto la valutazione di queste molecole in campioni forniti direttamente da un'azienda produttrice. I campioni, descritti in tabella 4.14, comprendono due tipi di pasta secca all'uovo, ciascuno con il corrispondente campione preparato coi medesimi ingredienti ed addizionato con polvere di ortica disidratata. I due gruppi rappresentano pasta di formati differenti e sono lotti di produzione diversi.

Inoltre, la stessa azienda produttrice, ha fornito l'ortica disidratata (polvere) utilizzata come materia prima.

Gruppo	Sigla	Descrizione	Ingredienti
Pasta 1	P1-T	Gramigna all'uovo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Semola di grano duro</li><li>• 24% uovo</li></ul>
	P1-O	Gramigna all'uovo con ortica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Semola di grano duro</li><li>• 24% uovo</li><li>• 2,5% ortica disidratata</li></ul>
Pasta 2	P2-T	Tagliatelle all'uovo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Semola di grano duro</li><li>• 24% uovo</li></ul>
	P2-O	Tagliatelle all'uovo con ortica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Semola di grano duro</li><li>• 24% uovo</li><li>• 2,5% ortica disidratata</li></ul>

Tabella 4.14

Elenco dei campioni di pasta secca utilizzati per la determinazione specifica dei composti fenolici e dei carotenoidi.

I campioni, prima di essere sottoposti ad analisi, sono stati essiccati a 60°C per 16 ore in modo da ottenere il materiale totalmente privo di umidità ed il materiale secco è stato finemente macinato con un mulino a coltelli Grindomix GM200 (Retsch, Dusseldorf, Germania).



Figura 4.14

Campione P2-O, tagliatelle all'uovo con ortica.



Figura 4.15

Campione P1-O, gramigna all'uovo con ortica.

I composti fenolici sono stati estratti dai campioni di pasta utilizzando il metodo descritto nella sezione 3.2.1 che prevede l'estrazione chimica della frazione solubile e l'estrazione enzimatica dei *bound phenolics*. Gli estratti sono stati analizzati separatamente in HPLC ed il contenuto totale di ciascuna molecola è stato ottenuto sommando il quantitativo delle due estrazioni.

I polifenoli presenti nella materia prima sono stati estratti utilizzando esclusivamente l'estrazione chimica e la quantificazione è riportata in tabella 4.15: è stato possibile identificare e quantificare acido clorogenico, acido caffeilmalico, rutina ed isoquercetina.

Campione	Ac. Clorogenico	Ac. Caffeilmalico	Rutina	Isoquercetina
<b>Ortica disidratata in polvere</b>	2275 ± 126	3474 ± 58	1670 ± 136	386 ± 9

Tabella 4.15

Contenuto specifico di polifenoli espresso in µg/g di polvere di ortica disidratata (media ± ds, N=6).

Dal punto di vista qualitativo, nei campioni di pasta all'ortica, sono stati identificati acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina che sono i composti fenolici presenti in maggior concentrazione nelle foglie di ortica e nella materia prima disidratata (figura 4.16).

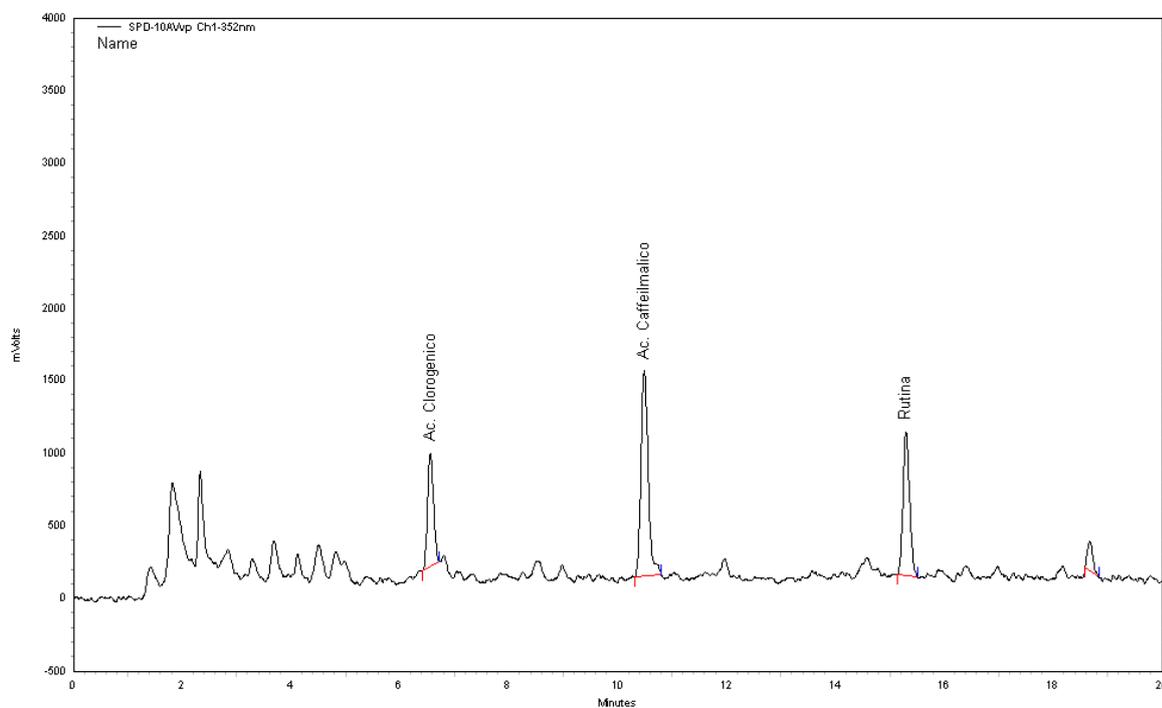


Figura 4.16

Separazione cromatografica dei polifenoli nella frazione solubile del campione di pasta all'ortica P1-O.

Nei campioni di pasta secca all'uovo non si trovano tracce dei polifenoli caratteristici delle foglie di ortica. Questi invece possono essere quantificati nei campioni di pasta fortificata (tabella 4.16). L'acido caffeilmalico risulta essere il composto fenolico presente in maggior concentrazione in entrambi i tipi di pasta all'ortica.

Campione	Ac. Clorogenico	Ac. Caffeilmalico	Rutina
P1-T	nd	nd	nd
P1-O	224,6	267,7	152,9
P2-T	nd	nd	nd
P2-O	28,4	36,9	28,6

Tabella 4.16

Contenuto specifico di polifenoli espresso in  $\mu\text{g/g}$  di pasta secca (media,  $N=6$ ,  $CV<10\%$ ). Contenuto totale: frazione solubile + frazione *bound*. nd: non determinabile. P1-T, pasta 1 all'uovo; P1-O, pasta 1 all'ortica; P2-T, pasta 2 all'uovo; P2-O, pasta 2 all'ortica.

La determinazione quantitativa indica differenze significative tra i due campioni di pasta all'ortica, nonostante questi campioni provengano dalla stessa azienda produttrice e riportino in etichetta un quantitativo simile di ortica disidratata utilizzata come ingrediente. Molto probabilmente nella produzione delle due paste all'ortica è stata utilizzata una materia prima differente: nel caso del campione P1-O una polvere di ortica ricca in composti fenolici rispetto a quella utilizzata per la produzione del campione P2-O. Questo risultato indica come sia necessaria una standardizzazione degli ingredienti da utilizzare.

La pasta viene consumata in seguito ad un processo di cottura che può andare ad influire sul contenuto dei composti fenolici; questi infatti potrebbero essere degradati durante il processo oppure persi nell'acqua di cottura. A tal fine è stato valutato l'impatto della cottura sul campione di pasta 1 all'ortica: circa 50g di pasta sono stati cotti in 500mL di acqua precedentemente portata ad ebollizione per il tempo indicato in etichetta. Al termine l'acqua di cottura è stata scolata e la pasta cotta è stata essiccata a  $60^{\circ}\text{C}$  per 16 ore. Infine il campione secco è stato finemente macinato e sottoposto ad estrazione dei composti fenolici.

I risultati sono riportati in tabella 4.17: la perdita maggiore si ha a carico della rutina (42,9%), mentre l'acido caffeilmalico subisce una perdita in fase di cottura del 35,6% e l'acido clorogenico del 18,5%.

<u>Pasta 1</u> P1-O	Pasta secca				Pasta cotta				Perdita %
	Solubile	Bound	Totale	% Bound	Solubile	Bound	Totale	% Bound	
<b>Ac. Clorogenico</b>	139,1	85,4	<b>224,6</b>	38,0	91,3	91,7	<b>183,0</b>	50,1	<b>18,5</b>
<b>Ac. Caffeilmalico</b>	203,1	64,6	<b>267,7</b>	24,1	97,9	74,6	<b>172,5</b>	43,2	<b>35,6</b>
<b>Rutina</b>	141,3	11,6	<b>152,9</b>	7,6	73,9	13,4	<b>87,3</b>	15,3	<b>42,9</b>

Tabella 4.17

Effetto della cottura sul contenuto fenolico del campione di pasta all'ortica P1-O.

Contenuto espresso in  $\mu\text{g/g}$  su campione secco (media, N=4).

La perdita di ciascuna molecola fenolica avviene a carico della frazione solubile, mentre il contenuto assoluto per tutti e tre i fenoli nella frazione *bound* aumenta in seguito al processo di cottura. Infatti, la percentuale di *bound* dell'acido clorogenico aumenta dal 38,0% al 50,1% in seguito a cottura, l'acido caffeilmalico *bound* aumenta dal 24,1% al 43,2% e la rutina dal 7,6% al 15,3%. La percentuale di perdita di ciascuna molecola in seguito a cottura risulta inversamente proporzionale alla percentuale di *bound* iniziale. Il legame con la matrice polisaccaridica protegge le molecole fenoliche dalla perdita e/o degradazione in fase di cottura. Infine, dai risultati ottenuti pare che gli acidi fenolici presentino una maggior abilità di legarsi alla struttura polisaccaridica e quindi trovarsi in forma *bound* rispetto al flavonolo rutina: questo legame li protegge maggiormente dalla perdita in seguito a cottura.

I composti fenolici caratteristici e predominanti nelle foglie di ortica, cioè acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina:

- sono efficacemente trasferiti dalla materia prima elaborata al prodotto finale dal quale sono rintracciabili e quantificabili;
- non sono presenti nella pasta non fortificata, quindi rappresentano costituenti unici della pasta all'ortica;
- sono soggetti a perdita durante la cottura in maniera dipendente dal grado di *bound* che ciascuna molecola possiede; la perdita dovuta a cottura è inferiore al 50%, di conseguenza buone quantità vengono realmente ingerite consumando pasta all'ortica.

L'analisi dei carotenoidi è stata condotta sui campioni descritti in tabella 4.14 seguendo il metodo estrattivo e la separazione cromatografica descritti nella sezione 3.3.2. L'estrazione mediante saponificazione basica a caldo permette il rilascio dei carotenoidi intrappolati nella matrice polisaccaridica [85].

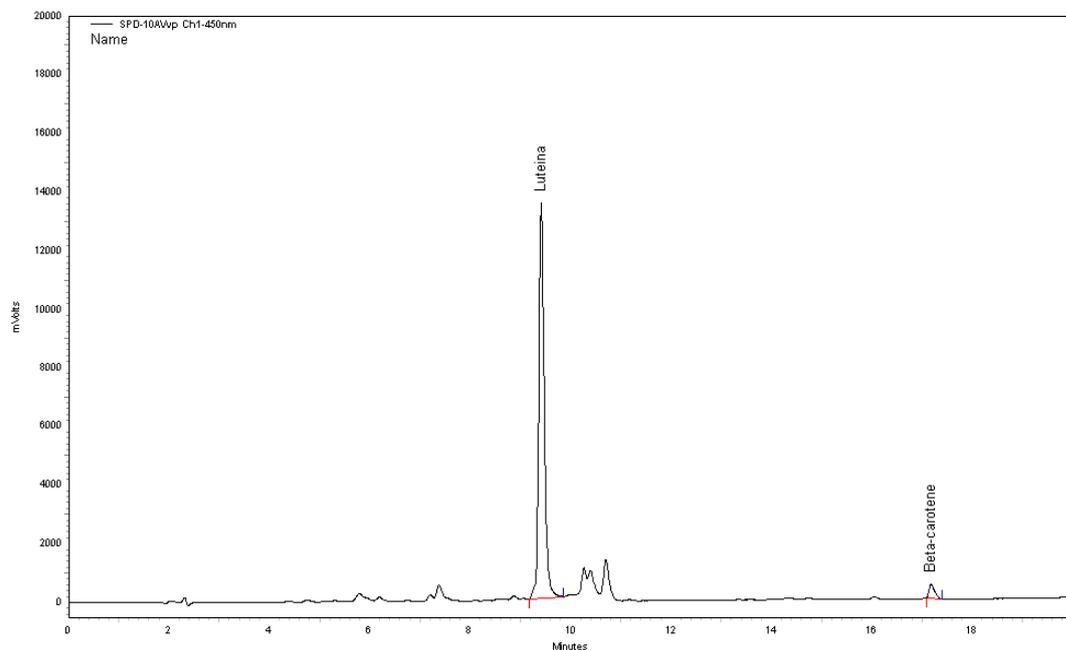


Figura 4.17

Separazione cromatografica di luteina e  $\beta$ -carotene nel campione di pasta all'uovo P1-T.

Sui campioni oggetto di studio sono stati determinati quantitativamente luteina e  $\beta$ -carotene. Nel caso dei carotenoidi, questi sono già presenti nella pasta tradizionale, in quanto costituenti naturali della semola e dell'uovo (figura 4.17).

	Luteina			$\beta$ -Carotene		
<b>P1-T</b>	6,55	±	0,10	0,76	±	0,00
<b>P1-O</b>	8,26	±	0,10	1,59	±	0,02
<b>P2-T</b>	10,80	±	0,19	1,01	±	0,01
<b>P2-O</b>	10,66	±	0,25	1,51	±	0,07

Tabella 4.18

Contenuto di luteina e  $\beta$ -carotene in campioni di pasta secca tradizionale ed all'ortica.

Risultati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di prodotto secco (media  $\pm$  ds, N=6). P1-T, pasta 1 all'uovo; P1-O, pasta 1 all'ortica; P2-T, pasta 2 all'uovo; P2-O, pasta 2 all'ortica.

L'aggiunta di ortica determina nel campione P1-O un aumento significativo del contenuto di luteina e di  $\beta$ -carotene rispetto a P1-T, mentre nel campione P2-O si riscontra un aumento significativo solo del  $\beta$ -carotene rispetto a P2-T (tabella 4.18).

Per valutare meglio l'impatto dell'aggiunta di ortica su pasta secca con oppure senza uovo sono stati preparati in laboratorio quattro tipi di pasta utilizzando come ingredienti semola e uovo acquistati dalla grande distribuzione e polvere di ortica fornita dall'azienda produttrice. Una volta preparati gli impasti questi sono stati stesi e lasciati essiccare all'aria. Successivamente ciascun campione di pasta è stato essiccato a 60°C per 16 ore e finemente macinato.

Gli impasti preparati, la loro denominazione e la loro composizione sono riportati in tabella 4.19 ed illustrati in figura 4.18.

Campioni	Denominazione	Composizione
<b>Pasta di semola</b>	P	- semola - acqua
<b>Pasta di semola all'uovo</b>	PU	- semola - 20% uovo - acqua
<b>Pasta di semola all'ortica</b>	P-O	- semola - 3,5% ortica in polvere - acqua
<b>Pasta di semola all'uovo all'ortica</b>	PU-O	- semola - 20% uovo - 3,5% ortica in polvere - acqua

Tabella 4.19

Campioni sperimentali di pasta utilizzati per lo studio dei carotenoidi; denominazione ed ingredienti.



Figura 4.18

Campioni sperimentali di pasta preparati in laboratorio.

In tabella 4.20 sono riportati i risultati dell'analisi HPLC per la determinazione di luteina e  $\beta$ -carotene. L'analisi su ciascun ingrediente indica come i due carotenoidi presi in considerazione siano presenti sia nella semola sia nell'uovo: il contenuto di luteina e  $\beta$ -carotene nella semola è minore rispetto a quello in uovo e ortica.

Di conseguenza, anche la semplice pasta secca tradizionale prodotta con solo semola ed acqua è fonte di luteina e  $\beta$ -carotene. L'aggiunta di uovo determina un incremento dei due carotenoidi considerati (campione PU). Ciò è valido anche per l'aggiunta di ortica nella produzione di pasta secca speciale (campione P-O). L'aggiunta di uovo ed ortica determina un aumento sinergico del contenuto di luteina e  $\beta$ -carotene (campione PU-O).

Ingredienti	Luteina			$\beta$ -Carotene		
	Media	ds	Media	ds	Media	ds
Semola	6,88	± 0,12	0,33	± 0,01		
Uovo	23,12	± 0,68	2,23	± 0,06		
Ortica essiccata	51,93	± 1,05	3,51	± 0,29		
<b>Impasti</b>						
Semola	4,98	± 0,08	0,26	± 0,01		
Semola Uovo 20%	8,81	± 0,02	0,67	± 0,00		
Semola Ortica 3,5%	7,46	± 0,07	0,42	± 0,03		
Semola Uovo 20% Ortica 3,5%	12,68	± 0,00	1,07	± 0,00		

Tabella 4.20

Contenuto di luteina e  $\beta$ -carotene in campioni sperimentali di pasta secca.

Risultati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di prodotto secco (media  $\pm$  ds, N=6).

Lo studio sui carotenoidi è stato completato valutando l'effetto della cottura sui 4 campioni di provenienza industriale descritti in tabella 4.14. Circa 50g di pasta sono stati cotti in 500mL di acqua precedentemente portata ad ebollizione per il tempo indicato in etichetta. Al termine l'acqua di cottura è stata scolata e la pasta cotta è stata essiccata a 60°C per 16 ore. Infine il

campione secco è stato finemente macinato e sottoposto ad estrazione e quantificazione in HPLC di luteina e  $\beta$ -carotene.

In tabella 4.21 sono riportati i risultati: la cottura determina una perdita di luteina e  $\beta$ -carotene maggiore nei campioni fortificati con ortica rispetto ai campioni di pasta all'uovo. In P1-T e P2-T non c'è perdita dovuta a cottura di  $\beta$ -carotene, mentre la perdita nel contenuto di luteina è del 9,77% per il campione P1-T e del 15,93% per il campione P2-T.

Nelle paste con ortica la perdita di luteina corrisponde al 20,21% del contenuto del campione P1-O ed al 22,98% del contenuto del campione P2-O. In questi campioni si ha anche una diminuzione del contenuto di  $\beta$ -carotene, del 18,87% in P1-O e del 18,54% in P2-O.

Campione	Luteina			$\beta$ -Carotene		
	Secco	Cotto	Perdita %	Secco	Cotto	Perdita %
<b>P1-T</b>	6,55	5,91	<b>9,77</b>	0,76	0,83	/
<b>P1-O</b>	8,26	6,59	<b>20,21</b>	1,59	1,29	<b>18,87</b>
<b>P2-T</b>	10,80	9,08	<b>15,93</b>	1,01	1,05	/
<b>P2-O</b>	10,66	8,21	<b>22,98</b>	1,51	1,23	<b>18,54</b>

Tabella 4.21

Effetto della cottura sul contenuto di carotenoidi nei campioni industriali di pasta secca.

Contenuto espresso in  $\mu\text{g/g}$  su campione secco (media, N=6). P1-T, pasta 1 all'uovo; P1-O, pasta 1 all'ortica; P2-T, pasta 2 all'uovo; P2-O, pasta 2 all'ortica.

La perdita di luteina e  $\beta$ -carotene in seguito al processo di cottura determina sul prodotto cotto contenuti paragonabili dei due carotenoidi tra pasta tradizionale e pasta fortificata con ortica, annullando in parte l'incremento del contenuto dovuto alla fortificazione.

Luteina e  $\beta$ -carotene sono carotenoidi presenti nelle foglie di ortica, tuttavia sono rintracciabili anche nella semola, costituente principale della pasta, e nell'uovo, ingrediente per la produzione di pasta secca e fresca a livello industriale.

La fortificazione con ortica determina un aumento del contenuto sia di luteina sia di  $\beta$ -carotene nel prodotto finito. Tuttavia nei campioni fortificati con ortica la perdita di queste molecole in seguito al processo di cottura è maggiore rispetto ai campioni di pasta senza ortica.

#### 4.4 Studi di bioaccessibilità e trasporto transepiteliale

L'identificazione e la quantificazione dei composti bioattivi non è sufficiente per avere un quadro preciso dell'efficacia nutrizionale di un prodotto alimentare. Questo perché diverse classi di composti (tra cui polifenoli e carotenoidi) presenti in alimenti naturali o elaborati hanno effetti potenzialmente nutraceutici, tuttavia gli effetti benefici possono essere limitati dalla scarsa e variabile biodisponibilità [54,58].

Il concetto di bioaccessibilità (BAC) definisce la frazione di una molecola che viene rilasciata dalla matrice alimentare nel tratto gastrointestinale, si solubilizza e diventa disponibile per l'assorbimento: la BAC include la trasformazione del cibo durante le fasi di digestione, ma esclude l'assorbimento epiteliale intestinale ed il metabolismo pre-sistemico [58]. La BAC di un nutriente o di qualsiasi molecola assunta attraverso la dieta viene generalmente valutata attraverso l'utilizzo di modelli *in vitro* che permettono la simulazione dell'assunzione e dei processi digestivi di prodotti alimentari.

Recentemente numerosi modelli *in vitro* statici e dinamici sono stati messi a punto ed applicati per la valutazione della bioaccessibilità di molecole potenzialmente bioattive da matrici alimentari [56,58]. I modelli gastrointestinali dinamici si avvalgono di apparati controllati da programmi automatici che mirano a riprodurre nella maniera più realistica possibile la digestione fisiologica. In particolare si cerca di simulare le geometrie del tratto gastrointestinale (forme, volumi, orientamento), le forze fisiche implicate nella digestione (forze di taglio e frantumazione, pressione esercitata dalla peristalsi) e i parametri biochimici (concentrazione di cibo, pH, tipologia e concentrazione di secrezioni digestive) [52]. Questi modelli permettono il campionamento dei fluidi gastrointestinali simulati ad ogni step della digestione (bocca, stomaco, intestino, colon) e soprattutto possono essere accoppiati a modelli di studio del trasporto transepiteliale (*Caco-2* cell model) [56,62].

La bioaccessibilità dei composti fenolici e dei carotenoidi derivati dall'utilizzo di ortica a fini alimentari è stata valutata mettendo a punto ed applicando un modello gastrointestinale dinamico per simulare *in vitro* l'assunzione e la digestione di alcuni prodotti alimentari a base di ortica. Inoltre è stato valutato l'assorbimento dei composti fenolici a livello delle cellule epiteliali intestinali utilizzando il modello cellulare *Caco-2* ed è stata misurata la capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati nei confronti del radicale anione superossido, utilizzando il metodo della fotochemiluminescenza (Photochem®).

La messa a punto del modello gastrointestinale *in vitro*, lo studio del trasporto transepiteliale mediante il modello cellulare *Caco-2* e la determinazione della bioaccessibilità dei composti

fenolici sono stati eseguiti presso il “Laboratory of Food Chemistry and Toxicology” della Universitat de València, Facultat de Farmàcia,

Il modello gastrointestinale dinamico *in vitro* prevede l'utilizzo di un biofermentatore Infors (Bottmingen, Svizzera) descritto nella sezione 3.4.1. All'interno del biofermentatore sono simulate le diverse fasi della digestione gastrointestinale: fase gastrica, fase duodenale o dell'intestino tenue, fase colon o metabolismo a livello dell'intestino crasso. La fase di masticazione e digestione salivare è stata simulata attraverso l'utilizzo di un masticatore Stomacher IUL Instrument (Barcellona, Spagna).

I campioni sottoposti alla digestione simulata sono elencati in tabella 4.22.

Campione	Sigla	Descrizione	Provenienza
<b>Pasta 1</b>	P1-T	Pasta all'uovo	Industriale
<b>Pasta 1 all'ortica</b>	P1-O	Pasta all'uovo con ortica	Industriale
<b>Pasta 2 all'ortica</b>	P2-O	Pasta all'uovo con ortica	Industriale
<b>Pane all'ortica</b>	B-O	Pane	Laboratorio
<b>Tisana all'ortica</b>	T-O	Tisana preparata con foglie di ortica essicata	Commerciale
<b>Integratore a base di ortica</b>	CAP	Capsule molli contenenti polvere di ortica essicata	Commerciale

Tabella 4.22

Elenco campioni sottoposti al modello gastrointestinale dinamico *in vitro*.

#### *Preparazione campioni*

Pasta: sono stati prelevati 40g circa esattamente pesati di campione che è stato sottoposto a cottura in 500mL di acqua precedentemente portata ad ebollizione. Al termine l'acqua di cottura è stata scolata ed il campione sottoposto a fase di masticazione e successivamente alla digestione dinamica all'interno del biofermentatore.

Pane: il campione di pane all'ortica è stato preparato impastando 600g di farina con 40g di lievito, 20g di zucchero, 10g di sale, 20g di polvere di ortica disidratata e 350mL di acqua. L'impasto è stato fatto lievitare per 30 minuti, poi è stato distribuito sullo stampo e fatto lievitare altri 30 minuti. Infine il pane è stato cotto in forno a 200°C per 40 minuti (figura 4.19).

Il pane cotto è stato tagliato a fette e circa esattamente 40g di campione sono stati utilizzati per la fase di masticazione e successivamente per la digestione all'interno del biofermentatore.



Figura 4.19

Campione di pane all'ortica (B-O) preparato in laboratorio.

Tisana: come materia prima sono state utilizzate foglie di ortica essiccate acquistate dal commercio (Herbolario Navarro, Valencia). Sono stati portati ad ebollizione circa 500mL di acqua a cui sono stati aggiunti 5g di foglie essiccate e lasciate in infusione per 10 minuti. Al termine la tisana è stata filtrata ed il residuo solido eliminato. Per la simulazione della digestione sono stati utilizzati 200mL di tisana.

La digestione è stata condotta in condizioni di stomaco pieno aggiungendo 5 biscotti alla fase di masticazione salivare. Il volume di tisana è stato aggiunto al biofermentatore prima della simulazione della fase gastrica.

Integratore: le capsule molli contenenti polvere essiccata di ortica sono state acquistate presso un'erboristeria (Herbolario Navarro, Valencia, figura 4.20). Le indicazioni di assunzione riportate in etichetta consigliano il consumo di 2 capsule subito prima di un pasto. Per simulare la condizione di stomaco pieno sono stati cotti ed utilizzati circa 30g di pasta sottoposti alla fase di masticazione. Le 2 capsule sono state inserite direttamente nel biofermentatore, senza essere sottoposte alla fase salivare.



Figura 4.20

Integratore a base di foglie di ortica (CAP).

#### 4.4.1 Bioaccessibilità e trasporto transepiteliale di composti fenolici

Col termine polifenoli si intende un gruppo molto vasto di molecole, provenienti principalmente dal mondo vegetale, all'interno del quale si possono classificare diverse strutture chimiche. Per questo motivo non si può definire a priori la bioaccessibilità e/o la biodisponibilità dei polifenoli in generale, ma ciascuna classe chimica e ciascuna molecola presentano caratteristiche intrinseche che ne influenzano il destino in seguito all'ingestione.

La rutina appartiene alla classe dei flavonoli, come derivato glicosilato della quercetina. La parte glicosidica rende la molecola più idrofila rispetto all'aglicone e ne ostacola l'assorbimento intestinale [96]. Inoltre, la parte glicosidica sembra resistere alle condizioni acide dello stomaco, quindi molto probabilmente la molecola di rutina raggiunge l'intestino senza subire modificazioni chimiche [40]. Una buona parte dei flavonoidi ingeriti attraverso la dieta risultano non assorbibili e possono raggiungere l'intestino crasso, fungere da substrato metabolico per la flora batterica intestinale ed essere metabolizzati a semplici acidi fenolici [73].

Gli acidi idrossicinnamici non esterificati sono generalmente assorbibili nel tratto gastrointestinale superiore [102]. Recentemente è stato dimostrato che lo stomaco costituisce un sito di assorbimento attivo ed alcuni acidi fenolici semplici (acido gallico, acido caffeico, acido ferulico) possono essere assorbiti a livello gastrico. Tuttavia, gli acidi fenolici esterificati, come l'acido clorogenico, presentano valori di biodisponibilità decisamente minori rispetto agli acidi fenolici semplici [37].

I composti fenolici presenti in maggior quantità nelle foglie di ortica (*U. dioica*) sono acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina. Queste molecole sono rintracciabili in prodotti alimentari elaborati come la pasta fortificata con polvere di ortica disidratata.

La bioaccessibilità di queste molecole a natura fenolica è stata studiata nei seguenti campioni:

- Pasta 1 all'ortica (P1-O);
- Pane all'ortica preparato in laboratorio (B-O);
- Tisana all'ortica (T-O);
- Integratore a base di ortica (CAP).

Non è stato possibile valutare il campione di pasta P2-O, anch'esso sottoposto a digestione simulata, a causa del basso contenuto di composti fenolici nel campione in questione, mentre nel campione di pasta P1-T non sono presenti i composti fenolici presi in considerazione.

Nei campioni di pane, tisana ed integratore sono stati estratti e quantificati i composti fenolici oggetto di studio. I risultati sono riportati in tabella 4.23.

Campione	Ac. Clorogenico	Ac. Caffeilmalico	Rutina
Pane <b>B-O</b>	66,9 µg/g	103,5 µg/g	40,3 µg/g
Tisana, <b>T-O</b>	28,0 µg/mL	57,7 µg/mL	6,6 µg/mL
Integratore, <b>CAP</b>	4813,5 µg/g	5563,1 µg/g	1415,3 µg/g

Tabella 4.23

Quantificazione di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina in prodotti alimentari a base di ortica (media, N=4, CV%<5%).

I fluidi simulati campionati al termine di ciascuna fase della digestione sono stati analizzati in HPLC secondo il metodo descritto nella sezione 3.4.3. In figura 4.21 è riportato il cromatogramma del fluido duodenale simulato della digestione del campione di pasta all'ortica P1-O.

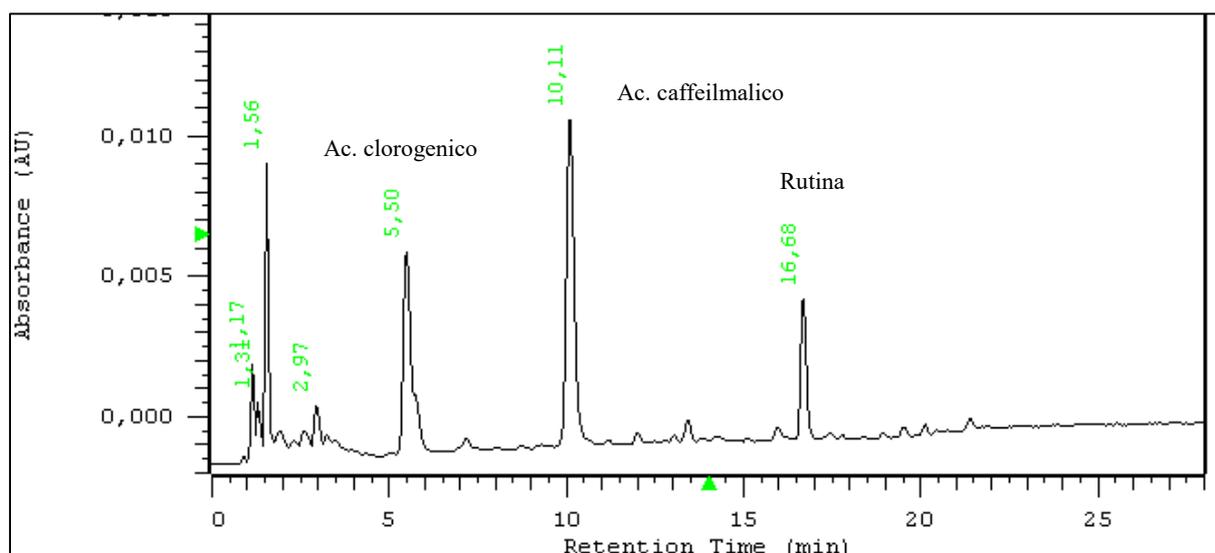


Figura 4.21

Cromatogramma del fluido duodenale simulato della digestione del campione di pasta all'ortica P1-O.

I valori di bioaccessibilità sono stati calcolati in percentuale rispetto al quantitativo realmente ingerito di ciascuna molecola. I risultati sono riportati nella tabella riassuntiva 4.24.

	<b>Pasta P1-O</b>	<b>Pane B-O</b>	<b>Tisana T-O</b>	<b>Integratore CAP</b>
<b>Acido clorogenico</b>				
Stomaco	38.5% ± 5.6%	53.1% ± 5.3%	67.9% ± 5.6%	64.6% ± 2.0%
Duodeno	66.6% ± 3.4%	82.5% ± 0.9%	95.9% ± 1.1%	85.0% ± 0.8%
Colon 2h	59.2% ± 2.4%	65.7% ± 6.3%	77.1% ± 6.0%	77.3% ± 2.4%
Colon 24h	1.4% ± 0.9%	25.6% ± 3.8%	23.2% ± 7.0%	6.3% ± 4.8%
Colon 48h	Nd <sup>1</sup>	11.3% ± 1.3%	8.4% ± 4.6%	4.2% ± 0.8%
<b>Acido caffeilmalico</b>				
Stomaco	6.2% ± 2.7%	13.5% ± 0.0%	10.9% ± 2.4%	11.5% ± 2.1%
Duodeno	93.5% ± 2.4%	90.6% ± 0.4%	86.2% ± 3.8%	88.7% ± 2.3%
Colon 2h	86.1% ± 2.0%	82.2% ± 3.9%	77.8% ± 1.3%	79.5% ± 3.8%
Colon 24h	25.1% ± 6.9%	20.4% ± 3.4%	13.6% ± 1.4%	28.7% ± 0.8%
Colon 48h	11.3% ± 3.9%	8.5% ± 0.2%	7.1% ± 2.1%	13.8% ± 0.7%
<b>Rutina</b>				
Stomaco	12.2% ± 5.2%	11.8% ± 0.5%	35.4% ± 5.1%	11.7% ± 0.3%
Duodeno	50.2% ± 8.3%	38.9% ± 0.4%	69.0% ± 3.8%	30.9% ± 0.2%
Colon 2h	43.5% ± 9.7%	38.6% ± 1.6%	70.4% ± 4.6%	36.0% ± 0.1%
Colon 24h	26.5% ± 8.1%	18.1% ± 0.6%	48.3% ± 3.4%	10.7% ± 1.0%
Colon 48h	20.0% ± 5.8%	5.9% ± 0.1%	36.3% ± 3.9%	Nd <sup>1</sup>

Tabella 4.24

Bioaccessibilità % di polifenoli durante le diverse fasi della digestione. P1-O, pasta all'ortica. B-O, pane all'ortica. T-O, tisana all'ortica. CAP, integratore a base di ortica.

Media ± ds, N=4. Nd: non determinabile.

Il tipo di matrice alimentare influenza in maniera significativa la bioaccessibilità dei composti fenolici. L'acido clorogenico (CLA) risulta mediamente più bioaccessibile durante tutte le fasi della digestione quando assunto attraverso la tisana, mentre presenta la minor BAC quando si assume pasta all'ortica. Anche la rutina (RT) è maggiormente bioaccessibile nella tisana rispetto alle altre matrici prese in considerazione. La BAC dell'acido caffeilmalico (CMA) non è influenzata significativamente dal tipo di matrice.

La BAC dei due acidi fenolici presenta il valore maggiore al termine della fase duodenale in tutti i campioni analizzati: questo risultato indica come ci sia un graduale rilascio di queste molecole dalla matrice solida durante le prime fasi della digestione. Tuttavia, anche nel caso della digestione di una matrice liquida (tisana) la BAC gastrica risulta inferiore alla BAC duodenale. Questa differenza è dovuta al minor grado di solubilizzazione di queste molecole debolmente acide nell'ambiente gastrico (simulato a pH=2,5) rispetto all'ambiente intestinale (simulato a pH=6,8). La BAC nelle fasi gastrica e duodenale della digestione è perciò

influenzata sia dalla decomposizione della matrice ingerita, quindi dal rilascio delle molecole nell'ambiente gastrointestinale, sia dalla loro capacità di solubilizzarsi nei fluidi gastrointestinali, proprietà intrinseca di ciascuna molecola.

L'acido caffeilmalico al termine della fase duodenale presenta valori di BAC maggiori rispetto all'acido clorogenico, mentre è meno bioaccessibile al termine della fase gastrica.

La rutina raggiunge il massimo di BAC tra la fase duodenale e la prima parte del metabolismo colonico simulato.

La simulazione del metabolismo a livello della flora batterica intestinale indica che i composti fenolici oggetto di studio sono substrato metabolico per i batteri del colon. Le specifiche vie metaboliche dipendono dalla popolazione batterica, dalla struttura chimica di ciascuna molecola e dalle possibili influenze delle altre molecole assunte attraverso la dieta [63].

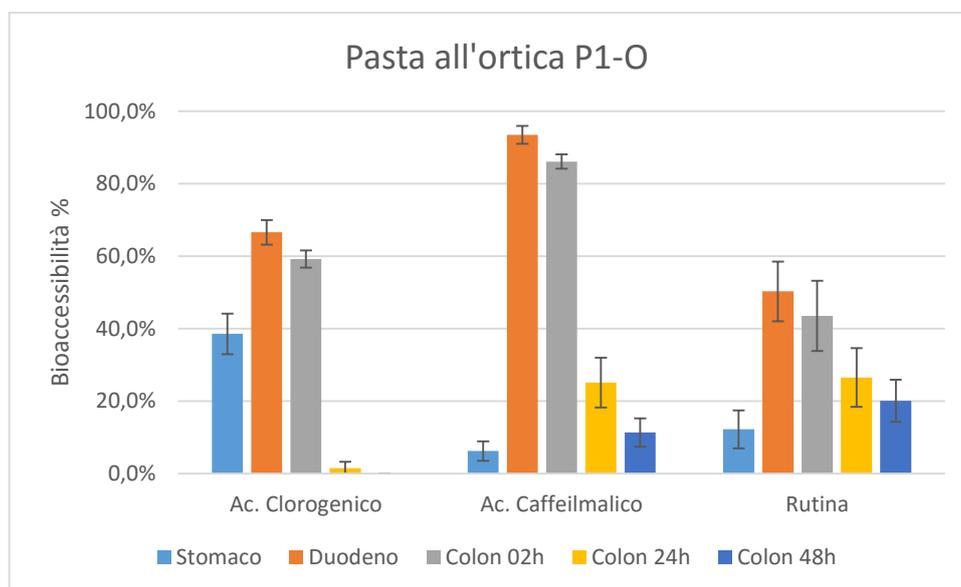


Grafico 4.10

Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di pasta all'ortica P1-O durante le fasi della digestione.

Nel campione di pasta all'ortica l'acido clorogenico viene metabolizzato intensamente, infatti al termine delle 24h rimane l'1,4% della quantità inizialmente ingerita ed al termine delle 48h la molecola non è rintracciabile. Al termine del metabolismo colonico rimane l'11,3% di acido caffeilmalico ed il 20,0% di rutina (grafico 4.10).

Nella digestione di pane all'ortica al termine delle 48h di metabolismo colonico rimangono tracce di tutti e tre i polifenoli studiati (grafico 4.11). Rispetto alla pasta all'ortica, al termine della fase duodenale l'acido clorogenico presenta maggior BAC, mentre la rutina risulta meno

bioaccessibile. L'acido caffeilmalico raggiunge un picco di 90,6% di BAC durante la digestione duodenale.

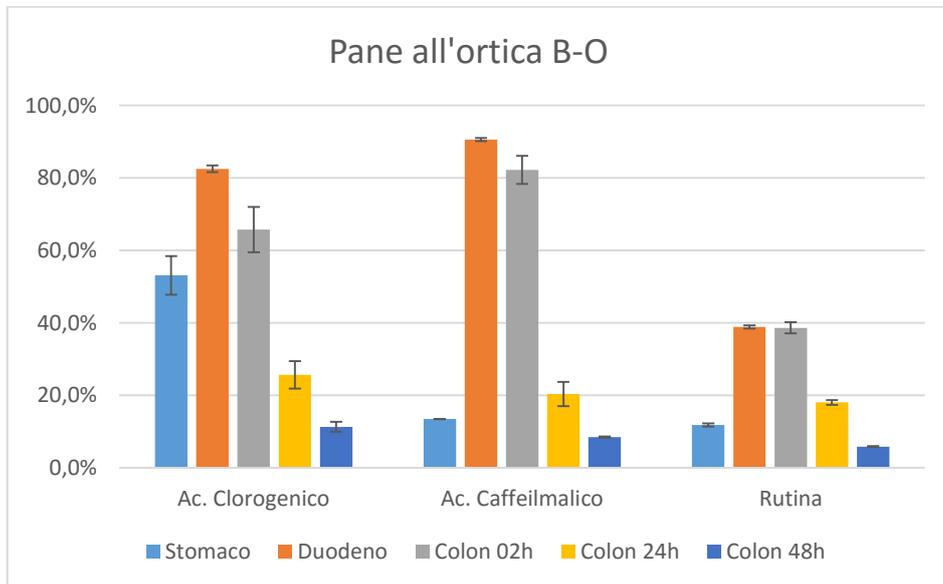


Grafico 4.11

Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di pane all'ortica B-O durante le fasi della digestione.

Nel caso di assunzione di capsule contenenti polvere di ortica essiccata, l'andamento della BAC non presenta differenze rispetto agli altri campioni. La BAC dell'acido clorogenico nella fasi gastrica e duodenale risulta maggiore rispetto all'ingestione di pasta all'ortica, mentre la BAC della rutina risulta inferiore e non supera il 40% di valore massimo. Inoltre non rimangono tracce di rutina al termine del metabolismo colonico (grafico 4.12).

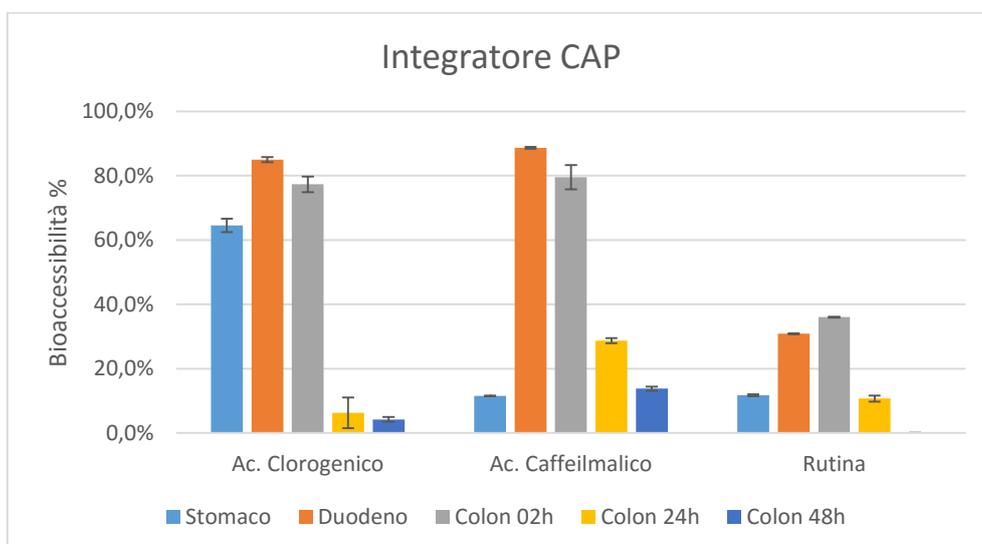


Grafico 4.12

Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di integratore CAP durante le fasi della digestione.

Nel grafico 4.13 è riportato l'andamento della BAC dei tre polifenoli studiati durante le fasi della digestione in seguito ad assunzione di una tisana all'ortica. Il campione di tisana presenta mediamente i valori maggiori di BAC per ciascuna molecola rispetto alle altre matrici studiate. Questo è dovuto al fatto che nella tisana le molecole si trovano già in soluzione e quindi non sono sottoposte al rilascio dalla matrice alimentare durante le fasi della digestione. Più del 90% di acido clorogenico ed acido caffeilmalico ingeriti sono bioaccessibili al termine della digestione duodenale.

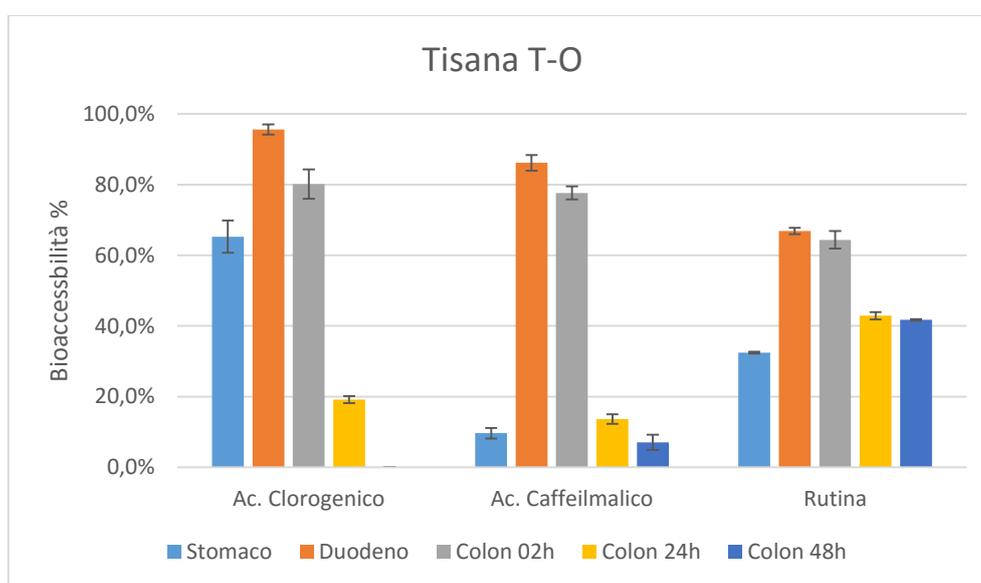


Grafico 4.13

Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di tisana all'ortica T-O durante le fasi della digestione.

L'assunzione e i processi digestivi nel campione di tisana all'ortica sono stati simulati in condizioni di stomaco pieno: tuttavia il riempimento o meno dello stomaco può essere un fattore che influisce sui processi digestivi e di solubilizzazione delle molecole studiate, influenzandone perciò la bioaccessibilità. Per tale motivo è stata eseguita anche la digestione della tisana all'ortica assunta in condizioni di stomaco vuoto, senza perciò aggiungere i 5 biscotti alla fase di masticazione salivare.

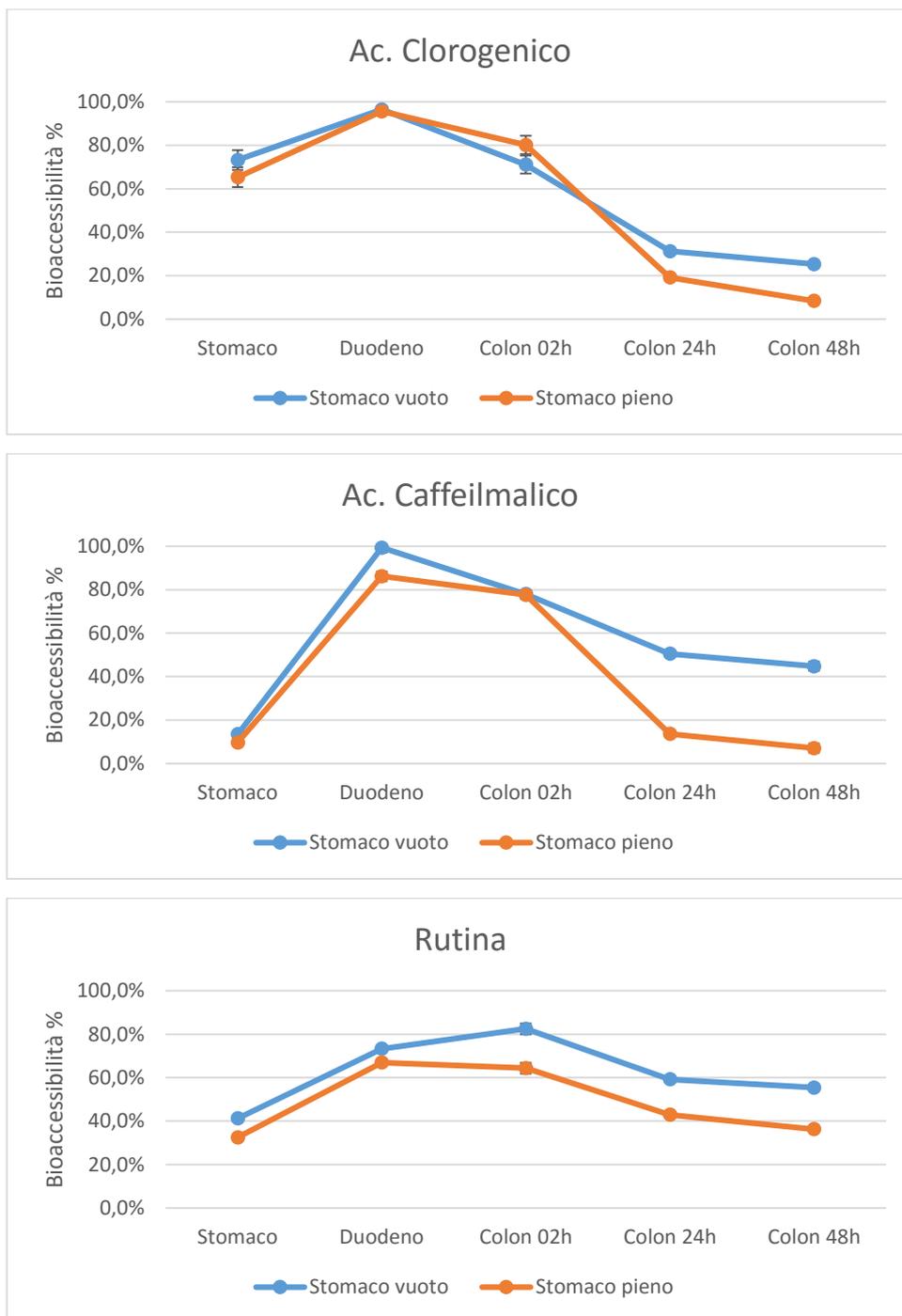


Grafico 4.14

Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione T-O (tisana all'ortica) assunta a stomaco pieno e stomaco vuoto.

La condizione di riempimento dello stomaco non influisce in maniera significativa sulla BAC delle molecole studiate nelle prime fasi della digestione (fase gastrica e fase duodenale). Al termine della fase duodenale la BAC dell'acido clorogenico è del 96,5% in caso di condizione stomaco vuoto e del 95,6% in caso di stomaco pieno. L'acido caffeilmalico assunto mediante

tisana all'ortica a stomaco vuoto risulta bioaccessibile al 99,4%, mentre a stomaco pieno cala all'86,2%. Anche la rutina presenta un lieve calo tra assunzione a stomaco pieno (73,3%) e stomaco vuoto (66,9%). Tutti i risultati sono riportati nei grafici 4.14.

Le differenze maggiori di BAC dovute alle condizioni di riempimento dello stomaco sono state individuate riguardo al metabolismo a livello del colon: in particolare al termine delle 48h di simulazione la condizione di stomaco pieno determina un calo della BAC dell'acido clorogenico dal 25,3% al 8,4%, della BAC dell'acido caffeilmalico dal 44,8% al 7,1% e della BAC della rutina dal 55,4% al 36,3%. In condizioni di stomaco pieno si ha quindi un maggior metabolismo a livello della flora batterica intestinale.

Lo studio sulla bioaccessibilità dei principali composti fenolici dell'ortica in diverse matrici alimentari, realizzato mediante l'utilizzo di un modello gastrointestinale dinamico *in vitro*, ha messo in evidenza come queste molecole risultino bioaccessibili durante tutte le fasi della digestione. Durante la digestione gastrica la bassa bioaccessibilità è spiegabile dalla non totale liberazione dalle matrici alimentari e dalla scarsa solubilità dei composti fenolici studiati nell'ambiente acido dello stomaco. Al termine della digestione duodenale si ha la maggior BAC di queste molecole, che in questo tratto possono andare incontro a processi di assorbimento da parte delle cellule epiteliali intestinali. Proseguendo nel tratto digerente i composti fenolici diventano substrato metabolico per la flora batterica: la BAC diminuisce in seguito al metabolismo colonico ed a questo livello i composti fenolici potrebbero avere un'importante funzione probiotica.

Il lavoro di ricerca sul destino dei composti fenolici dell'ortica assunti attraverso la dieta è continuato attraverso la valutazione dell'assorbimento a livello delle cellule epiteliali intestinali. Questo studio è stato condotto attraverso l'applicazione del modello cellulare *Caco-2*, largamente utilizzato per studi di trasporto e tossicità di farmaci, nutrienti e xenobiotici a livello intestinale. Le cellule *Caco-2*, originariamente isolate da adenocarcinoma del colon, se opportunamente sottoposte a coltura differenziano in un monostrato di cellule polarizzate, accoppiate da giunzioni, che esprimono molte caratteristiche morfologiche e funzionali dell'epitelio assorbente dell'intestino tenue <sup>[62,87]</sup>.

Lo studio del trasporto transepiteliale è stato eseguito sui fluidi duodenali simulati dei campioni di pasta P1-O, tisana T-O ed integratore CAP. Grazie a questo esperimento, descritto nella sezione 3.4.2, è stato possibile valutare l'assorbimento a livello dell'intestino tenue di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina.

Durante l'esperimento sono stati effettuati campionamenti del fluido basolaterale ogni ora fino ad un tempo totale di 4h in modo da valutare la cinetica dell'assorbimento transepiteliale. Al termine delle 4h è stato campionato il fluido apicale da cui è possibile valutare la quantità residua di ciascuna molecola al termine dell'esperimento. Ciascun fluido campionato è stato iniettato ed analizzato in HPLC secondo il metodo descritto nella sezione 3.4.3.

Il trasporto transepiteliale è valutato in termini percentuali sulla quantità disponibile per essere assorbita, cioè sulla quantità di ciascuna molecola quantificata nel fluido duodenale simulato utilizzato per l'esperimento con il modello *Caco-2*.

I risultati sono riportati in tabella 4.25.

		Pasta P1-O	Tisana T-O	Integratore CAP
<b>Ac. Clorogenico</b>				
<b>Lato Basale</b>	1h	0,97% ± 0,16%	1,53% ± 0,34%	0,04% ± 0,06%
	2h	1,78% ± 0,15%	2,44% ± 0,65%	0,59% ± 0,03%
	3h	2,11% ± 0,16%	3,05% ± 0,07%	0,71% ± 0,11%
	<b>4h</b>	<b>2,48% ± 0,50%</b>	<b>3,08% ± 0,33%</b>	<b>0,95% ± 0,16%</b>
Lato Apicale	4h	81,49% ± 1,76%	54,32% ± 0,98%	78,13% ± 8,43%
<b>Ac. Caffeilmalico</b>				
<b>Lato Basale</b>	1h	0,65% ± 0,43%	0,77% ± 0,32%	0,00% ± 0,00%
	2h	1,01% ± 0,18%	1,42% ± 0,89%	0,62% ± 0,55%
	3h	1,67% ± 0,00%	1,85% ± 0,63%	0,78% ± 0,37%
	<b>4h</b>	<b>2,17% ± 0,86%</b>	<b>2,81% ± 1,03%</b>	<b>1,26% ± 0,31%</b>
Lato Apicale	4h	88,64% ± 1,73%	87,24% ± 2,76%	94,36% ± 2,45%
<b>Rutina</b>				
<b>Lato Basale</b>	1h	0,91% ± 0,55%	1,29% ± 1,09%	nd
	2h	1,27% ± 0,39%	2,46% ± 1,68%	nd
	3h	1,87% ± 0,20%	3,59% ± 1,58%	nd
	<b>4h</b>	<b>2,47% ± 0,65%</b>	<b>3,98% ± 1,99%</b>	nd
Lato Apicale	4h	83,55% ± 1,90%	94,75% ± 7,37%	85,49% ± 2,53%

Tabella 4.25

Valutazione % del trasporto transepiteliale di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina. P1-O, pasta all'ortica. T-O, tisana all'ortica. CAP, integratore a base di ortica.

Media ± ds, N=6. nd: non determinabile.

Lo studio della cinetica di trasporto indica come la quantità di assorbita di ciascuna molecola in tutti i campioni studiati aumenta progressivamente durante il tempo dell'esperimento. Il

valore preso come riferimento per la valutazione del trasporto transepiteliale è quello al termine delle 4h (lato basale 4h).

I risultati ottenuti dimostrano come il trasporto transepiteliale sia generalmente basso per le molecole oggetto di studio: i valori maggiori sono stati individuati nei fluidi duodenali del campione di tisana, dove l'acido clorogenico ha un assorbimento medio del 3,08%, l'acido caffeilmalico del 2,81% e la rutina del 3,98%.

L'assorbimento dei tre polifenoli non mostra differenze statisticamente significative tra il campione P1-O ed il campione T-O. Per quanto riguarda l'esperienza sul fluido duodenale della digestione dell'integratore, l'assorbimento risulta minore rispetto alle altre matrici e la rutina non è stata identificata nel lato basale (tabella 4.25).

L'analisi dei fluidi apicali al termine dell'esperienza conferma che la maggior parte dei composti fenolici studiati sono scarsamente assorbiti a livello epiteliale intestinale: infatti la maggior parte della frazione disponibile rimane nel lato apicale e non sembra soggetta ad estensivo metabolismo a livello della superficie cellulare. Solo l'acido clorogenico nel fluido duodenale della tisana subisce degradazione a livello apicale e ne rimane una quantità pari al 54,32% del quantitativo iniziale.

La valutazione della bioaccessibilità duodenale accoppiata con la misura del trasporto transepiteliale permette di calcolare la biodisponibilità stimata, intesa come la quantità assorbita rispetto alla quantità inizialmente ingerita (tabella 4.26).

<b>Campione</b>	<b>Molecola</b>	<b>Biodisponibilità % stimata</b>		
<b>Pasta P1-O</b>	Ac. Clorogenico	1,58%	±	0,28%
	Ac. Caffeilmalico	2,02%	±	0,45%
	Rutina	1,30%	±	0,34%
<b>Tisana T-O</b>	Ac. Clorogenico	2,89%	±	0,31%
	Ac. Caffeilmalico	2,89%	±	1,06%
	Rutina	2,91%	±	1,45%
<b>Integratore CAP</b>	Ac. Clorogenico	0,55%	±	0,14%
	Ac. Caffeilmalico	0,92%	±	0,28%
	Rutina			nd

Tabella 4.26

Biodisponibilità % stimata di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina.

Media ± ds, N=6. nd: non determinabile.

I polifenoli ingeriti attraverso la tisana all'ortica risultano essere quelli maggiormente biodisponibili: in particolare acido clorogenico e rutina presentano differenze significative tra la tisana e gli altri campioni. La biodisponibilità di acido caffeilmalico tra pasta e tisana non è statisticamente differente.

Le differenze di biodisponibilità tra pasta e tisana sono da imputarsi principalmente alle differenze nei valori di bioaccessibilità, perché, come visto precedentemente, l'assorbimento transepiteliale non influisce in maniera significativa.

I risultati degli studi di bioaccessibilità e di trasporto transepiteliale confermano alcuni risultati precedentemente pubblicati in letteratura. Yang *et al.* [103] hanno dimostrato la scarsa permeabilità della rutina nel modello cellulare *Caco-2* e la diminuzione del trasporto transepiteliale dei flavonoidi all'aumentare del grado di glicosilazione. L'assorbimento della rutina sembra essere maggiore a livello dell'intestino crasso piuttosto che nel tenue e due metaboliti sono stati identificati a livello plasmatico: quercetina 3-O-glucoronide e isorhamnetina 3-O-glucoronide [104]. Inoltre, a livello intestinale l'azione della flora batterica provoca l'idrolisi della parte glucidica della rutina con liberazione dell'aglicone quercetina; la molecola di quercetina viene poi metabolizzata generando principalmente acido 3,4-diidrossifenilacetico e in minor parte acido 3-idrossifenilacetico [105].

Studi precedenti confermano che l'acido clorogenico è scarsamente assorbito nella sua forma nativa e può raggiungere il colon ed essere metabolizzato dalla flora batterica [106,107]. I principali metaboliti generati dalla microflora possono essere attivamente assorbiti a livello dell'intestino crasso [108]. Riguardo alla molecola di acido caffeilmalico, non sono presenti in letteratura scientifica lavori che ne valutino la bioaccessibilità ed il trasporto transepiteliale.

La simulazione dinamica *in vitro* della digestione di prodotti alimentari a base di ortica seguita dallo studio del trasporto transepiteliale, conferma che i principali composti fenolici dell'ortica sono scarsamente assorbiti nella loro forma nativa. Queste molecole non vengono sottoposte ad eccessiva degradazione durante le fasi digestive del tratto gastrointestinale superiore e raggiungono l'intestino dove diventano substrato metabolico per la flora batterica intestinale.

#### 4.4.2 Proprietà antiossidanti dei fluidi gastrointestinali simulati

La stabilità dei composti fenolici durante i processi digestivi li rende potenzialmente attivi a livello gastrointestinale: essendo molecole a proprietà antiossidanti possono contribuire al controllo dello stress ossidativo lungo tutto il tratto digerente. Questo effetto potenziale, assieme alle proprietà probiotiche dei composti fenolici, hanno fatto crescere gli studi sull'impatto di queste molecole direttamente a livello del tratto gastrointestinale [64].

La capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati è stata valutata utilizzando il metodo della fotochemiluminescenza. Grazie all'utilizzo dello strumento Photochem® è possibile valutare la proprietà scavenger di un liquido nei confronti del radicale anione superossido, una delle specie reattive dell'ossigeno più importanti a livello fisiologico.

Ciascun fluido digestivo simulato è stato sottoposto a misurazione della capacità antiossidante secondo la metodologia PCL-ACL (metodo descritto nella sezione 3.2.5) ed i risultati sono espressi in capacità antiossidante equivalente ad una soluzione  $\mu\text{M}$  di Trolox, per g di campione utilizzato nella digestione.

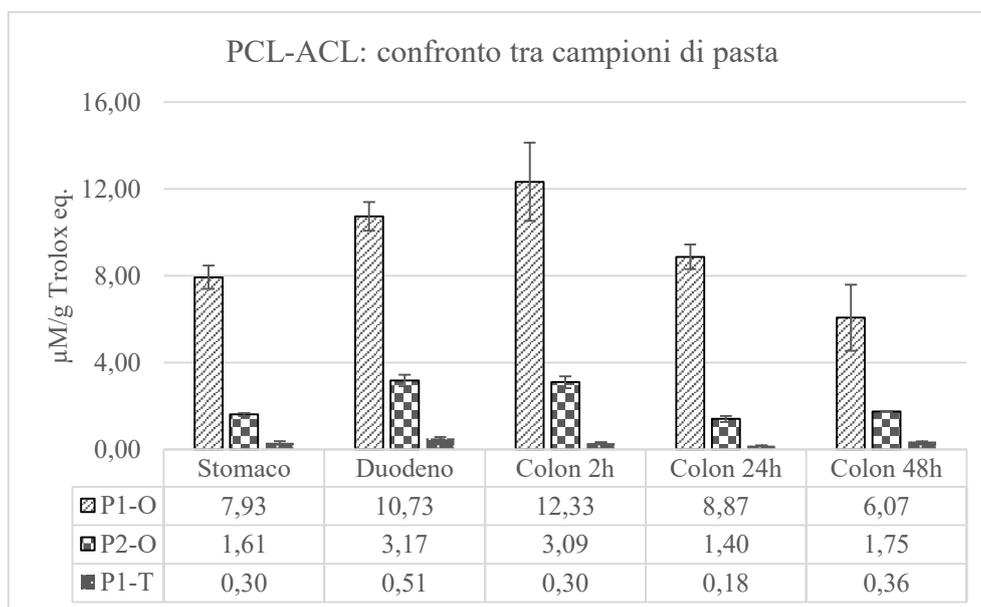


Grafico 4.15

Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati ottenuti dalla digestione di pasta all'ortica (P1-O e P2-O) e pasta all'uovo (P1-T).

Nel grafico 4.15 sono posti a confronto i risultati dell'analisi PCL-ACL sui digestati dei campioni di pasta. I fluidi ottenuti dalla digestione di pasta all'ortica presentano una capacità antiossidante nei confronti del radicale  $\text{O}_2^{\bullet-}$  maggiore rispetto alla pasta all'uovo non

fortificata. I composti fenolici presenti e bioaccessibili nei fluidi intestinali agiscono come agenti antiossidanti lungo tutto il tratto gastrointestinale.

A livello duodenale e nelle prime fasi del metabolismo colonico si ha l'effetto radical scavenger maggiore: in questi compartimenti infatti si ha la maggior bioaccessibilità delle molecole a natura fenolica. Tuttavia, anche dopo 24h e 48h di metabolismo intestinale si hanno ancora proprietà antiossidanti nonostante la diminuzione della bioaccessibilità, in particolare di acido clorogenico ed acido caffeilmalico (grafico 4.10): ciò indica che probabilmente anche i metaboliti che si formano per azione della flora batterica contribuiscono alle proprietà antiossidanti a livello del colon, ambiente soggetto ad un importante stress ossidativo post-prandiale.

Le differenze tra il campione P1-O ed il campione P2-O sono imputabili al quantitativo di composti fenolici ingeriti: il campione P1-O possiede infatti un quantitativo iniziale di polifenoli superiore al campione P2-O (tabella 4.16) e questo dato si riflette nelle proprietà antiossidanti a livello dei fluidi intestinali simulati.

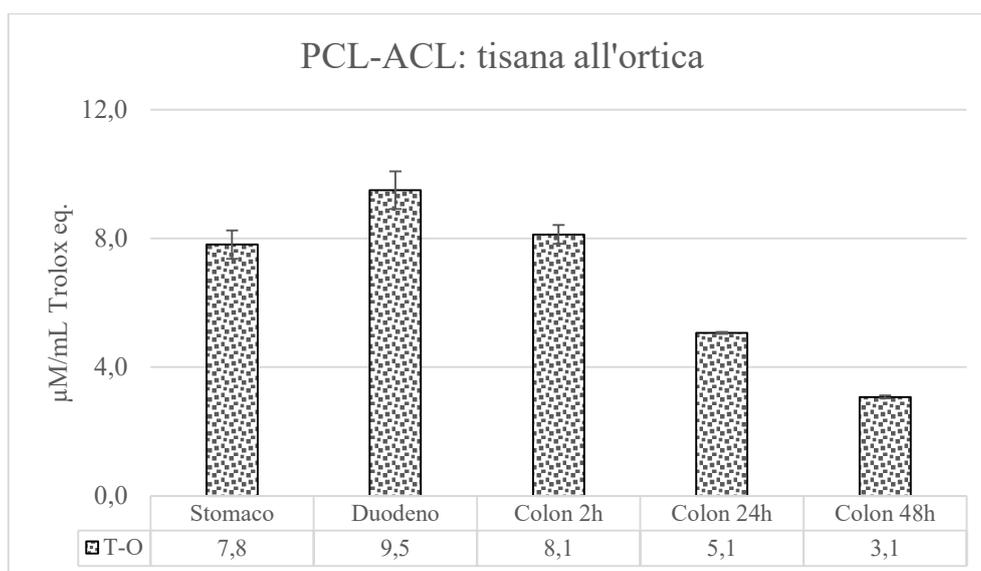


Grafico 4.16

Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati della digestione di tisana all'ortica (T-O).

Nei grafici 4.16 e 4.17 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi dei fluidi gastrointestinali in seguito a digestione di tisana all'ortica e dell'integratore nutraceutico. I risultati rispettano l'andamento ottenuto per i campioni di pasta: al termine della digestione duodenale si ha la maggior capacità antiossidante, dovuta alla maggior bioaccessibilità dei composti fenolici derivati dall'utilizzo dell'ortica.

I risultati confermano che l'assunzione di alimenti ricchi in polifenoli contribuisce a creare un ambiente antiossidante che può contrastare lo stress ossidativo post-prandiale lungo tutto il tratto gastrointestinale, con potenziali effetti benefici.

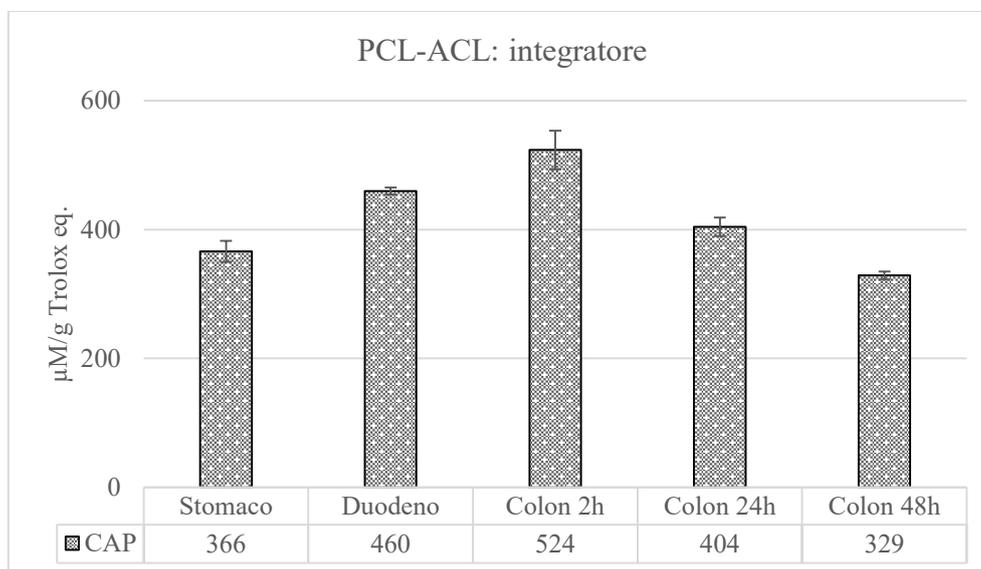


Grafico 4.17

Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati ottenuti dalla digestione di integratore a base di ortica disidratata (CAP).

Considerando il campione P1-O, l'assunzione di 80g di pasta fortificata con ortica genera un ambiente antiossidante del lume gastrointestinale comparabile al consumo di circa 140mL di tisana all'ortica oppure di 4 capsule di integratore a base di polvere essiccata di ortica. Questo risultato indica che la pasta arricchita funzionalmente con ortica disidratata in polvere può sostituire l'integratore nutraceutico in termine di assunzione di molecole funzionali, confermando la promettente applicazione dell'ortica nel settore alimentare.

Più in generale, alimenti ricchi in composti fenolici, tra cui le foglie di *U. dioica*, possono essere assunti direttamente oppure trasformati ed utilizzati come ingredienti funzionali per la produzione di alimenti processati con potenziali effetti benefici associati con questi importanti composti fitochimici.

La pasta può essere considerata un ottimo veicolo per il supplemento di importanti minerali, proteine ed altre classi di composti ad attività nutraceutica. Il processo di fortificazione della pasta utilizzando opportune matrici vegetali, tra cui l'ortica, porta alla funzionalizzazione di un prodotto largamente diffuso in molti regimi alimentari.

### 4.4.3 Bioaccessibilità dei carotenoidi

I carotenoidi assunti attraverso la dieta possiedono una bioaccessibilità generalmente bassa a causa della loro natura idrofobica che ne limita la solubilizzazione nei fluidi intestinali <sup>[109]</sup>. Nelle matrici alimentari i carotenoidi si trovano spesso associati alle proteine: i caroteni formano complessi con alcune proteine nei cromoplasti, mentre la luteina si localizza nei cloroplasti <sup>[56]</sup>. Alcuni processi di preparazione degli alimenti (es: cottura, pastorizzazione) ed i processi enzimatici che hanno luogo durante le fasi della digestione sono in grado di distruggere la parete delle cellule vegetali e liberare i carotenoidi favorendone il rilascio dalla matrice alimentare. Successivamente, a livello dell'intestino tenue, data la loro natura idrofobica tendono ad essere solubilizzati da parte dei sali biliari formando micelle potenzialmente assorbibili a livello dell'intestino tenue. Anche particelle lipidiche presenti nell'ambiente di digestione possono favorire la formazione delle micelle ed aiutare la solubilizzazione dei carotenoidi nell'ambiente intestinale <sup>[37]</sup>.

Le xantofille sembrano essere rilasciate più facilmente dalle matrici alimentari e più facilmente incorporabili in micelle rispetto ai caroteni. Tuttavia la fase di formazione delle micelle è fortemente influenzata dalla matrice alimentare e dall'interazione con altri componenti a livello del lume intestinale; questi fattori sembrano essere fondamentali per la bioaccessibilità e la biodisponibilità dei carotenoidi assunti attraverso la dieta <sup>[51]</sup>.

Diversi studi indicano che circa il 70% dei carotenoidi assunti non siano bioaccessibili <sup>[109]</sup>.

I carotenoidi presenti in maggior quantità nelle foglie di ortica (*U. dioica*) sono luteina e  $\beta$ -carotene. Queste molecole sono rintracciabili in prodotti alimentari elaborati come la pasta fortificata con polvere di ortica disidratata.

La bioaccessibilità di queste molecole è stata studiata nei seguenti campioni:

- Pasta 1 all'uovo (P1-T);
- Pasta 1 all'ortica (P1-O);
- Pasta 2 all'ortica (P2-O);
- Integratore a base di ortica (CAP).

L'analisi HPLC del contenuto in carotenoidi sulla tisana a base di ortica (T-O) ha evidenziato l'assenza di luteina e  $\beta$ -carotene: ciò indica che il processo di preparazione della tisana per infusione di foglie di ortica essiccata non permette la solubilizzazione di queste molecole.

In tabella 4.27 è riportata la quantificazione di luteina e  $\beta$ -carotene sulle foglie di ortica essiccate (materia prima per tisana), sulla tisana all'ortica e sulla polvere dell'integratore nutraceutico. La quantificazione nei campioni da pasta è stata precedentemente riportata in tabella 4.18.

	Luteina			β-Carotene		
<b>Ortica essiccata per Tisana</b> (μg/g)	110,68	±	3,21	6,22	±	0,12
<b>Tisana</b> (μg/mL)	nd			nd		
<b>Integratore</b> (μg/g)	76,18	±	2,88	6,71	±	1,91

Tabella 4.27

Quantificazione di luteina e β-carotene in prodotti alimentari a base di ortica (media ± ds, N=4).

I carotenoidi sono stati estratti dai fluidi gastrointestinali simulati campionati al termine di ciascuna fase della digestione ed analizzati in HPLC (sezione 3.4.3).

In figura 4.22 è riportato il cromatogramma dell'estratto nel fluido duodenale simulato della digestione del campione di pasta all'ortica P2-O. Sono ben riconoscibili e quantificabili i segnali di luteina e β-carotene.

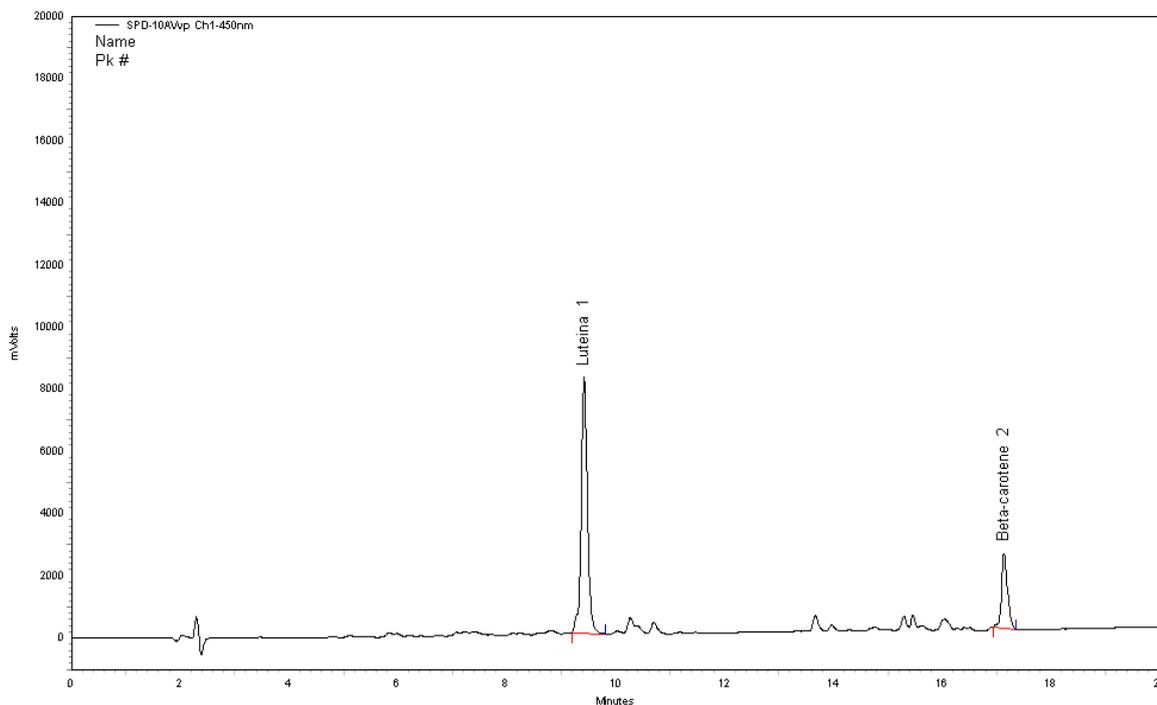


Figura 4.22

Cromatogramma dell'estratto del fluido duodenale simulato della digestione del campione di pasta all'ortica (P2-O) per la determinazione della bioaccessibilità di luteina e β-carotene.

In tabella 4.28 sono riportati i risultati della determinazione della bioaccessibilità di luteina e  $\beta$ -carotene durante le fasi della digestione di pasta all'uovo, pasta all'uovo fortificata con ortica (P1-O e P2-O) ed integratore.

I valori di bioaccessibilità misurati sono minori rispetto a quelli determinati per i composti fenolici: questo risultato è aspettato perché la natura idrofila dei carotenoidi ne limita la solubilizzazione nei fluidi gastrointestinali. Inoltre, a livello gastrico, luteina e  $\beta$ -carotene risultano totalmente non bioaccessibili. Questo può essere spiegato sia dal mancato rilascio dalla matrice alimentare sia dalla mancata formazione delle micelle, che comincia solo a livello del duodeno con la secrezione dei sali biliari.

Campione	Fase	Bioaccessibilità Luteina			Bioaccessibilità $\beta$ -carotene		
P1-T	Stomaco	nd			nd		
	Duodeno	25,1%	±	0,5%	9,9%	±	0,7%
	Colon 2h	40,0%	±	0,3%	10,3%	±	0,6%
	Colon 24h	40,4%	±	0,4%	8,8%	±	0,3%
	Colon 48h	37,7%	±	0,0%	4,1%	±	0,2%
P1-O	Stomaco	nd			nd		
	Duodeno	17,5%	±	2,2%	7,5%	±	1,6%
	Colon 2h	35,7%	±	1,1%	10,1%	±	0,5%
	Colon 24h	20,5%	±	3,8%	4,6%	±	3,6%
	Colon 48h	20,6%	±	4,3%	3,7%	±	2,5%
P2-O	Stomaco	nd			nd		
	Duodeno	15,0%	±	0,4%	4,7%	±	0,2%
	Colon 2h	21,8%	±	0,1%	4,2%	±	0,0%
	Colon 24h	13,5%	±	0,2%	2,7%	±	0,1%
	Colon 48h	17,4%	±	0,1%	2,3%	±	0,3%
CAP	Stomaco	nd			nd		
	Duodeno	35,0%	±	10,6%	2,0%	±	0,6%
	Colon 2h	40,2%	±	9,6%	2,9%	±	0,9%
	Colon 24h	46,6%	±	1,8%	10,1%	±	0,8%
	Colon 48h	41,9%	±	0,3%	5,7%	±	0,0%

Tabella 4.28

Bioaccessibilità % di luteina e  $\beta$ -carotene durante le diverse fasi della digestione. P1-T, pasta 1 all'uovo. P1-O, pasta 1 all'ortica. P2-O, pasta 2 all'ortica. CAP, integratore a base di ortica.

Media  $\pm$  ds, N=4. Nd: non determinabile.

Nel campione P1-T la luteina raggiunge un massimo di bioaccessibilità (circa il 40%) nelle prime 24h del metabolismo colonico ed al termine delle 48h vi è ancora una bioaccessibilità residua pari al 37,7%. Il  $\beta$ -carotene raggiunge il massimo della bioaccessibilità dopo 2h di fermentazione colonica, con un valore del 10,3%.

Nei campioni di pasta all'ortica P1-O e P2-O la bioaccessibilità di questi carotenoidi presenta valori minori rispetto al campione di pasta all'uovo. Nel campione P1-O la luteina ed il  $\beta$ -carotene sono maggiormente bioaccessibili nella fase colon 2h con valori rispettivamente di 35,7% e 10,1%. Nel campione P2-O i valori massimi di bioaccessibilità sono più bassi: per la luteina il 21,8% nella fase colon 2h e per il  $\beta$ -carotene il 4,7% nella fase duodenale.

I valori mediamente minori della bioaccessibilità dei carotenoidi nella pasta fortificata con ortica rispetto alla pasta all'uovo possono essere dovuti alla presenza nell'ambiente digestivo di maggiori quantitativi di fibra. Le catene polisaccaridiche della fibra alimentare possono interferire intrappolando i sali biliari ed i grassi, limitando perciò la formazione delle micelle necessarie per la solubilizzazione<sup>[37]</sup>. Inoltre, la presenza della fibra rallenta i processi digestivi ed i carotenoidi stessi nelle matrici ricche in fibra possono trovarsi maggiormente intrappolati nella struttura chimica della matrice alimentare e di conseguenza il loro rilascio potrebbe essere ostacolato<sup>[37]</sup>.

Nella calcolo della bioaccessibilità per la digestione dell'integratore, effettuata simulando una condizione di stomaco pieno utilizzando la pasta P1-T, si è dovuto tener conto dell'apporto di luteina e  $\beta$ -carotene dovuto alla pasta stessa. Il valore massimo di bioaccessibilità è raggiunto dopo 24h di metabolismo colonico (luteina 46,6% e  $\beta$ -carotene 10,1%).

In conclusione, la bioaccessibilità dei carotenoidi presenta valori medi minori rispetto alla bioaccessibilità dei composti fenolici. Nella pasta fortificata con ortica si ha un aumento del contenuto di carotenoidi, tuttavia la frazione fibrosa dovuta alla presenza di ortica ne può diminuire la bioaccessibilità.

## 5. CONCLUSIONI

L'ortica (genere *Urtica* L.) è una pianta selvatica molto diffusa in tutte le regioni temperate di cui la specie perenne *U. dioica* risulta quella maggiormente diffusa. È una pianta spontanea che si rinviene con facilità in tutti quei terreni particolarmente ricchi di azoto, come possono esserlo quelli in prossimità delle abitazioni o al limitare di macerie e fossati <sup>[1]</sup>.

L'utilizzo alimentare delle foglie di ortica affonda le radici nel passato, in particolare riguardo al suo utilizzo come pianta alimurgica. Attualmente l'ortica è al centro di una rivalutazione nel settore industriale alimentare, dove il settore degli alimenti funzionali rappresenta un mercato in rapidissima evoluzione. Sono definiti funzionali gli alimenti comunemente presenti nella dieta che contengono componenti biologicamente attivi in grado di migliorare lo stato di salute o ridurre il rischio di malattia <sup>[68]</sup>.

Lo scopo del progetto di ricerca è di valutare l'utilizzo di ortica, in particolare della varietà *U. dioica*, come nuovo alimento funzionale e come ingrediente per la preparazione di nuovi alimenti funzionali, con particolare attenzione alla produzione di pasta alimentare speciale.

La caratterizzazione bromatologica di foglie di ortica selvatica ha permesso di creare un'etichetta nutrizionale e di mettere in evidenza il buon contenuto proteico e di alcuni elementi essenziali per diverse funzioni fisiologiche: calcio, magnesio, ferro e manganese. Lo studio delle proprietà antiossidanti ha evidenziato come queste siano variabili in base alla zona geografica di provenienza, indicando un'influenza significativa dello stadio vegetativo su biosintesi ed accumulo di composti fenolici da parte della pianta.

Il lavoro è proseguito con la caratterizzazione specifica delle due classi di metaboliti secondari a proprietà nutraceutiche delle foglie di *U. dioica*: i composti fenolici ed i carotenoidi. Presso il Centro di Ricerca per le Colture Industriali (CRA-CIN) di Rovigo è stato creato un campo sperimentale per lo studio agronomico delle condizioni di coltivazione e crescita di *U. dioica* ed *U. urens*. La valutazione agronomica delle due varietà ha messo in evidenza che *U. dioica* possiede le migliori caratteristiche per essere proposta a livello di coltivazione al fine dello sfruttamento delle parti aeree. Sulla specie *dioica* sono stati caratterizzati i principali composti fenolici ed i carotenoidi, successivamente quantificati durante le fasi di sviluppo vegetativo con l'obiettivo di studiarne il tempo balsamico.

I composti fenolici identificati nelle foglie di *U. dioica* appartengono ai sottogruppi degli acidi idrossicinnamici (acido clorogenico ed acido caffeilmalico) e dei flavonoli (rutina,

isoquercetina, kaempferolo 3-rutinoside, kaempferolo 3-glucoside e isorhamnetina 3-rutinoside). Per quanto riguarda i carotenoidi sono stati identificati luteina e  $\beta$ -carotene.

Il tempo balsamico del contenuto di polifenoli e carotenoidi si colloca durante la fase di fioritura. Questa fase risulta il momento migliore per la raccolta delle foglie destinate ad un utilizzo alimentare. Inoltre, nel periodo di crescita vegetativa la pianta presenta la maggior quantità di foglie, che tendono ad essere perse durante la fase di quiescenza.

La seconda parte del progetto di ricerca riguarda lo studio dell'ortica come ingrediente per pasta alimentare speciale con la finalità di valutare l'apporto di nutrienti primari, polifenoli e carotenoidi dalla materia prima al prodotto elaborato. I risultati ottenuti mettono chiaramente in evidenza come l'utilizzo di ortica determini un aumento del quantitativo proteico totale e della frazione minerale totale. Nel contenuto specifico in minerali, si ha un aumento significativo nel contenuto di calcio, magnesio, ferro e manganese. Inoltre, nei prodotti fortificati si ha un aumento del contenuto polifenolico totale che si riflette in un aumento significativo del potere antiossidante. Questi risultati indicano che la fortificazione di un prodotto tradizionale come la pasta, utilizzando polvere di ortica disidratata, rappresenta un trattamento tecnologico per la produzione di un alimento funzionalizzato in particolare riguardo al contenuto in minerali ed in molecole a proprietà antiossidanti.

Lo studio specifico sui composti fenolici e sui carotenoidi in pasta all'ortica, posta a confronto con pasta all'uovo, indica che i composti fenolici caratteristici e predominanti nelle foglie, cioè acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina sono efficacemente trasferiti dalla materia prima al prodotto finale dal quale sono rintracciabili e quantificabili; queste molecole non sono presenti nella pasta non fortificata, quindi rappresentano costituenti unici della pasta all'ortica. I composti fenolici sono soggetti a perdita durante la fase cottura in maniera dipendente dal grado di *bound* caratteristico di ciascuna molecola.

Luteina e  $\beta$ -carotene sono carotenoidi presenti nelle foglie di ortica, tuttavia sono rintracciabili anche nella semola, costituente principale della pasta, e nell'uovo, ingrediente per la produzione di pasta secca e fresca a livello industriale. La fortificazione determina un aumento del contenuto sia di luteina sia di  $\beta$ -carotene nel prodotto finito. Tuttavia nella pasta all'ortica la perdita di queste molecole in seguito al processo di cottura è maggiore rispetto ai campioni di pasta all'uovo.

Lo studio sulla bioaccessibilità dei principali composti fenolici dell'ortica in diverse matrici alimentari, realizzato mediante l'utilizzo di un modello gastrointestinale dinamico *in vitro*, ha messo in evidenza come queste molecole risultino bioaccessibili durante tutte le fasi della digestione e diventino substrato metabolico per la flora batterica intestinale. L'apporto di

composti fenolici bioaccessibili dovuto al consumo di prodotti alimentari a base di ortica aumenta il potere antiossidante a livello di tutto il tratto gastrointestinale: questo effetto, assieme allo studio delle potenzialità probiotiche dei composti fenolici, può portare ad effetti benefici che necessitano di ulteriori approfondimenti. Inoltre appare di grande interesse approfondire lo studio sui prodotti del metabolismo dei polifenoli e sulle loro potenziali attività a livello biologico.

Lo studio del trasporto transepiteliale condotto sui fluidi duodenali simulati utilizzando il modello cellulare *Caco-2*, conferma che acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina sono scarsamente assorbiti nella loro forma nativa a livello dell'epitelio intestinale.

La bioaccessibilità dei carotenoidi presenta valori medi minori rispetto alla bioaccessibilità dei composti fenolici a causa della minor solubilità nei fluidi gastrointestinali. Nella pasta fortificata con ortica si ha un aumento del contenuto di carotenoidi, tuttavia la frazione fibrosa dovuta alla presenza di ortica ne può diminuire la bioaccessibilità.

I risultati ottenuti confermano il potenziale nutrizionale delle foglie di ortica, sia come alimento sia come ingrediente per prodotti elaborati. Prodotti tipici della dieta mediterranea come la pasta, attraverso l'integrazione di ortica, potrebbero contribuire ad arricchire l'alimentazione con sali minerali indispensabili all'organismo e con molecole a potenziali effetti benefici quali composti fenolici e carotenoidi.

L'ortica (*U. dioica*) è una pianta spontanea che può essere introdotta a livello di coltivazione a basso impatto ambientale con potenzialità di utilizzo multisettoriali. Riguardo al settore industriale alimentare le foglie posseggono un importante valore nutrizionale che può essere sfruttato nell'ottica dello sviluppo e della diffusione di alimenti con caratteristiche funzionali e salutistiche.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Kavalali M., *Urtica: therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles*. Taylor & Francis Ltd, 2003.
- [2] Pignatti Sandro, *Flora d'Italia*. 1982.
- [3] L. Bacci, S. Baronti, N. di Virgilio, and S. Predieri, *Manuale di coltivazione e prima lavorazione dell'ortica per uso tessile*. Pubblicazione legata alla Collana: Ricerca Trasferimento e Innovazione della Regione Toscana, 2007.
- [4] Ciani Scarnicci M., Laino A., P. Pinelli, A. Romani, and P. Vignolini, *Estratti naturali da piante medicinali e tessili-tintorie*. ARACNE Editrice, 2013.
- [5] R. Upton, "Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine," *J. Herb. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 9–38, 2013.
- [6] E. Bombardelli and P. Morazzoni, "*Urtica dioica* L.," *Fitoterapia*, vol. 68, no. 5, pp. 387–402.
- [7] S. Chrubasik, W. Enderlein, R. Bauer, and W. Grabner, "Evidence for antirheumatic effectiveness of Herba *Urticae dioicae* in acute arthritis: A pilot study.," *Phytomedicine*, vol. 4, no. 2, pp. 105–8, 1997.
- [8] G. Kavalali and H. Tuncel, "Anti-inflammatory activities of *Urtica pilulifera*," *Int. J. Pharmacogn.*, vol. 35, no. 2, pp. 138–140, 1997.
- [9] E. Pagano, M. Laudato, M. Griffo, and R. Capasso, "Phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. A minireview.," *Phytother. Res.*, vol. 28, no. 7, pp. 949–55, 2014.
- [10] R. Hosseinabadi, M. Heidari, K. Anbari, and Y. Pournia, "*Urtica dioica* for treatment of lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia," *Int. J. Urol. Nurs.*, vol. 8, no. 3, pp. 114–121, 2014.
- [11] S. Bisht, S. Bhandari, and N. Bisht, "*Urtica dioica* (L): an undervalued, economically important plant," *Agric. Sci. Res. ...*, vol. 2, no. May, pp. 250–252, 2012.
- [12] S. Sansanelli and A. Tassoni, "Wild food plants traditionally consumed in the area of Bologna (Emilia Romagna region, Italy).," *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, vol. 10, p. 69, 2014.
- [13] N. Di Virgilio, E. G. Papazoglou, Z. Jankauskiene, S. Di Lonardo, M. Praczyk, and K. Wielgusz, "The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses," *Ind. Crops Prod.*, vol. 68, pp. 42–49, 2015.
- [14] M. Lamberto, "*Urtica dioica* L., *Urtica urens* L. e loro ibridi.," *Natural 1*, pp. 62–63, 2007.

- [15] P. Mittman, "Randomized, Double-Blind Study of Freeze-Dried *Urtica dioica* in the Treatment of Allergic Rhinitis," *Planta Med.*, vol. 56, no. 01, pp. 44–47, 1990.
- [16] B. Roschek, R. C. Fink, M. McMichael, and R. S. Alberte, "Nettle extract (*Urtica dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis.," *Phytother. Res.*, vol. 23, no. 7, pp. 920–6, 2009.
- [17] A. Tahri, S. Yamani, A. Legssyer, M. Aziz, H. Mekhfi, M. Bnouham, and A. Ziyat, "Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 73, no. 1–2, pp. 95–100, Nov. 2000.
- [18] AA. VV., "*Urtica dioica*; *Urtica urens* (nettle). Monograph.," *Altern. Med. Rev.*, vol. 12, no. 3, pp. 280–284, Sep. 2007.
- [19] I. Gülçin, Ö. I. Küfrevioğlu, M. Oktay, and M. E. Büyükokuroğlu, "Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 90, no. 2–3, pp. 205–215, 2004.
- [20] A. Mavi, Z. Terzi, U. Ozgen, A. Yildirim, and M. Coşkun, "Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae).," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 27, no. 5, pp. 702–5, 2004.
- [21] G. Avcı, E. Kupeli, A. Eryavuz, E. Yesilada, and I. Kucukkurt, "Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 107, no. 3, pp. 418–423, 2006.
- [22] B. Farzami, D. Ahmadvand, S. Vardasbi, F. . Majin, and S. Khaghani, "Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 89, no. 1, pp. 47–53, 2003.
- [23] T. Schneider and H. Rubben, "Stinging nettle root extract (Bazoton-uno) in long term treatment of benign prostatic syndrome (BPS). Results of a randomized, double-blind, placebo controlled multicenter study after 12 months.," *Urologe. A*, vol. 43, no. 3, pp. 302–306, Mar. 2004.
- [24] J. Sokeland, "Combined sabal and urtica extract compared with finasteride in men with benign prostatic hyperplasia: analysis of prostate volume and therapeutic outcome.," *BJU Int.*, vol. 86, no. 4, pp. 439–442, Sep. 2000.

- [25] F. Capasso, G. Grandolini, and A. A. Izzo, *Fitoterapia: Impiego razionale delle droghe vegetali*. Springer Milan, 2006.
- [26] L. K. Rutto, Y. Xu, E. Ramirez, and M. Brandt, “Mineral Properties and Dietary Value of Raw and Processed Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.),” *Int. J. Food Sci.*, vol. 2013, pp. 1–9, 2013.
- [27] R. E. Hughes, P. Ellery, T. Harry, V. Jenkins, and E. Jones, “The dietary potential of the common nettle,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 31, no. 12, pp. 1279–1286, Dec. 1980.
- [28] H. Wetherilt, “Evaluation of *Urtica* species as potential sources of important nutrients,” *Dev. food Sci.*, vol. 29, p. 15–25, 1992.
- [29] P. Pinelli, F. Ieri, P. Vignolini, L. Bacci, S. Baronti, and A. Romani, “Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 19, pp. 9127–9132, 2008.
- [30] F. Bucar, B. Britzmann, B. Streit, and M. Weigend, “LC-PDA-MS-profiles of phenolic compounds in extracts of aerial parts of *Urtica* species,” *Planta Med*, vol. 72, no. 11, p. P\_152, 2006.
- [31] M. A. Abdel-Wahhab, A. Said, and A. Huefner, “NMR and Radical Scavenging Activities of Patuletin from *Urtica urens* against Aflatoxin B1,” *Pharm. Biol.*, vol. 43, no. 6, pp. 515–525, 2005.
- [32] Z. Weglarz and W. Roslon, “Developmental and chemical variability of female and male forms of nettle *Urtica dioica* L.,” in *Acta Horticulturae*, 2000, no. 523, pp. 75–80.
- [33] J. L. Guil-Guerrero, M. M. Reboloso-Fuentes, and M. E. Torija Isasa, “Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.),” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 16, no. 2, pp. 111–119, 2003.
- [34] P. M. Harmer and G. D. Snerman, “Ascorbic Acid ( Vitamin C ) in Foliage of Plants 1,” vol. 28, no. 682, pp. 346–349, 2013.
- [35] K. M. Kleitz, M. M. Wall, C. L. Falk, C. A. Martin, M. D. Remmenga, and S. J. Guldan, “Stand establishment and yield potential of organically grown seeded and transplanted medicinal herbs,” *Horttechnology*, vol. 18, no. 1, pp. 116–121, 2008.
- [36] L. Bacci, S. Baronti, S. Predieri, and N. di Virgilio, “Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 29, no. 2–3, pp. 480–484, 2009.
- [37] H. Palafox-Carlos, J. F. Ayala-Zavala, and G. A. González-Aguilar, “The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants,” *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 1, pp. 6–15, 2011.

- [38] G. Arienti, *Le basi molecolari della nutrizione*. Piccin, 2003.
- [39] R. E. Wildman and M. Kelley, “Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Second Edition,” in *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, 2006, pp. 1–20.
- [40] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, “Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.
- [41] I. C. W. Arts and P. C. H. Hollman, “Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1 Suppl, p. 317S–325S, 2005.
- [42] F. Shahidi and M. Naczki, *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press LLC, 2006.
- [43] Y. Yoshiki, T. Kahara, K. Okubo, K. Igarashi, and K. Yotsuhashi, “Mechanism of catechin chemiluminescence in the presence of active oxygen,” *J. Biolumin. Chemilumin.*, vol. 11, no. 3, pp. 131–136, 1996.
- [44] S. Duthie, A. Collins, G. Duthie, and V. Dobson, “Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes,” *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 393, no. 3, pp. 223–231, Oct. 1997.
- [45] D. A. Parks and D. N. Granger, “Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology,” *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, vol. 548, pp. 87–99, 1986.
- [46] H. M. Hassan, “Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 5, no. 5–6, pp. 377–385, 1988.
- [47] M. N. Clifford, “Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism,” *J Sci food Agric*, vol. 80, no. October 1999, pp. 1033–1043, 2000.
- [48] S. Lu and L. Li, “Carotenoid Metabolism: Biosynthesis, Regulation, and Beyond,” *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 50, no. 7, pp. 778–785, 2008.
- [49] G. Giuliano, R. Aquilani, and S. Dharmapuri, “Metabolic engineering of plant carotenoids,” *Trends Plant Sci.*, vol. 5, no. 10, pp. 406–409, Oct. 2000.
- [50] A. Nagao, “Absorption and function of dietary carotenoids,” *Forum Nutr.*, vol. 61, pp. 55–63, 2009.
- [51] L. Yonekura and A. Nagao, “Intestinal absorption of dietary carotenoids,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 107–115, 2007.
- [52] K. Verhoeckx, P. Cotter, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, and T. Requena, *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and Ex vivo Models*. 2015.
- [53] H. J. Flint, “The impact of nutrition on the human microbiome,” *Nutr. Rev.*, vol. 70, pp. S10–S13, 2012.

- [54] D. J. McClements, F. Li, and H. Xiao, “The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme: Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability,” *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 1, pp. 299–327, 2015.
- [55] A. Guerra, L. Etienne-Mesmin, V. Livrelli, S. Denis, S. Blanquet-Diot, and M. Alric, “Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 11, pp. 591–600, Nov. 2012.
- [56] P. Etcheverry, M. A. Grusak, and L. E. Fleige, “Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E,” *Front. Physiol.*, vol. 3, no. August, pp. 1–22, 2012.
- [57] E. Hedrén, G. Mulokozi, and U. Svanberg, “In vitro accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 53, no. 6, pp. 445–453, 2002.
- [58] J. M. Carbonell-Capella, M. Buniowska, F. J. Barba, M. J. Esteve, and A. Frígola, “Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 13, no. 2, pp. 155–171, 2014.
- [59] E. Fernandez-Garcia, I. Carvajal-Lerida, and A. Perez-Galvez, “In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency,” *Nutr. Res.*, vol. 29, no. 11, pp. 751–760, Nov. 2009.
- [60] A.-S. Sandberg, “Methods and options in vitro dialyzability; benefits and limitations,” *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, vol. 75, no. 6, pp. 395–404, Nov. 2005.
- [61] M. Wickham, R. Faulks, and C. Mills, “In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 53, no. 8, pp. 952–958, Aug. 2009.
- [62] P. Artursson, “Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa,” *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 8, no. 4, pp. 305–330, 1991.
- [63] G. R. Velderrain-Rodríguez, H. Palafox-Carlos, a Wall-Medrano, J. F. Ayala-Zavala, C.-Y. O. Chen, M. Robles-Sánchez, H. Astiazaran-García, E. Alvarez-Parrilla, and G. a González-Aguilar, “Phenolic compounds: their journey after intake,” *Food Funct.*, vol. 5, no. 2, pp. 189–197, 2014.
- [64] H. Sies, “Polyphenols and health: Update and perspectives,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 501, no. 1, pp. 2–5, 2010.
- [65] M. B. Katan and N. M. De Roos, “Promises and problems of functional foods,” *Crit.*

- Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 5, pp. 369–377, 2004.
- [66] Diplock A.T., “Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document,” *Br. J. Nutr.*, vol. 81 Suppl 1, pp. S1–27, 1999.
- [67] M. Ashwell, “Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims,” *Public health nutrition*, vol. 4, no. 3. England, pp. 859–862, Jun-2001.
- [68] P. Polito, S. Procacci, A. Brunori, F. Vitali, L. I. Agro-industriale, and C. R. Casaccia, “Alimenti Funzionali: Quadro Normativo , Opportunità Per L ’ Industria Agroalimentare E Per La Ricerca Alimenti Funzionali : Quadro Normativo , Opportunità Per L ’ Industria Agroalimentare,” 2013.
- [69] M. C. Zuin, “Piante alimurgiche del Veneto.”
- [70] M. Boroski, A. C. de Aguiar, J. S. Boeing, E. M. Rotta, C. L. Wibby, E. G. Bonafé, N. E. de Souza, and J. V. Visentainer, “Enhancement of pasta antioxidant activity with oregano and carrot leaf,” *Food Chem.*, vol. 125, no. 2, pp. 696–700, 2011.
- [71] R. Borneo and a. Aguirre, “Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 10, pp. 1748–1751, 2008.
- [72] Ł. Sęczyk, M. Świeca, U. Gawlik-Dziki, M. Luty, and J. Czyż, “Effect of fortification with parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) leaves on the nutraceutical and nutritional quality of wheat pasta,” *Food Chem.*, vol. 190, pp. 419–428, 2015.
- [73] D. Del Rio, L. G. Costa, M. E. J. Lean, and A. Crozier, “Polyphenols and health: What compounds are involved?,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–6, 2010.
- [74] G. Williamson and C. Manach, “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies,” *Am J Clin Nutr*, vol. 81, p. 243S–255S, 2005.
- [75] Cabras Paolo and Tuberoso Carlo, *Analisi dei Prodotti Alimentari*. Piccin, 2014.
- [76] C. D. Stalikas, “Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids,” *J Sep Sci*, vol. 30, no. 18, pp. 3268–3295, 2007.
- [77] B. A. Acosta-Estrada, J. A. Gutiérrez-Urbe, and S. O. Serna-Saldívar, “Bound phenolics in foods, a review,” *Food Chem.*, vol. 152, pp. 46–55, 2014.
- [78] J. Pérez-Jiménez and F. Saura-Calixto, “Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 12, pp. 5036–5040, 2005.
- [79] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, *Oxidants and Antioxidants Part A*, vol. 299. Elsevier, 1999.

- [80] V. Gökmen, A. Serpen, and V. Fogliano, "Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 6–7, pp. 278–288, Jul. 2009.
- [81] R. B. Pegg, R. Amarowicz, M. Naczki, and F. Shahidi, "PHOTOCHEM® for determination of antioxidant capacity of plant extracts," in *ACS Symposium Series*, 2007, vol. 956, pp. 140–158.
- [82] P. Tedeschi, G. Bonetti, A. Maietti, and V. Brandolini, "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint and antioxidants profile as markers for Tropea red onion (*Allium cepa* L.) authenticity," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 36, no. 1–2, pp. 98–103, 2014.
- [83] I. Popov and G. Lewin, "Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VI. Antioxidant characteristics of human blood plasma, low density lipoprotein, serum albumin and amino acids during in vitro oxidation.," *Luminescence*, vol. 14, no. 3, pp. 169–74, 1999.
- [84] K. T. Amorim-Carrilho, A. Cepeda, C. Fente, and P. Regal, "Review of methods for analysis of carotenoids," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 56, pp. 49–73, 2014.
- [85] G. Panfili, A. Fratianni, and M. Irano, "Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 21, pp. 6373–7, 2004.
- [86] M. Ferrer, L. Manyes, J. Mañes, and G. Meca, "Influence of prebiotics, probiotics and protein ingredients on mycotoxin bioaccessibility.," *Food Funct.*, vol. 6, no. 3, pp. 987–94, 2015.
- [87] Y. Sambuy, I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, a. Stamatii, and F. Zucco, "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics," *Cell Biol. Toxicol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–26, 2005.
- [88] S. Sansanelli and A. Tassoni, "Wild food plants traditionally consumed in the area of Bologna ( Emilia Romagna region , Italy )," *J. Agric. Chem.*, vol. 10, no. 59, pp. 1–11, 2014.
- [89] J. Hudec, M. Burdová, L. Kobida, L. Komora, V. Macho, G. Kogan, I. Turianica, R. Kochanová, O. Ložek, M. Habán, and P. Chlebo, "Antioxidant capacity changes and phenolic profile of *Echinacea purpurea*, nettle (*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 14, pp. 5689–5696, 2007.

- [90] M. Akgul, "Suitability of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) stalks for medium density fiberboards production," *Compos. Part B Eng.*, vol. 45, no. 1, pp. 925–929, 2013.
- [91] M. a. Farag, M. Weigend, F. Luebert, G. Brokamp, and L. a. Wessjohann, "Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC-Q-TOF-MS metabolomic profiles," *Phytochemistry*, vol. 96, no. July 2015, pp. 170–183, 2013.
- [92] K. Grevsen, X. C. Fretté, and L. P. Christensen, "Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time," *Eur. J. Hortic. Sci.*, vol. 73, no. 1, pp. 20–27, 2008.
- [93] S. Boegge, S. Kesper, E. Verspohl, and A. Nahrstedt, "Reduction of ACh-Induced Contraction of Rat Isolated Ileum by Coptisine, (+)-Caffeoylmalic Acid, *Chelidonium majus*, and *Corydalis lutea* Extracts 1," *Planta Med.*, vol. 62, no. 02, pp. 173–174, Apr. 1996.
- [94] A. Ribas-Agustí, M. Gratacós-Cubarsí, C. Sárraga, J.-A. García-Regueiro, and M. Castellari, "Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection.," *Phytochem. Anal.*, vol. 22, no. 6, pp. 555–63, 2011.
- [95] T. Takahashi, A. Okiura, K. Saito, and M. Kohno, "Identification of Phenylpropanoids in Fig (*Ficus carica* L.) Leaves," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 41, pp. 10076–10083, 2014.
- [96] H. Hosseinzadeh and M. Nassiri-Asl, "Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid," *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 37, no. 9, pp. 783–788, 2014.
- [97] L. Y. Chen, C. W. Cheng, and J. Y. Liang, "Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols," *Food Chem.*, vol. 170, pp. 10–15, 2015.
- [98] R. . Huang, D., Ou, B., Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, pp. 1841–1856, 2005.
- [99] Cabras Paolo and Martelli Aldo, *Chimica degli Alimenti*. Padova, 2004.
- [100] A. Serpen, V. Gökmen, N. Pellegrini, and V. Fogliano, "Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products," *J. Cereal Sci.*, vol. 48, no. 3, pp. 816–820, 2008.
- [101] A. Serpen, E. Capuano, V. Fogliano, and V. Gökmen, "A new procedure to measure the

- antioxidant activity of insoluble food components,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 19, pp. 7676–7681, 2007.
- [102] F. Saura-Calixto, J. Serrano, and I. Goni, “Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet,” *Food Chem.*, vol. 101, no. 2, pp. 492–501, 2007.
- [103] Y. Yang, L. Bai, X. Li, J. Xiong, P. Xu, C. Guo, and M. Xue, “Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood–brain barrier cell and Caco-2 cell models,” *Toxicol. Vitro.*, vol. 28, no. 3, pp. 388–396, 2014.
- [104] I. B. Jaganath, I. B. Jaganath, W. Mullen, C. A. Edwards, and A. Crozier, “The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man,” *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 10, pp. 1035–1046, Jan. 2006.
- [105] A. Crozier, D. Del Rio, and M. N. Clifford, “Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 31, no. 6, pp. 446–467, 2010.
- [106] C. Dupas, A. M. Baglieri, C. Ordonaud, D. Tomè, and M. N. Maillard, “Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 50, no. 11, pp. 1053–1060, 2006.
- [107] H. J. Lee, K. H. Cha, C. Y. Kim, C. W. Nho, and C. H. Pan, “Bioavailability of hydroxycinnamic acids from *Crepidiastrum denticulatum* using simulated digestion and caco-2 intestinal cells,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, pp. 5290–5295, 2014.
- [108] Y. Konishi and S. Kobayashi, “Transepithelial Transport of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Their Colonic Metabolites in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, pp. 2518–2526, 2004.
- [109] G. Maiani, M. J. P. Castón, G. Catasta, E. Toti, I. G. Cambrodón, A. Bysted, F. Granado-Lorencio, B. Olmedilla-Alonso, P. Knuthsen, M. Valoti, V. Böhm, E. Mayer-Miebach, D. Behnlian, and U. Schlemmer, “Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 53 Suppl 2, pp. S194–218, 2009.

# INDICE DELLE FIGURE

**Figura 1.1:** *Urtica dioica*.

**Figura 1.2:** Schema ipotizzato per il meccanismo d'azione dell'estratto di radice di ortica nel trattamento dell'ipertrofia prostatica benigna.

**Figura 1.3:** *Flow-chart* del trattamento delle foglie e dei possibili settori industriali di utilizzo.

**Figura 1.4:** *Flow-chart* del trattamento degli steli e dei possibili settori industriali di utilizzo

**Figura 1.5:** Biosintesi di Acido *p*-Cumarico.

**Figura 1.6:** Strutture di Acido Caffeico ed Acido Ferulico.

**Figura 1.7:** Biosintesi dei flavanoni.

**Figura 1.8:** Biosintesi dei flavonoli.

**Figura 1.9:** Strutture base dei derivati di flavanoni e isoflavanoni.

**Figura 1.10:** Struttura base delle antocianidine.

**Figura 1.11:** Struttura della Catechina (flavan-3-olo).

**Figura 1.12:** Formula di struttura di Acido Clorogenico (acido 3-caffeilquinico).

**Figura 1.13:** Formula di struttura di Acido Caffeilmalico.

**Figura 1.14:** Formula di struttura della Rutina (quercetina 3-rutinoside).

**Figura 1.15:** Struttura chimica del  $\beta$ -carotene.

**Figura 1.16:** Struttura chimica della luteina.

**Figura 1.17:** Apparato gastrointestinale umano.

**Figura 1.18:** Biodisponibilità, Bioaccessibilità e Bioattività

**Figura 3.1:** Rappresentazione schematica del metodo di estrazione della frazione ad attività antiossidante.

**Figura 3.2:** Il sistema Photochem<sup>®</sup> (Analytic Jena; AG, Germania).

**Figura 3.3:** Esempio di curva di misurazione con il metodo PCL-ACL.

**Figura 3.4:** Immagine dello strumento HPLC-UV utilizzato per l'analisi cromatografica dei composti fenolici e dei carotenoidi.

**Figura 3.5:** Biofermentatore utilizzato per la digestione dinamica *in vitro*.

**Figura 3.6:** Rappresentazione schematica del modello gastrointestinale dinamico *in vitro* per la determinazione della bioaccessibilità dei composti fenolici.

**Figura 3.7:** Rappresentazione del modello *Caco-2 monolayer* per lo studio del trasporto transepiteliale.

**Figura 4.1:** Germinazione di *U. urens* per riproduzione via seme.

**Figura 4.2:** Immagine del campo sperimentale presso il CRA-CIN di Rovigo.

**Figura 4.3:** Separazione cromatografica dei composti fenolici del campione UD-F.

**Figura 4.4:** Struttura dell'Acido Clorogenico (acido 3-caffeilquinico).

**Figura 4.5:** Spettro MS ed MS<sup>2</sup> di Acido Caffeilmalico in UD-F.

**Figura 4.6:** Spettro MS ed MS<sup>2</sup> di Rutina in UD-F.

**Figura 4.7:** Retta di taratura in HPLC-UV di Acido clorogenico.

**Figura 4.8:** Retta di taratura in HPLC-UV di Rutina.

**Figura 4.9:** Retta di taratura in HPLC-UV di Isoquercetina.

**Figura 4.10:** Retta di taratura in HPLC-UV di Kaempferolo 3-rutinoside.

**Figura 4.11:** Separazione cromatografica dei carotenoidi nel campione UD-F.

**Figura 4.12:** Retta di taratura in HPLC-UV di Luteina.

**Figura 4.13:** Retta di taratura in HPLC-UV di  $\beta$ -carotene.

**Figura 4.14:** Campione P2-O, tagliatelle all'uovo con ortica.

**Figura 4.15:** Campione P1-O, gramigna all'uovo con ortica.

**Figura 4.16:** Separazione cromatografica dei polifenoli nella frazione solubile del campione di pasta all'ortica P1-O.

**Figura 4.17:** Separazione cromatografica di luteina e  $\beta$ -carotene nel campione di pasta all'uovo P1-T.

**Figura 4.18:** Campioni sperimentali di pasta preparati in laboratorio.

**Figura 4.19:** Campione di pane all'ortica (B-O) preparato in laboratorio.

**Figura 4.20:** Integratore a base di foglie di ortica (CAP).

**Figura 4.21:** Cromatogramma del fluido duodenale simulato della digestione del campione di pasta all'ortica P1-O.

**Figura 4.22:** Cromatogramma dell'estratto del fluido duodenale simulato della digestione del campione di pasta all'ortica (P2-O) per la determinazione della bioaccessibilità di luteina e  $\beta$ -carotene.

**Grafico 4.1:** Effetto della % di MeOH sull'estrazione di polifenoli dal campione W0. Contenuto in polifenoli espresso in  $\mu\text{g}$  di catechina eq. per g di campione fresco (N=4).

**Grafico 4.2:** Contenuto totale in polifenoli in seguito ad estrazione a step ripetuti. Valutazione dell'effetto del processo di liofilizzazione del campione W0 (N=4).

**Grafico 4.3:** Contenuto totale in polifenoli ( $\mu\text{g/g}$  catechina eq.  $\pm$  ds, N=6) in foglie di ortica spontanea.

**Grafico 4.4:** Capacità antiossidante nei confronti del radicale DPPH ( $\mu\text{mol/g}$  Trolox eq.  $\pm$  ds, N=6) di foglie di ortica spontanea.

**Grafico 4.5:** Capacità antiossidante nei confronti del radicale  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $\mu\text{mol/g}$  Trolox eq.  $\pm$  ds, N=6) di foglie di ortica spontanea.

**Grafico 4.6:** Contenuto totale in polifenoli e capacità antiossidante (ABTS) di foglie di *U. dioica* coltivata, durante diverse fasi dello sviluppo vegetativo. UD-V: fase vegetativa; UD-F: fase di fioritura; UD-S: fase di maturazione seme; UD-Q: fase di quiescenza. (N=6)

**Grafico 4.7:** Contenuto di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina durante la fasi di crescita vegetativa. UD-V: fase vegetativa; UD-F: fase di fioritura; UD-S: fase di maturazione seme; UD-Q: fase di quiescenza.

**Grafico 4.8:** Contenuto totale di polifenoli in campioni di pasta (media  $\pm$  ds, N=6). M, mezzane all'uovo; PF1, pasta fresca; PF2, pasta fresca all'uovo; M-O, PF1-O, PF2-O, campioni di pasta fortificata con ortica.

**Grafico 4.9:** Capacità antiossidante nei confronti del radicale ABTS di campioni di pasta (media  $\pm$  ds, N=6), determinata attraverso il metodo diretto ABTSd. M, mezzane all'uovo; PF1,

pasta fresca; PF2, pasta fresca all'uovo; M-O, PF1-O, PF2-O, campioni di pasta fortificata con ortica.

**Grafico 4.10:** Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di pasta all'ortica P1-O durante le fasi della digestione.

**Grafico 4.11:** Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di pane all'ortica B-O durante le fasi della digestione.

**Grafico 4.12:** Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di integratore CAP durante le fasi della digestione.

**Grafico 4.13:** Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione di tisana all'ortica T-O durante le fasi della digestione.

**Grafico 4.14:** Bioaccessibilità % di polifenoli nel campione T-O (tisana all'ortica) assunta a stomaco pieno e stomaco vuoto.

**Grafico 4.15:** Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati ottenuti dalla digestione di pasta all'ortica (P1-O e P2-O) e pasta all'uovo (P1-T).

**Grafico 4.16:** Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati della digestione di tisana all'ortica (T-O).

**Grafico 4.17:** Capacità antiossidante dei fluidi gastrointestinali simulati ottenuti dalla digestione di integratore a base di ortica disidratata (CAP).

# INDICE DELLE TABELLE

**Tabella 1.1:** Specie del genere *Urtica* L. nel continente europeo.

**Tabella 1.2:** Composizione bromatologico-nutrizionale dell'ortica su 100 g di sostanza fresca.

**Tabella 1.3:** Composizione amminoacidica di foglie di ortica (g/100g idrolizzato proteico di foglie fresche).

**Tabella 3.1:** Parametri del programma di riscaldamento del processo di mineralizzazione.

**Tabella 3.2:** Composizione della miscela di reazione del metodo PCL-ACL in  $\mu\text{L}$ . X = quantità di standard per la retta di taratura. Y = quantità di campione.

**Tabella 3.3:** Metodo HPLC-UV per l'analisi dei composti fenolici caratteristici di ortica.

**Tabella 3.4:** Metodo HPLC-UV per l'analisi dei carotenoidi.

**Tabella 4.1:** Elenco campioni di ortica spontanea raccolti durante il mese di Aprile 2013.

**Tabella 4.2:** Caratterizzazione bromatologica in campioni di ortica spontanea raggruppati per zona geografica di provenienza (media  $\pm$  ds).

**Tabella 4.3:** Contenuto di macroelementi in campioni di ortica spontanea raggruppati per zona geografica di provenienza (media  $\pm$  ds).

**Tabella 4.4:** Contenuto di oligoelementi in campioni di ortica spontanea raggruppati per zona geografica di provenienza (media  $\pm$  ds).

**Tabella 4.5:** *U. dioica* ed *U. urens* coltivate presso il campo sperimentale del CRA-CIN di Rovigo.

**Tabella 4.6:** Raccolta e sigla dei campioni di *U. dioica* coltivata durante le diverse fasi del ciclo vegetativo.

**Tabella 4.7:** Identificazione MS e MS<sup>2</sup> di composti fenolici in foglie di *U. dioica*.

**Tabella 4.8:** Quantificazione di composti fenolici in foglie di *U. dioica* coltivata, durante le diverse fasi di sviluppo vegetativo. Risultati espressi come µg/g di sostanza fresca (media ± ds, N=6).

**Tabella 4.9:** Quantificazione di luteina e β-carotene in foglie di *U. dioica* coltivata, durante diverse fasi dello sviluppo vegetativo. UD-V: fase vegetativa; UD-F: fase di fioritura; UD-S: fase di maturazione seme; UD-Q: fase di quiescenza. Risultati espressi come µg/g di sostanza secca (media ± ds, N=6).

**Tabella 4.10:** Campioni oggetto di studio per la valutazione delle caratteristiche bromatologiche e delle proprietà antiossidanti di pasta speciale all'ortica a confronto con pasta tradizionale e pasta all'uovo.

**Tabella 4.11:** Contenuto proteico e frazione minerale totale in campioni di pasta all'ortica (M-O, PF1-O, PF2-O) confrontati coi rispettivi campioni non fortificati (M, PF1, PF2); media±ds, N=6.

**Tabella 4.12:** Valutazione dell'apporto di macroelementi in campioni di pasta all'ortica (M-O, PF1-O, PF2-O) confrontati coi rispettivi campioni non fortificati (M, PF1, PF2); media±ds, N=6.

**Tabella 4.13:** Valutazione dell'apporto di oligoelementi in campioni di pasta all'ortica (M-O, PF1-O, PF2-O) confrontati coi rispettivi campioni non fortificati (M, PF1, PF2); media ± ds, N=6.

**Tabella 4.14:** Elenco dei campioni di pasta secca utilizzati per la determinazione specifica dei composti fenolici e dei carotenoidi.

**Tabella 4.15:** Contenuto specifico di polifenoli espresso in µg/g di polvere di ortica disidratata (media ± ds, N=6).

**Tabella 4.16:** Contenuto specifico di polifenoli espresso in  $\mu\text{g/g}$  di pasta secca (media,  $N=6$ ,  $CV<10\%$ ). Contenuto totale: frazione solubile + frazione *bound*. nd: non determinabile. P1-T, pasta 1 all'uovo; P1-O, pasta 1 all'ortica; P2-T, pasta 2 all'uovo; P2-O, pasta 2 all'ortica.

**Tabella 4.17:** Effetto della cottura sul contenuto fenolico del campione di pasta all'ortica P1-O. Contenuto espresso in  $\mu\text{g/g}$  su campione secco (media,  $N=4$ ).

**Tabella 4.18:** Contenuto di luteina e  $\beta$ -carotene in campioni di pasta secca tradizionale ed all'ortica. Risultati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di prodotto secco (media  $\pm$  ds,  $N=6$ ). P1-T, pasta 1 all'uovo; P1-O, pasta 1 all'ortica; P2-T, pasta 2 all'uovo; P2-O, pasta 2 all'ortica.

**Tabella 4.19:** Campioni sperimentali di pasta utilizzati per lo studio dei carotenoidi; denominazione ed ingredienti.

**Tabella 4.20:** Contenuto di luteina e  $\beta$ -carotene in campioni sperimentali di pasta secca. Risultati espressi in  $\mu\text{g/g}$  di prodotto secco (media  $\pm$  ds,  $N=6$ ).

**Tabella 4.21:** Effetto della cottura sul contenuto di carotenoidi nei campioni industriali di pasta secca. Contenuto espresso in  $\mu\text{g/g}$  su campione secco (media,  $N=6$ ). P1-T, pasta 1 all'uovo; P1-O, pasta 1 all'ortica; P2-T, pasta 2 all'uovo; P2-O, pasta 2 all'ortica.

**Tabella 4.22:** Elenco campioni sottoposti al modello gastrointestinale dinamico *in vitro*.

**Tabella 4.23:** Quantificazione di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina in prodotti alimentari a base di ortica (media,  $N=4$ ,  $CV\%<5\%$ ).

**Tabella 4.24:** Bioaccessibilità % di polifenoli durante le diverse fasi della digestione. P1-O, pasta all'ortica. B-O, pane all'ortica. T-O, tisana all'ortica. CAP, integratore a base di ortica. Media  $\pm$  ds,  $N=4$ .

**Tabella 4.25:** Valutazione % del trasporto transepiteliale di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina. P1-O, pasta all'ortica. T-O, tisana all'ortica. CAP, integratore a base di ortica. Media  $\pm$  ds,  $N=6$ .

**Tabella 4.26:** Biodisponibilità % stimata di acido clorogenico, acido caffeilmalico e rutina. Media  $\pm$  ds, N=6.

**Tabella 4.27:** Quantificazione di luteina e  $\beta$ -carotene in prodotti alimentari a base di ortica (media  $\pm$  ds, N=4).

**Tabella 4.28:** Bioaccessibilità % di luteina e  $\beta$ -carotene durante le diverse fasi della digestione. P1-T, pasta 1 all'uovo. P1-O, pasta 1 all'ortica. P2-O, pasta 2 all'ortica. CAP, integratore a base di ortica. Media  $\pm$  ds, N=4.

# RINGRAZIAMENTI

La realizzazione della ricerca è stata possibile grazie al progetto “Studio e valorizzazione di specie di ortica tipiche del comprensorio emiliano” finanziato dalla Regione Emilia Romagna e dall’Associazione Amici dell’Ortica di Malalbergo, a cui ha fatto seguito il progetto “Valorizzazione Industriale di specie di Ortica tipiche del Comprensorio Emiliano” premiato al concorso per giovani laureati del Lions Club International Distretto 108Tb – Italia. Inoltre, desidero ringraziare il Centro di Ricerca per Colture Industriali di Rovigo, in particolare il Dott. Gianpaolo Grassi, per la creazione del campo sperimentale di coltivazione e studio agronomico. Gli studi di bioaccessibilità sono stati condotti presso il “Departamento de Medicina Preventiva y Salud Publica, Ciències de l’Alimentaciò, Toxicologia Y Medicina Legal” della Universitat de Valencia grazie al finanziamento dell’Ufficio di Ricerca Nazionale dell’Università degli Studi di Ferrara “Bando Giovani Ricercatori 2015”. Ringrazio calorosamente il Prof. Jordi Mañes, responsabile del “Laboratory of Food Chemistry and Toxicology”, per avermi concesso l’onore di far parte del gruppo di ricerca, per il supporto tecnico e scientifico e per l’ospitalità ricevuta. Ringrazio inoltre il Dott. Giuseppe Meca per la pazienza e i consigli e le Dott.sse Federica Saladino, Keliani Bordin e Maria Chiara Vagni senza le quali non sarebbe stato possibile lo studio del trasporto transepiteliale.

Il ringraziamento maggiore è riservato al Prof. Vincenzo Brandolini, che mi ha concesso il privilegio di affrontare il percorso di PhD student nel gruppo di Chimica degli Alimenti dell’Università di Ferrara, composto inoltre dalle Dott.sse Paola Tedeschi ed Annalisa Maietti, preziose collaboratrici durante tutto il periodo di ricerca. Durante il progetto hanno collaborato in maniera fondamentale le Dott.sse Silvia Marchini e Stefania Segala.

Infine, ringrazio chi ha sopportato il sottoscritto e l’ortica durante tutti questi anni: Anna, presente e futuro della mia vita, Andrea, compagno di studi fondamentale dall’inizio del percorso accademico e persona eccezionale, Federica, amica con la A maiuscola e punto di riferimento che mi ha reso una persona migliore. Ringrazio inoltre la famiglia, gli amici di lunga data, i compagni di avventure di Valencia e tutte le persone da cui, positivamente o negativamente, ho imparato qualcosa nella vita.