

Con queste ultime prove la società agricola Sana Pianta SS completa le proprie operazioni agricole acquisendo un know how sulle piante tintorie oggetto del progetto. Le rese sono state calcolate utilizzando il metodo del campionamento così costituito da

- Anthemis: fiori di 100 piante
- Reseda: peso di 100 piante
- Bietola rossa: peso di 100 tuberi e kg di tuberi per metro lineare di semina

proiettando sulla superficie di un ettaro con un sesto di 75 X 35 (medio) o sulle piante per metro lineare nel caso della bietola.

<u>specie</u>	<u>resa a pianta kg</u>	<u>resa fresco ad ha kg (teorica)</u>	<u>resa secco ad ha kg*</u>
<u>reseda</u>	<u>0,118</u>	<u>4.495</u>	<u>1.033</u>
<u>camomilla dei tintori</u>	<u>0,065</u>	<u>2.476</u>	<u>495</u>
<u>bietola rossa</u>	<u>0,167</u>	<u>46.388</u>	<u>=</u>
<u>verga d'oro</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>

*I dati da fresco a secco sono stati determinanti essiccando i campioni all'aria o in essiccatoio (durante altri processi di essiccazione)

Nel particolare è stato possibili concludere per le singole specie:

Per la RESEDA:

- A. Pianta relativamente semplice una volta attecchita
- B. si autorisemina con facilità
- C. biennale autunno vernina, adatta come intercalare
- D. poco competitiva con le malerbe ma poi copre
- E. pianta vigorosa in natura, probabilmente occorre trovare le varietà giuste per avere rese elevate
- F. resa limitata e convenienza per prezzi oltre i 5 euro/kg
- G. riduzione dei costi con semina diretta (da testare)

Per la CAMOMILLA DEI TINTORI:

- A. Pianta relativamente semplice una volta attecchita
- B. biennale autunno-vernina, adatta come intercalare
- C. abbastanza competitiva con le infestanti
- D. Non tollera ristagni idrici e necessita di terreni franchi e asciutti
- E. resa molto limitata e convenienza per prezzi oltre i 10 euro/kg
- F. riduzione dei costi con semina diretta (da testare) e raccolta meccanica del fiore

Per la Bietola vulgaris

- A. Pianta semplice ma richiede manodopera
- B. molto esigente per acqua e concimazioni
- C. annuale rapida adatta come intercalare
- D. resa notevole e convenienza per prezzi oltre i 0,5 euro/kg
- E. riduzione dei costi con raccolta meccanica e scerbatura meccanica

Per la Solidago virgaurea:

Per la verga d'oro il giudizio rimane sospeso. Al momento è stato difficile sia nella prima fase che nella seconda ottenere piantine di qualità.

Le poche ottenute dai vivaisti sono deperite rapidamente durante i primi giorni di trapianto.

Anche le piante piantate a giugno 2015 sono in grave sofferenza.

La natura della pianta fa pensare che non sia adatta al pieno campo in area mediterranea (in Nord Europa in effetti è già coltivata)

Le seguenti conclusioni generali possono essere tratte:

1. Per chi già coltiva le officinali queste specie non sono particolarmente nuove e si assimilano ad altre officinali.
2. E' possibile con il tempo mettere a punto una tecnica che consenta di aumentare la resa e minimizzare i costi.
3. In BIO i problemi principali sono le erbe infestanti ed in misura minore patogeni ed insetti.
4. Per la camomilla dei tintori potrebbe essere interessante applicare macchine "stripper" sviluppate per la camomilla matriacaria

5. In ogni caso è importante che la produzione di queste piante, fonte di ingredienti industriali, sia sostenibile economicamente e ciò può esserlo solo all'interno di una filiera italiana di qualità.

I risultati della coltivazione delle specie tintorie e la loro applicazione nel tinteggio sono state presentate dal Dr Fioretti all'EXPO di Milano dove si è dato risalto all'importante contributo dato dalla Regione Umbria con il Piano di Sviluppo Rurale.

Analisi dei tenori dei pigmenti.

La Sana Pianta ss ha inoltre analizzato le sue coltivazioni durante la crescita commissionando alla 'Università di Perugia controllo del titolo dei pigmenti tintori durante la crescita e durante le varie fasi di essiccazioni. Di seguito riportiamo i principali risultati dell'indagine:

Campioni di: Reseda, parti aeree essiccate e frantumate.

Sono stati analizzati i seguenti campioni:

Reseda essiccata naturalmente, N

Reseda essiccata 40°C, 40h, 40-40

I campioni (2g e 4g) sono stati estratti con acqua (40 mL), alla temperatura di 90°C, per 20, 40 e 70 min, dopodiché sono stati filtrati, diluiti e sottoposti all'analisi spettrofotometrica, con lettura a $\lambda = 320 \text{ nm}$

CAMPIONI	Assorbanza	
	2g diluz. 1:50	4g diluz. 1:100
N		
90°-20min	0,8546	0,9198
90°-40min	0,8947	0,7578
90°-70min	0,9776	0,8518

40-40		
90°-20min	0,6478	0,6302
90°-40min	0,6548	0,6189
90°-70min	0,6825	0,6359

Campioni di: Reseda, parti aeree essiccate e frantumate.

Sono stati analizzati i seguenti campioni:

Reseda essiccata naturalmente, N

Reseda essiccata commerciale, C

I campioni (2g e 4g) sono stati estratti con acqua (40 mL), alla temperatura di 90°C, per 20, 40 e 70 min, dopodiché sono stati filtrati, diluiti e sottoposti ad analisi HPLC-DAD.

CAMPIONI	luteolina	luteolina	luteolina
	mg/g	7-O-glucoside mg/g	3',7-di-O-glucoside mg/g
N 2g			
90°-20min	0,1	4,9	2,6
90°-40min	0,1	4,7	2,7
90°-70min	0,1	4,6	2,4
N 4g			
90°-20min	0,1	4,7	2,9

90°-40min	0,1	4,5	2,7
90°-70min	0,1	4,1	2,6
C 2g			
90°-20min	0,2	0,5	1,0
90°-40min	0,2	0,4	0,5
90°-70min	0,2	0,4	0,5
C 4g			
90°-20min	0,1	0,2	0,6
90°-40min	0,1	0,2	0,4
90°-70min	0,1	0,2	0,4

Campioni di: Camomilla, fiori essiccati e frantumati.

I campioni (2g e 4g) sono stati estratti con acqua (40 mL), alla temperatura di 90°C, per 20, 40 e 70 min, dopodiché sono stati filtrati, diluiti e sottoposti all'analisi spettrofotometrica, con lettura a $\lambda = 324 \text{ nm}$

CAMPIONI	Assorbanza	
	2g	4g
	diluiz. 1:100	diluiz. 1:200
90°-20min	0,8349	0,9202
90°-40min	0,9088	0,9262
90°-70min	0,8851	0,9501

Partner Cooperativa Diantene.

Nel periodo estivo autunnale 2013 è stato preparato tutto il terreno per la coltivazione della *Isatis tinctoria* mediante aratura a media profondità, mentre in marzo 2014 il terreno è stato affinato. La superficie dedicata alla coltura è di circa un ettaro in coltura biologica collinare in prossimità del fiume Chiascio (Figura 3.36).

Per la coltivazione del guado era previsto il trapianto con semina in contenitori alveolati a gennaio con trapianto primaverile. Inizialmente sono state utilizzate delle sementi presenti presso la cooperativa ricavate da un precedente raccolto dell'anno 2011. A causa della mancanza della certificazione bio è stato cambiato il fornitore delle piante di *Isatis tinctoria* accumulando un ritardo nella generazione di piantine. Si è quindi deciso di procedere per semina diretta mediante trattrice agricola, ma a causa della condizioni meteorologiche le piantine germinate in campo sono state scarse e irregolari, come evidenziato dal sopralluogo eseguito il 19 maggio 2014 (Figura 3.34). Sono inoltre presenti nella coltivazione piante infestanti come atteso dalla coltivazione bio (Figura 3.35).



Figura 3.34. Campo di *Isatis tinctoria* dopo la prima semina



Figura 3.35. Pianta infestante nel campo di *Isatis tinctoria* dopo la prima semina

Cambiando fornitore, sono state ottenute solo 600 piantine che sono state trapiantate manualmente in maggio 2014. L'area di trapianto è stata delineata tramite corde di nylon, conficcando nel terreno paletti di legno al fine di tendere il filo ed avere un riferimento per allineare le file di piante (Figura 3.36).



Figura 3.36. Preparazione appezzamento per il trapianto

I solchi sono stati praticati tramite zappatura in modo di eliminare anche le piante infestanti (Figura 3.37).



Figura 3.37. (Alto). Preparazione del terreno mediante zappatura per il trapianto del guado.



Figura 3.38 (Sinistra). Fila di Isatis tinctoria dopo il trapianto

Le piante sono state trasportate nel luogo di trapianto attraverso dei plateau di polistirolo e sono state poste a dimora nei solchi aperti (Figura 3.38 e 3.39). Sono state ottenute 10 file di circa 10 metri di lunghezza con una distanza interfila di 20 cm (Figura 3.40). Subito dopo il trapianto è stata eseguita una irrigazione a mano di soccorso

che è proseguita nei giorni successivi (Figure 3.40, 3.41 e 3.42).



Figura 3.39. Particolare delle piante trapiantate di *Isatis tinctoria*



Figura 3.40. File di *Isatis tinctoria* dopo trapianto e irrigazione manuale



Figura 3.50. Piante di *Isatis tinctoria* nata dalla semina diretta

Nella nuova fase la cooperativa ha svolto le seguenti attività: 1) raccolta delle foglie per la procedura di produzione del pigmento, 2) raccolta del seme e trapianto di nuove piante stagione 2015 e 3) sviluppo di nuovi processi tintori basato sull'uso di precursori.

1) raccolta delle foglie per la procedura di produzione del pigmento

La cooperativa Diantene è stata impegnata in vari momenti nella raccolta di varie parti della pianta e stadi di maturazione della *Isatis tinctoria* coltivata al fine di analizzare le condizioni migliori per ottenere una maggior contenuto in pigmenti e per aumentare le conoscenze sulla composizione del fitocomplesso elemento necessario per un 'eventuale processo di innovazione. Sono state in particolare ottenuti dei campioni di fogli in varie fasi rispetto alla fioritura così come sono state analizzate i pigmenti a seguito di vari processi di conservazione/essicazione. Una particolare attenzione è stata rivolta nello studio del processo di estrazione e di caratterizzazione dell'estratto in stretta collaborazione con l'università di Perugia con la quale sono state programmate delle prove di produzione del pigmento anche utilizzando procedure enzimatiche. Di seguito riassumiamo i principali risultati dell'Estrazione delle foglie di *Isatis tinctoria*, analisi HPLC degli estratti, prove di idrolisi enzimatica con β -glucosidasi degli estratti e monitoraggio HPLC e prove di tintura con gli estratti ottenuti.

Estratto 1 da foglie (raccolte da piante senza fiore) essiccate (0,5g in 15 mL tampone HCl/CH₃COONa 50 mM, pH 3). Dopo filtrazione, l'estratto è stato analizzato in HPLC e non è stato osservato il picco corrispondente all'indican. L'estratto (diluito 1:30) è stato sottoposto all'azione enzimatica (500 µL + 0,5 mg β-glucosidasi) a 35°C in agitazione magnetica. La reazione è stata monitorata mediante HPLC dopo 25, 60 e 150 min e non sono state osservate modificazioni del profilo.

Estratto 2 da foglie (raccolte da piante con fiore) essiccate (0,5g in 15 mL tampone HCl/CH₃COONa 50 mM, pH 3). Dopo filtrazione, l'estratto è stato analizzato in HPLC: il profilo cromatografico è risultato simile a quello dell'estratto ottenuto da foglie raccolte da piante senza fiore essiccate, ma presentava un diverso rapporto tra i picchi. Dopo 3 giorni l'estratto è stato iniettato di nuovo e il profilo cromatografico non è cambiato. L'estratto è stato sottoposto ad idrolisi enzimatica (500 µL + 0,85 mg β-glucosidasi) a 35°C in agitazione magnetica. La reazione è stata monitorata mediante HPLC dopo 30 e 60 min: reazione non avvenuta. Dopo 100 min sono stati aggiunti altri 0,8 mg di enzima ma la reazione non sembra essere comunque avvenuta. Il giorno successivo la soluzione di reazione è stata portata a pH 8 con Na₂CO₃ 10 mM e lasciata in agitazione magnetica a contatto con l'aria per 3 ore ma non è stata osservata la formazione dell'indigo.

Estratto 3 da foglie (raccolte da piante con fiore) congelate intere (1,28 g in 38,4 mL tampone HCl/CH₃COONa 50 mM, pH 3). Dopo filtrazione, l'estratto è stato analizzato in HPLC. Il profilo cromatografico è risultato simile a quello degli altri estratti e sono state individuate solo tracce di indican.

Estratto 4 da foglie (raccolte da piante senza fiore) essiccate (1,05 g in 30 mL H₂O) a 100°C per 10 min. Dopo filtrazione, l'estratto è stato analizzato in HPLC. Il profilo cromatografico è risultato simile a quello degli altri estratti.

Estratto 5 da foglie (raccolte da piante senza fiore) essiccate (1 g in 10 mL H₂O) a 100°C per 10 min. L'estratto è stato sottoposto ad idrolisi enzimatica: 2,5 mL + 2,5 mL buffer CH₃COOH/CH₃COONa 50mM, pH 5 + 5U β-glucosidasi (0,55 mg) a 25°C in agitazione magnetica. La reazione è stata monitorata in HPLC dopo 30, 60 e 80 min. Non è stata osservata la formazione dell'indigo.

2) raccolta del seme e trapianto di nuove piante stagione 2015

Un'importante osservazione eseguita nella coltivazione dell'*Isatis tinctoria* è che se la pianta sverna fiorisce nella primavera successiva. Nella foto di seguito viene mostrata la fioritura di fine primavera 2015 osservata sulla coltivazione di *Isatis* piantata in autunno 2014.



Fioritura di *Isatis tinctoria* nella primavera del 2015

3) Dopo circa un mese dalla fioritura è stato raccolto il seme e il campo è stato ripulito per un nuovo trapianto. Questo trapianto ha permesso di analizzare il contenuto di pigmenti in un ciclo culturale corto senza svernamento.



Raccolta del seme di Isatis tinctoria 2015

Azione 4 – Estrazione e procedura di fotoprotezione

Partner coinvolto PROLABIN E TEFARM (CAPOFILA)

SPECIE TINTORIA	MOLECOLE COLORANTI – principali -	Colore
-----------------	-----------------------------------	--------

L'azione oggetto della rendicontazione ha come obiettivo primario mettere a punto una procedura di scale up adeguata alla produzione agricola dell'anno 2014.

Come riportato nello stato dell'arte, il progetto si basa sulla possibilità di poter intercalare dei coloranti all'interno di solidi lamellari (fase di intercalazione) e di rivestire il prodotto così ottenuto con un film polimerico (fase di micro-incapsulazione) al fine di conferire adesività alla fibra durante la fase tintoria.

In una prima fase è stata condotta un'analisi della letteratura per identificare le specie molecolari responsabili delle proprietà tintorie delle piante in esame. Di seguito riportiamo una tabella che riassume le classi di molecole principali per le specie tintorie oggetto del progetto:

Tabella 4.1. Specie tintorie oggetto del progetto e pigmenti tintori principali contenuti

Anthemis tinctoria	Flavonoidi: apigenina, luteolina, e miricetina.	GIALLO
Reseda lutea	Flavonoidi: luteolina, apigenina	GIALLO
Solidago virgaurea	Flavonoidi: quercitina, canferolo e rutina.	GIALLO
Isatis tinctoria	Indigotina	BLUE
Beta vulgaris	Betanina (o rosso barbabietola, E162) e betaxantina	ROSSO

Dalla Tabella 4.1. si può notare come la colorazione gialla sia impartita da specie tintorie ricche in flavonoidi come apigenina, luteolina, miricetina, canferolo, quercitina e rutina di cui sotto riportiamo la struttura chimica (Figura 4.1).

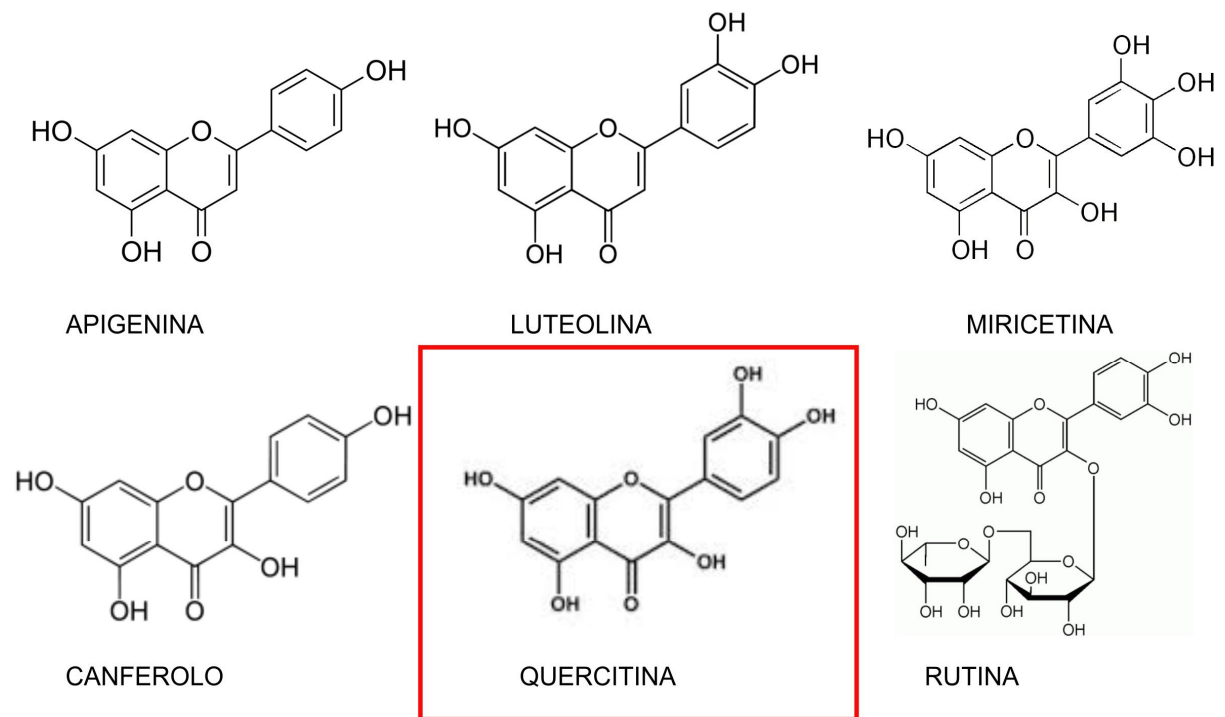


Figura 4.1. Principali specie flavonoidiche responsabili della tinta gialla

Di converso la tonalità del blu impartita dal pigmento dell'Isatis Tinctoria e quella del rosso sono da ascrivere a molecole non flavanoidiche (Figura 4.2).

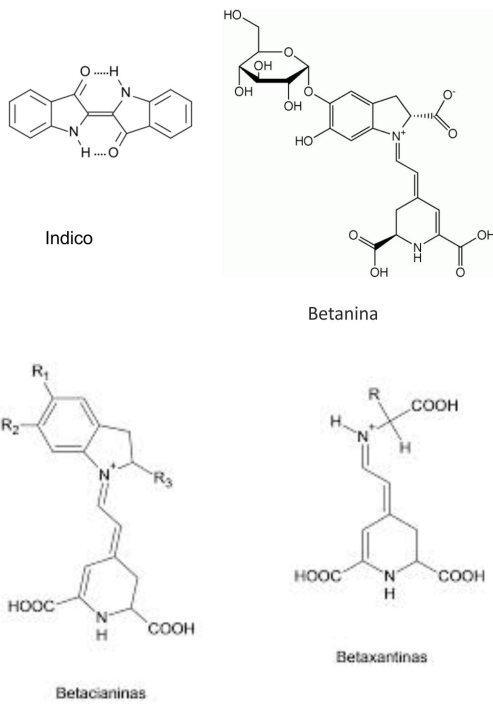


Figura 4.2. Principali molecole responsabili delle proprietà tintorie nelle specie *Isatis tinctoria* e *Bietola vulgaris*.

I solidi lamellari inorganici presentano la capacità di ospitare nella regione interstrato o sulla superficie delle lamelle specie ospiti di natura organica o inorganica, originando composti host-guest. Le idrotalciti (HtIc) o argille anioniche sono solidi lamellari con cariche positive bilanciate da anioni scambiabili accomodati nella regione interstrato. L'intercalazione delle molecole organiche nel solido inorganico avviene normalmente mediante una reazione di scambio ionico, in cui le specie da intercalare sono in forma anionica. Il processo di intercalazione nelle idrotalciti è possibile quindi per molecole caratterizzate da gruppi chimici acidi (carbossilici, solfonici, fosfonici etc.). In base alla struttura, solo le molecole contenute nella barbabietola rossa raggiungono il requisito molecolare sopraindicato (betanina, betacianina e betaxantina). I flavonoidi presentano una acidità relativamente bassa quindi la loro capacità di intercalazione non è facilmente prevedibile e va verificata sperimentalmente. Infine l'indaco pigmento blue contenuto nella specie tintoria *Isatis tinctoria* non possiede gruppi acidi.

STUDIO DI NUOVI COLORANTI PER IL GIALLO: PIANTE TINTORIE RICCHE IN FLAVONOIDI

STUDIO INTERCALAZIONE DEI FLAVONOIDI

Premessa. In base alla riunione dell'ATS (Verbale del 9 settembre 2013) è stato programmato lo studio per la realizzazione di nuovi coloranti protetti in argille partendo dai flavonoidi. Le azioni sono state svolte in sinergia dal Dr Roberto Spogli e dal Dr Michele Sisani, attraverso la stipula di un contratto a progetto dal mese di agosto 2013. Inizialmente sono state fatte delle prove utilizzando dei flavonoidi puri commercialmente disponibili come la quercitina (Figura 4.1, box rosso, principale contenuto nella *Solidago virgaurea* L) per poi passare a miscele complesse come quelle dei bagni tintori ottenute per estrazione dalle specie tintorie oggetto del progetto. L'intercalazione di specie molecolari in argille sintetiche come le idrotalciti può essere ottenuta tramite varie strategie quali lo scambio ionico e la co-precipitazione. Nello scambio ionico si utilizzano delle idrotalciti in cui la specie ospite nella regione interstrato (in genere nitrato o cloruro) viene facilmente scambiata quando contattata con una soluzione contenente l'anione da intercalare; nella procedura di co-precipitazione invece l'idrotalcite viene sintetizzata in presenza dell'anione da intercalare partendo dai sali bivalenti e trivalenti dei cationi mediante addizione di soda.

L'intercalazione della quercitina. La quercitina è praticamente insolubile in acqua, la sua solubilità può essere aumentata mediante salificazione con NaOH. Di seguito riportiamo i risultati ottenuti utilizzando il metodo dello scambio ionico e quello della co-precipitazione nel tentativo di intercalare la quercitina.

Scambio ionico. La prima prova di intercalazione è stata effettuata mediante scambio ionico contattando idrotalcite di tipo ZnAl-NO₃ con una soluzione acquosa di quercitina in quantità pari alla capacità di scambio ionico, per 24 ore. Il solido giallo-marroncino che si ottiene è stato analizzato mediante diffrazione di raggi X; il relativo diffrattogramma (figura 4.3) mostra una distanza interstrato pari a 7.6 Å, riconducibile alla presenza di ioni carbonato, a conferma dell'assenza di intercalazione della quercitina.

Nonostante il tentativo di intercalare la quercitina per scambio ionico non abbia dato risultati, essa risulta in gran parte adsorbita sulla polvere di idrotalcite recuperata ed essiccata.

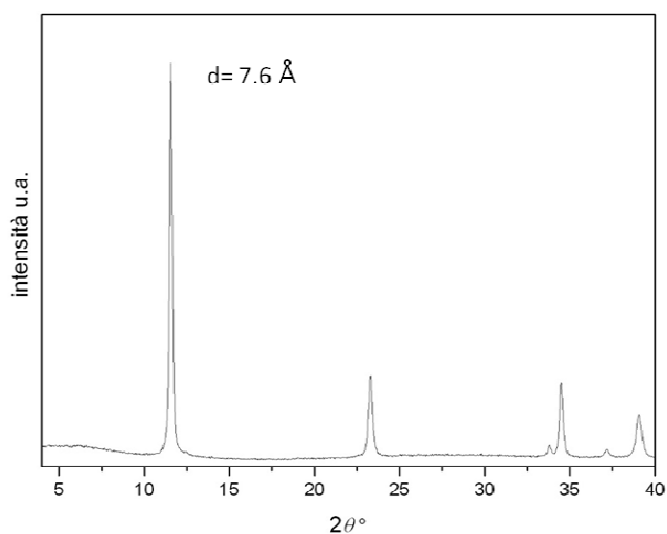


Figura 4.3. Diffrattogramma dell'idrotalcite ottenuta per scambio da una soluzione acquosa di quercitina.

Co-precipitazione. E' stata poi eseguita una prova di intercalazione mediante co-precipitazione. Sono state preparate 2 soluzioni, una soluzione 2 M dei sali $Zn(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ e $Al(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$ in rapporto molare Zn/Al pari a 4, e una soluzione acquosa 0.03 M (limite di solubilità) di quercitina (mediante salificazione con soda). Le 2 soluzioni sono state poste a contatto ed è stata addizionata soda 2 M fino alla formazione di un precipitato marrone. Il solido così ottenuto è stato recuperato per centrifugazione e seccato in stufa a 60°C. Il relativo diffrattogramma, riportato in Figura 4.4, mostra che il solido ottenuto per co-precipitazione non è lamellare ma amorfo.

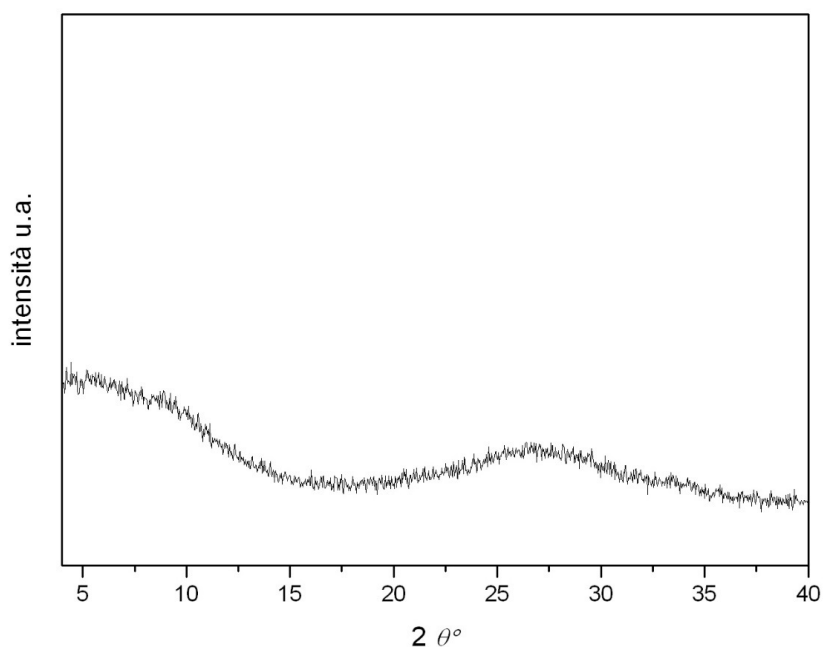


Figura 4.4. Diffrattogramma dell'idrotalcite ZnAl ottenuta per co-precipitazione in presenza di una soluzione alcalina satura di quercitina.

I risultati ottenuti dalle prove di intercalazione effettuate mostrano che non è possibile ottenere composti di intercalazione con quercitina e probabilmente con molecole chimicamente simili. Sono state quindi eseguite prove di intercalazione a partire da estratti di piante tintorie anziché da principi puri; le miscele tintorie, ottenute per estrazione in soluzione acquosa, presentano infatti anche gruppi di molecole che potrebbero modificare le proprietà di intercalazione dei flavonoidi, come fosfolipidi, clorofille, ecc.

In base alla riunione programmatica ATS (verbale 3) si è deciso di partire dai bagni tintori ottenuti dalla Reseda lutea.

Ottimizzazione del bagno tintorio di Reseda lutea. Al fine di ottenere le migliori proprietà del bagno tintorio, ottimizzando il rapporto p/p di pianta/solvente, sono state eseguiti dei test preliminari mediante valutazione