

Giornata di studio:

I tannini di castagno
ed i loro molteplici impieghi

Firenze, 22 marzo 2012

Caratterizzazione chimica dei tannini idrolizzabili da castagno e da altre specie vegetali

INTRODUZIONE

I tannini sono metaboliti secondari di natura polifenolica, comuni nelle piante vascolari e presenti principalmente nei tessuti di foglie, steli, corteccia, radici e semi. La loro principale funzione è quella di preservare la pianta dall'azione di microrganismi patogeni, insetti e altri animali.

Nei tannini idrolizzabili un carboidrato, generalmente D-glucosio, è esterificato con una o più molecole di acido gallico (gallotannini) o acido ellagico (ellagitannini). I tannini condensati (o proantocianidine) sono flavonoidi monomerici o polimerici, basati su unità flavan-3-oliche (catechina o epicatechina) legate tra loro mediante legami C-C. I tannini idrolizzabili sono labili in ambiente acido o basico e si ossidano più facilmente rispetto a quelli condensati, che possiedono una maggiore stabilità (Hagerman, Tannin chemistry [e-book] <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>). Studi recenti hanno documentato proprietà dei tannini che li renderebbero adatti per numerosi utilizzi innovativi in vari settori come quello alimentare, fitoterapico, cosmetico, nutraceutico e agronomico (Okuda, 2005; Buzzini et al., 2008; Lee et al., 2010; Lupini et al., 2009).

Nel presente lavoro estratti ricchi in tannini ottenuti da castagno, mirto e melograno sono stati analizzati, caratterizzati e confrontati tramite metodi HPLC/DAD/ESI-MS per valutare la possibilità di sfruttare detti estratti per le loro proprietà biologiche quali quella antiossidante, antiradicalica e antimicrobica. Particolare attenzione deve essere rivolta allo studio di tecniche di frazionamento poiché gli estratti hanno spesso composizione complessa e si

* *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Firenze*

rende necessario isolare e stabilizzare frazioni nobili, ad alta concentrazione di molecole attive, sia per il loro futuro utilizzo, sia per individuare le singole molecole responsabili dell'attività biologica. Le attività di ricerca del presente lavoro sono state finanziate dal MIUR nell'ambito del progetto PRIN-2008 "Estratti naturali da piante medicinali e tessili-tintorie: caratterizzazione e usi innovativi di Ortica, Daphne, Lavanda e tannini da Castagno".

MATERIALI E METODI

Tutti i campioni sono stati analizzati in HPLC/DAD e HPLC/DAD/ESI-MS. Le procedure di preparazione dei campioni e di analisi quali-quantitativa sono descritte dettagliatamente nella pubblicazione: ROMANI A., CAMPO M., PINELLI P. (2012): *HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species*, «Food Chemistry», 130, pp. 214-221.

ANALISI QUALI-QUANTITATIVA DEGLI ESTRATTI

Le principali difficoltà nello studio dei tannini sono date dal fatto che esistono molecole polimeriche o isomeri che differiscono solo per il peso molecolare o per la struttura ma non per le caratteristiche dei cromofori. Questo fa sì che le singole molecole siano talvolta indistinguibili mediante la sola spettrofotometria UV-Vis e che richiedano l'utilizzo di uno spettrometro di massa e di standard non sempre disponibili in commercio. I pattern di frammentazione ESI-MS forniscono i dati che permettono di identificare polimeri e derivati galloilati.

CASTANEA SATIVA M.

L'estratto acquoso di castagno Saviotan®, oggetto di studio, è prodotto da Nuova Rivart Srl mediante un impianto di estrazione collegato a un sistema di frazionamento a membrane. I prodotti commerciali sono l'estratto liquido concentrato per nanofiltrazione e lo spray-dried ottenuto da quest'ultimo (estratto secco).

Le analisi cromatografiche rivelano la presenza di una grande varietà e un'alta concentrazione di tannini idrolizzabili. Acido gallico ed ellagico sono presenti sia come tali che esterificati con il glucosio, con o senza legami C-C tra anelli aromatici. Gli epimeri castalagina e vescalagina sono i principali tannini presenti negli estratti di castagno.

	A	B
% acido gallico sul totale:	18,9	1,94
% acido gallico risp. ai gallotannini:	60,3	7,27
% castalagina+vescalagina sul totale:	45,9	28,30
% castalagina+vescalagina risp. agli ellagitannini:	66,8	38,58
% gallici:	31,3	26,65
% ellagici:	68,7	73,35

Tab. 1 *Analisi quali-quantitativa dei derivati presenti negli estratti commerciali di castagno. A: estratto liquido; B: spray dried (estratto secco). Le percentuali sono calcolate attraverso la concentrazione dei singoli derivati in mmoli L⁻¹ nel primo caso e in mmoli g⁻¹ nel secondo caso*

In tabella 1 è riportata l'analisi quali-quantitativa per sottoclassi dei due estratti commerciali di castagno. Il contenuto totale in tannini per l'estratto liquido è di 0.235 mmoli/g, mentre il titolo in tannini dell'estratto secco (calcolato come percentuale in peso dei tannini sul peso della polvere) risulta essere del 34%.

La stessa procedura analitica è stata applicata alle sottofrazioni provenienti dallo stesso processo produttivo per ottimizzarne e standardizzarne le varie fasi, e allo scopo futuro di commercializzare nuove frazioni per utilizzi in campi meno ristretti rispetto a quelli attuali.

PUNICA GRANATUM L. E MYRTUS COMMUNIS L.

Gli estratti di castagno sono stati inoltre confrontati con altri estratti naturali ricchi in tannini idrolizzabili, per individuare possibili utilizzi innovativi di specie già sfruttate in campo alimentare ma oggetto di recenti studi scientifici per le loro proprietà biologiche (Romani et al., 2012).

Gli estratti oggetto di questo lavoro sono stati ottenuti da epicarpo e semi di *Punica granatum* L. (melograno) e foglie di *Myrtus communis* L. (mirto).

I tessuti esaminati provenienti da entrambe le specie suddette sono ricchi in tannini idrolizzabili, basati su strutture diversificate in base alla specie presa in esame: sia gli estratti acquosi che idroalcolici di epicarpo di melagrana risultano essere ricchi in tannini ellagici con una predominanza dei due anomeri α - e β - punicalagina; gli estratti ottenuti dai semi della stessa specie presentano invece una maggiore quantità di gallotannini. L'abbondanza relativa media, negli estratti analizzati, di derivati gallici ed ellagici risulta essere del 28.81% e 71.19% negli estratti di epicarpo, e del 61.30% e 38.70% negli estratti di semi.

Il contenuto in tannini totali risulta essere di 129.60 mg g⁻¹ di tessuto vegetale per gli estratti acquosi di epicarpo e 144.38 mg g⁻¹ per quelli idroalcolici, e di 1.90 mg g⁻¹ per gli estratti idroalcolici di semi (dato medio).

In accordo con dati precedentemente pubblicati (Romani et al., 2004), gli estratti acquosi e quelli idroalcolici di foglie di mirto risultano essere ricchi in polifenoli quali galloil glucosidi, acidi galloil chinici, ellagitannini e flavonoidi. I polifenoli totali sono 12.96 mg g⁻¹ di materiale vegetale negli estratti acquosi e 20.16 mg g⁻¹ in quelli idroalcolici (dato medio). In tutti i campioni abbiamo osservato una predominanza di galloil glucosidi e derivati galloil chinici (87.14% e 12.86%, valori percentuali medi per derivati gallici ed ellagici rispettivamente, rispetto al contenuto totale in tannini).

CONCLUSIONI

Nell'ambito del presente lavoro sono state analizzate e caratterizzate da un punto di vista quali-quantitativo frazioni provenienti da estratti di castagno, allo scopo di ottimizzare e standardizzare il processo produttivo mediante cui esse vengono ottenute, e per sviluppi futuri volti a ottenere nuove frazioni da castagno, ma anche da altre specie vegetali ricche in tannini quali mirto e melograno, stabilizzate e con attività biologica definita, certificabili per nuovi utilizzi nei settori alimentare, fitoterapico, cosmetico e agronomico.

RIASSUNTO

Nel presente lavoro sono state analizzate e caratterizzate via HPLC/DAD/ESI-MS frazioni provenienti da estratti acquosi di corteccia di castagno prodotte mediante un impianto di estrazione a caldo collegato a un sistema di frazionamento basato su tecnologia a membrane. I campioni presi in esame sono stati confrontati tra loro e con estratti ricchi in tannini idrolizzabili provenienti da specie diverse (melograno e mirto) allo scopo di ottimizzare i processi produttivi, ottenere estratti standardizzati e stabilizzati, caratterizzati da alte concentrazioni di molecole biologicamente attive per utilizzi innovativi in campo alimentare, fitoterapico, cosmetico e agronomico.

ABSTRACT

In this work fractions from sweet chestnut extracts, obtained by a membrane extraction system using hot water, have been analyzed and characterized by HPLC/DAD/ESI-MS methods. The analyzed fractions have been compared with each other and with extracts

enriched in hydrolysable tannins from different vegetal species (pomegranate and myrtle) in order to optimize the production process, obtain standardized and stabilized extracts, with higher concentrations of biologically active molecules suitable as innovative tools in food, phytotherapy, cosmetics and agronomy.

BIBLIOGRAFIA

- ARAPITSAS P., MENICHETTI S., VINCIERI F.F., ROMANI A. (2009): *Radical scavenging, antimicrobial activity and phenolic content of Castanea sativa extracts*, «Journal of Central European Agricultural», 10 (2), pp. 175-182.
- BUZZINI P., ARAPITSAS P., GORETTI M., BRANDA E., TURCHETTI B., PINELLI P., IERI F., ROMANI A. (2008): *Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins*, «Mini-Reviews in Medicinal Chemistry», 8, pp. 1179-1187.
- LEE C.J., CHEN L.G., LIANG W.L., WANG C.C. (2010): *Anti-inflammatory effects of Punica granatum Linne in vitro and in vivo*, «Food Chemistry», 118, pp. 315-322.
- LUPINI C., CECCHINATO M., SCAGLIARINI A., GRAZIANI R., CATELLI E. (2009): *In vitro antiviral activity of chestnut and quebracho woods extracts against avian reovirus and metapneumovirus*, «Research in Veterinary Science», 87, pp. 482-487.
- OKUDA T. (2005): *Systematic effects of chemically distinct tannins in medicinal plants*, «Phytochemistry», 66, pp. 2012-2031.
- ROMANI A., CAMPO M., PINELLI P. (2012): *HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species*, «Food Chemistry», 130, pp. 214-221.
- ROMANI A., COINU R., CARTA S., PINELLI P., GALARDI C., VINCIERI F.F., FRANCONI F. (2004): *Evaluation of antioxidant effects of different extracts of Myrtus communis L.*, «Free Radical Research», 38, pp. 97-103.