

ANNALISA ROMANI\*, MARGHERITA CAMPO\*, PATRIZIA PINELLI\*,  
PIETRO BUZZINI\*

## Tannini di castagno quali agenti in grado di espletare effetti antiossidanti, antimicrobici e nutraceutici

### INTRODUZIONE

L'acido tannico è conosciuto per i suoi effetti benefici sulla salute umana grazie all'attività antimitotica, antitumorale e antiossidante, la capacità di ridurre i livelli ematici di colesterolo e trigliceridi, e di sopprimere la lipogenesi a opera dell'insulina. (Yugarani et al., 1993; Ong et al., 1995; Živković et al., 2009; Lupini et al., 2009). Gli estratti ottenuti da foglie di mirto possiedono attività antiossidante e antimicrobica (Romani et al., 2004, Romani et al., 2006a, 2006b) e sono utilizzati nella medicina popolare come antisettici, antinfiammatori e nel trattamento del diabete mellito. (Romani et al., 2004; Yoshimura et al., 2008). Il succo dei frutti di melograno è utilizzato in campo alimentare e cosmetico per la sua azione antiossidante (Lansky e Newman, 2007), ma i dati in letteratura indicano anche proprietà antitumorali, (Lansky e Newman, 2007; Khan et al., 2007), epatoprotettive (Kaur et al., 2006) e antibatteriche (Reddy et al., 2007). Estratti di melograno venivano tradizionalmente utilizzati come astringenti e dissetanti e nella cura di gengiviti e piorrea (Leporatti e Ivancheva, 2003). I tannini condensati possono interagire con i sistemi biologici svolgendo azione antiossidante, antiallergica, antipertensiva, e antimicrobica. Alcuni estratti di piante ricchi in tannini condensati, ad esempio quello di corteccia di pino (Pycnogenol<sup>®</sup>) e quello di vinaccioli (Leucoselect<sup>TM</sup>, Phytosome<sup>®</sup>), sono entrati in commercio per le loro proprietà antiossidanti. Studi scientifici ne attestano l'attività antiradicalica, antiossidante, antimicrobica e antiproliferativa. (Romani et al., 2006a; Lizarraga et

\* Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Laboratorio di Merceologia e Qualità delle Risorse, Università di Firenze; Laboratorio di Qualità delle merci e Affidabilità di Prodotto-PIN

al., 2007). In questo lavoro estratti ricchi in tannini idrolizzabili provenienti da castagno sono stati valutati per quanto riguarda proprietà biologiche quali quella antiossidante, antiradicalica e antimicrobica per individuare la possibilità di utilizzi innovativi in campo cosmetico, nutraceutico, fitoterapico e agronomico. Gran parte delle attività riportate in questo lavoro sono inserite nell'abito del progetto di ricerca dal titolo: Estratti naturali da piante medicinali e tessili tintorie: caratterizzazione e usi innovativi di Ortica, Daphne, Lavanda e Tannini di Castagno (progetto PRIN-2008).

#### MATERIALI E METODI

I metodi analitici e di valutazione dell'attività antiossidante, antiradicalica e antimicrobica sono riportate dettagliatamente nei precedenti lavori: Romani, A., Buzzini, P., Chessa, I., Franconi, F., Pinelli, P., Turchetti, B., Nieddu, G. (2006b): *Use of extracts of myrtle (Myrtus communis L.), standardized for the polyphenolic molecule, as novel antimycotic agents active towards yeast and yeast-like microorganisms of biomedical interest*, PCT/IT2006/47783+A. Deposited date October-11, 2006; 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.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

*Attività antiossidante e antiradicalica:* l'attività antiossidante e antiradicalica sono state valutate mediante i saggi *in vitro* con reattivo di Folin-Ciocalteu e con radicale stabile DPPH., misurando rispettivamente il contenuto in tannini espresso come equivalenti di acido gallico (GAE) e la concentrazione di derivati tannici, presenti negli estratti oggetto di studio, capace di inibire del 50% l'attività del radicale stabile in soluzione ( $EC_{50}$ ).

In tabella 1 sono riportati, a titolo di esempio, i risultati dei saggi per quanto riguarda le due frazioni commerciali di estratto di castagno Saviotan®, e le composizioni dei due campioni espresse come percentuali di sottoclassi presenti, in modo da poter ipotizzare una correlazione tra attività biologica e abbondanza relativa di composti aventi una precisa struttura chimica.

Dati precedenti riguardanti l'attività antiradicalica dell'acido tannico rivelano una maggiore attività di quest'ultimo rispetto a diversi estratti ricchi in tannini sia idrolizzabili che condensati, così come mostra il grafico riportato in figura 1.

CAMPIONE	GAE	EC <sub>50</sub> (μM)	COMPOSIZIONE (SOTTOCLASSI)
ESTRATTO LIQUIDO PESO SPECIFICO 1.25	7,9	2,562	% acido gallico sul totale: 18,9 % acido gallico risp. ai gallotannini: 60,3 % castalagina+vescalagina sul totale: 45,9 % castalagina+vescalagina risp. agli ellagitannini: 66,8 % gallici: 31,3 % ellagici: 68,7
ESTRATTO SECCO	56,99	0,586	% acido gallico sul totale: 1,9 % acido gallico risp. ai gallotannini: 7,3 % castalagina+vescalagina sul totale: 28,3 % castalagina+vescalagina risp. agli ellagitannini: 38,6 % gallici: 26,7 % ellagici: 73,4

Tab. 1 *Contenuto in tannini espresso come equivalenti di acido gallico (GAE, g/100g di estratto), EC<sub>50</sub> (μM) e composizione percentuale per sottoclassi di tannini delle frazioni commerciali da estratto di castagno Saviotan®*

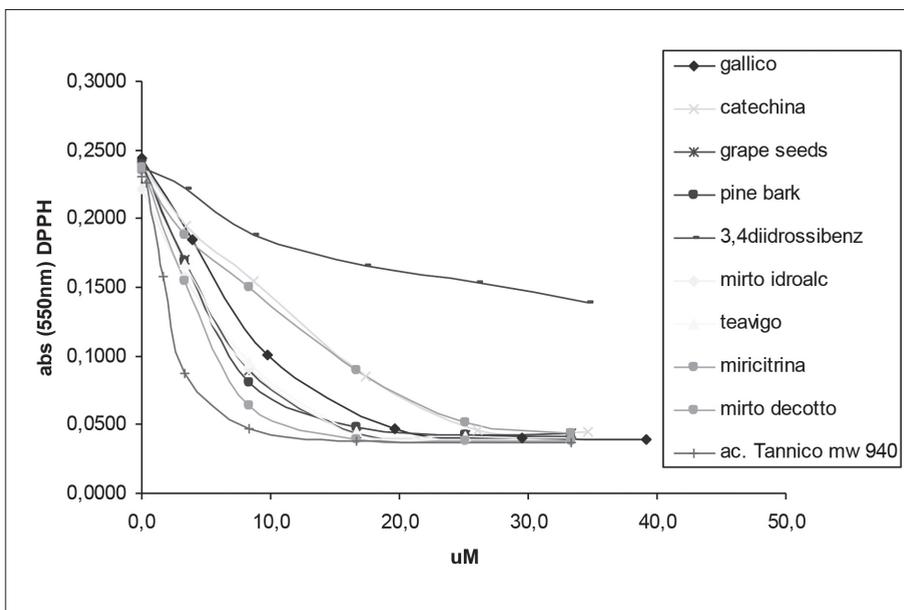


Fig. 1 *Cinetiche di decadimento del radicale stabile DPPH in soluzione, in presenza di estratti ricchi in tannini e di singoli composti*

*Attività antimicotica:* l'attività antimicotica dell'estratto di castagno è stata valutata nei confronti di più ceppi di lieviti e confrontata con quella di un estratto acquoso a caldo di epicarpo di melagrana, anch'esso ricco in tannini

ADWB IN YPD - 25°C	DIAMETER OF INHIBITION AREA (MM)		
	A	B	
concentrations (mg/mL) corresponding with 5.00 mM of total polyphenols	6.41	9.8	
Species	Strain		
<i>C. albicans</i>	6133	16	
<i>C. albicans</i>	6157	18	
<i>C. glabrata</i>	7212	33	25
<i>C. glabrata</i>	3828	30	23
<i>P. guilliermondii</i>	6140		
<i>C. parapsilosis</i>	6150		17
<i>C. tropicalis</i>	3982		
<i>C. zeylanoides</i>	6163		
<i>Cl. lusitaniae</i>	6142		
<i>Cl. lusitaniae</i>	6148		14
<i>I. orientalis</i>	6782	20	
<i>K. marxianus</i>	6141		16
<i>S. cerevisiae</i>	6173	19	22
<i>S. cerevisiae</i>	6497	28 R	24 R
<i>S. cerevisiae</i>	6500	18	21
<i>Y. lipolitica</i>	6053		
<i>Cr. laurentii</i>	3883	25 R	
<i>Cr. laurentii</i>	4272		36
<i>Cr. laurentii</i>	6265		
<i>Fil. neoformans</i>	3428	25 R	18 R
<i>Fil. neoformans</i>	6010	24 R	19 R
<i>Fil. neoformans</i>	6225	25	24
<i>Fil. neoformans</i>	6981	33	34
<i>Fil. neoformans</i>	6982	29	24
<i>P. wickerhamii</i>	8879	19 R	24 R
<i>P. zopfii</i>	8880		
<i>P. zopfii</i>	8830		

Tab. 2 Attività antimicotica di un estratto acquoso a caldo di epicarpo di melagrana (A) e dell'estratto commerciale di castagno (B), nei confronti di diversi ceppi di lieviti

idrolizzabili. La valutazione dell'attività antimicotica su ceppi microbici d'interesse biomedico può portare ad abbattere o eliminare l'utilizzo di molecole di sintesi, o comunque con importanti effetti secondari (es. ketoconazolo, amfotericina B), che potrebbero invece agire in sinergia con i derivati tannici o essere del tutto sostituiti da essi.

Le proprietà biologiche degli estratti oggetto di studio sono state verificate e valutate allo scopo di individuare nuovi potenziali utilizzi di materiale vegetale e frazioni di estratti che allo stato attuale trovano impiego in settori

limitati o non ben definiti, o che costituiscono materiale di scarto di processi produttivi.

Essi potrebbero infatti essere utilizzati come nuovi ingredienti alimentari con proprietà antiossidanti e antimicrobiche, o come semilavorati per nuovi functional food e prodotti nutraceutici. A tale scopo le frazioni oggetto di studio sono state usate singolarmente e in miscela con altri estratti naturali in produzioni alimentari come prodotti da forno e a base di carni. In entrambi i casi sono state effettuate prove di invecchiamento accelerato e di stabilità e dimostrato il reale utilizzo in sostituzione di antiossidanti e antimicrobici di sintesi.

#### RIASSUNTO

Nel presente lavoro estratti ricchi in tannini, in particolare estratti acquosi da castagno (*Castanea sativa* Mill.) e loro frazioni ottenuti con metodi innovativi ed ecosostenibili, sono stati valutati per quanto riguarda proprietà biologiche quali quella antiossidante, antiradicalica ed antimicrobica per individuare la possibilità di individuare utilizzi innovativi in campo farmaceutico, cosmetico, nutraceutico ed agronomico. Le loro proprietà biologiche sono state inoltre confrontate con quelle di altre specie vegetali ricche in tannini sia condensati che idrolizzabili quali *Punica granatum* L. (melograno), *Camellia sinensis* L. (tè verde), *Vitis vinifera* L. (vite).

#### ABSTRACT

In this work, extracts rich in tannins, in particular aqueous extracts from chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and their fractions obtained by innovative and sustainable technology, have been evaluated for biological properties such as antioxidant, antiradical and antimicrobial to identify the possibility of find innovative uses in pharmaceuticals, cosmetics, nutraceuticals and agronomics. Their biological properties have also been compared with those of other plant species rich in tannins, both condensed and hydrolysable, such as *Punica granatum* L. (pomegranate), *Camellia sinensis* L. (Green Tea), *Vitis vinifera* L. (grape).

#### BIBLIOGRAFIA

- KAUR G., JABBAR Z., ATHAR M., SARWAR ALAM M. (2006): *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice, «Food and Chemical Toxicology», 44, pp. 984-993.
- KHAN N., AFAQ F., KWEON M., KIM K., MUKHTAR H. (2007): *Oral Consumption of Pomegranate Fruit Extract Inhibits Growth and Progression of Primary Lung Tumors in Mice*, «Cancer Research», 67, pp. 3475-3482.

- LANSKY E.P., NEWMAN R.A. (2007): *Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*, «Journal of Ethnopharmacology», 109, pp. 177-206.
- LEPORATTI M.L., IVANCHEVA S. (2003): *Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy*, «Journal of Ethnopharmacology», 87, pp. 123-142.
- LIZARRAGA D., LOZANO C., BRIEDE J.J., VAN DELFT J.H., TOURIN S., CENTELLES J.J., TORRES J.L., CASCANTE M. (2007): *The importance of polymerization and galloylation for the antiproliferative properties of procyanidin-rich natural extracts*, «FEBS Journal», 274, pp. 4802-4811.
- 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.
- ONG K.C., KHOO H.E., DAS N.P. (1995): «Cellular and Molecular Life Sciences», 51, pp. 577-584.
- REDDY M.K., GUPTA S.K., JACOB M.R., KHAN S.I., FERREIRA D. (2007): *Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from Punica granatum L.*, «Planta Medica», 73, pp. 461-467.
- ROMANI A., BUZZINI P., CHESSA I., FRANCONI F., PINELLI P., TURCHETTI B., NIEDDU G. (2006b): *Use of extracts of myrtle (Myrtus communis L.), standardized for the polyphenolic molecule, as novel antimycotic agents active towards yeast and yeast-like microorganisms of biomedical interest*, PCT/IT2006/47783+A. Deposited date October-11, 2006.
- 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.
- ROMANI A., IERI F., TURCHETTI B., MULINACCI N., VINCIERI F.F., BUZZINI P. (2006a): *Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts*, «Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis», 41, pp. 415-420.
- YOSHIMURA M., AMAKURA Y., TOKUHARA M., YOSHIDA T. (2008): *Polyphenolic compounds isolated from the leaves of Myrtus communis*, «Journal of Natural Medicine», 62, pp. 366-368.
- YUGARANI T., TAN B.K.H., DAS N.P. (1993): *The Effects of Tannic Acid on Serum Lipid Parameters and Tissue Lipid Peroxides in the Spontaneously Hypertensive and Wistar Kyoto Rats*, «Planta Medica», 59 (1), pp. 28-31.
- ŽIVKOVIĆ J., MUJIĆ I., ZEKOVIĆ Z., VIDOVIĆ S., MUJIĆ A., JOKIĆ S. (2007): *Hydrolysable Tannins with the Hexahydroxydiphenoyl Unit and the m-Depsidic Link: HPLC-DAD-MS Identification and Model Synthesis*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 55, pp. 48-55.