

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.

MAURO ANTONGIOVANNI*, ARIANNA BUCCIONI*, SARA MINIERI*,
STEFANO RAPACCINI*

Effetti dell'estratto di tannino idrolizzabile di castagno sul bilancio azotato di pecore, suini e broiler

INTRODUZIONE

Come è noto, l'impiego di antibiotici e alcuni coccidiostatici in alimentazione animale è stato bandito nella Unione Europea.

Il gruppo di ricerca che faceva capo alla (purtroppo) ex cattedra di Nutrizione e Alimentazione animale dell'Università di Firenze ha condotto, e sta conducendo, numerose prove *in vivo* e *in vitro* su alcuni prodotti naturali che potessero fungere da valide alternative agli antibiotici (Antongiovanni et al., 2005, 2006, 2007, 2011; Perrucci et al., 2005), finché si è arrivati a testare i tannini, in particolare gli idrolizzabili estratti dal legno di castagno (Antongiovanni et al., 2011; Buccioni et al., 2011).

MATERIALI E METODI

Le prove sperimentali effettuate hanno riguardato pecore da latte di razza Massese, suini ibridi commerciali e polli broiler Ross 308, femmine. I protocolli sperimentali delle prove sono schematizzati nella tabella 1.

RISULTATI

La maniera più chiara per l'introduzione ai commenti e alla discussione dei risultati è quella di presentarli sotto forma di tabelle (tabb. 2, 3 e 4).

* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie - sez. Scienze Animali, Università di Firenze

Animali	Pecore Massesi in lattazione, 2 gruppi di 8 pecore ciascuno
Trattamenti	Tannino di castagno (20 g/capo/d) al gruppo trattato
Rilievi	Sul latte raccolto per 3 settimane: proteine, grasso, lattosio, cellule somatiche, carica batterica. Sul formaggio: proteine e grasso.
Animali	Suini ibridi commerciali, 3 gruppi di 6 suini ciascuno
Trattamenti	Tannino di castagno (0.25% e 0.5%) ai due gruppi trattati
Rilievi	Incrementi e indici di conversione su 60 giorni. Digeribilità e bilancio azotato in gabbia metabolica per una settimana a partire dal 50° giorno.
Animali	Broiler Ross 800 femmine, 5 gruppi di 35 polli ciascuno
Trattamenti	Tannino di castagno (0.15%, 0.2%, 0.25% e 0.3%) ai quattro gruppi trattati
Rilievi	Incrementi e indici di conversione su 28 giorni. Bilancio azotato in gabbia metabolica per un'altra settimana per 25 polli (5 per gruppo).

Tab. 1 Schema dei protocolli sperimentali adottati nelle tre prove

MISURE SUL LATTE					
	GRASSO %	PROTEINE %	LATTOSIO %	CELLULE SOMATICHE	CARICA BATTERICA
				1000/ml	1000 CFU/ml
CONTROLLO	7.24	4.91 b	4.71	775	2985
TRATTATE	6.61	5.39 a	4.47	1370	2743
MISURE SUL FORMAGGIO					
	grasso %	proteine %			
CONTROLLO	34.39 B	40.70 B			
TRATTATE	36.99 A	43.73 A			

Tab. 2 Risultati della prova sulle pecore

L'aspetto più evidente e statisticamente significativo ($p < 0.05$) fornito dalla prova sulle pecore è quello relativo all'aumento di circa il 10% del contenuto proteico del latte e di circa il 7% nel formaggio, in conseguenza del trattamento con tannino di castagno. L'aumento del contenuto di grasso del formaggio è probabilmente dovuto a processi fermentativi.

Per quanto riguarda la prova sui suini, a fronte della depressione, peraltro attesa, della digeribilità della frazione proteica corrispondente al trattamento con lo 0.5% di tannino, non si è registrata una diminuzione significativa della quota di azoto ritenuto, a significare una migliore utilizzazione dell'azoto assorbito.

Infine, la prova sui polli ha fornito i dati più interessanti per quanto riguarda il bilancio azotato. Come per i suini, anche in questo caso, l'indice di conversione leggermente superiore che si è registrato a partire dalla concentrazione dello 0.2% di tannino di castagno denuncia l'effetto depressivo del tannino sulla digeribilità della frazione proteica alimentare, peraltro non misurata in questo caso per ovvi motivi di conformazione anatomica

	CONTROLLO	0.25%	0.5%
digeribilità N, %	85.4 A	81.2	79.0 B
N ritenuto, g/d	37.7	37.5	36.5
incremento ponderale, g/d	897	896	823
indice di conversione	3.3	3.4	3.6

Tab. 3 *Risultati della prova su suini ibridi commerciali*

	CONTROLLO	0.15%	0.2%	0.25%	0.3%
incremento ponderale, g/28 giorni	1123	1113	1085	1081	1113
indice di conversione	1.53 b	1.62	1.65 a	1.64 a	1.63 a
consumo N, g/7 giorni	65.1	65.5	68.7	62.5	64.3
N ritenuto, %	61.6 b	64.6	67.7	70.8 a	71.5 a

Tab. 4 *Risultati della prova sui broiler Ross 308*

degli uccelli. Tale effetto è stato, però, ampiamente compensato dalla migliore ($p < 0.05$) ritenzione dell'azoto assorbito, addirittura di circa il 15% (9 punti percentuali), a partire dalla concentrazione dello 0.25% di tannino di castagno.

DISCUSSIONE

Tutte e tre le prove hanno dimostrato in maniera inequivocabile due punti fondamentali.

Da una parte la presenza di tannino idrolizzabile di castagno nella dieta degli animali, ruminanti e non, comporta una depressione della digeribilità della frazione proteica dovuta all'azione complessante del tannino nei riguardi delle proteine alimentari, cosa peraltro arcinota.

Dall'altra, in tutti i casi, si sono registrate delle differenze statisticamente significative delle quantità di azoto ritenuto. Il che vuol dire che, a parità di azoto assorbito, la quota ritenuta nei tessuti e/o nel latte è risultata maggiore, a significare che le proteine alimentari sono state, in un certo senso, "nobilitate" dalla presenza del tannino di castagno nella dieta, attraverso il miglioramento del loro valore biologico.

Non si tratta di un risultato da poco, da considerare solo dalla parte dell'animale che utilizza meglio le proteine che mangia. È un risultato importante che riguarda anche la salvaguardia dell'ambiente, specie quello attiguo ai grandi allevamenti intensivi, nel quale possono così essere riversate minori quantità di sostanze azotate inquinanti ed eutrofizzanti.

Inoltre, ci preme sottolineare anche che i tannini, e in particolare quelli idrolizzabili, esercitano un'azione di controllo e selezione della micro popolazione del digerente, soprattutto nei riguardi dei microrganismi patogeni, deprimendo in maniera significativa l'azione metabolica di deaminazione degli aminoacidi. Il risultato è un maggiore benessere animale. Si tratta di un argomento attualmente allo studio da parte del nostro gruppo che ci sta fornendo risultati molto positivi.

RIASSUNTO

Si riportano i risultati di tre prove sperimentali condotte, rispettivamente, su pecore in lattazione, suini in accrescimento e broiler, nelle quali è stato aggiunto un tannino idrolizzabile, il tannino di castagno, agli alimenti somministrati agli animali, in alternativa all'uso di antibiotici, date le note proprietà anti coccidi e clostridi dei tannini. Altrettanto noto è il loro effetto depressivo sulla digeribilità delle proteine alimentari.

Con la presente comunicazione ci si limita a riportare i risultati dello studio degli effetti della presenza di tannino di castagno nella dieta degli animali sul loro bilancio azotato. L'aspetto più importante che è scaturito da tutte e tre le prove è stato che, insieme alla attesa depressione della digeribilità proteica, il tannino di castagno ha indotto un significativo miglioramento del bilancio azotato degli animali nel senso di una migliore utilizzazione dell'azoto assorbito.

ABSTRACT

The results of three experimental trials carried out, respectively, with lactating ewes, growing pigs and broiler chickens are reported. In all cases, the feeds were added a hydrolysable tannin, chestnut tannin, as an alternative to antibiotics, due to the well-known anti-coccidia and anti-clostridia properties of tannins. Equally well-known is the depressing effect of tannins on the digestibility of proteins.

The present communication deals with the results of a study of the effects of the presence of chestnut tannin in the animals' diet upon their nitrogen balance only. The most important aspect which resulted from all the three trials is that, along with the expected depression of protein digestibility, chestnut tannin exerted a significant upgrading of the nitrogen balance of the animals, towards a better utilization of absorbed nitrogen.

RINGRAZIAMENTI

La ricerca è stata finanziata nell'ambito del Progetto PRIN (prot. n 200778k3kj).

Un particolare ringraziamento va al Gruppo Mauro Saviola per aver fornito il prodotto "Saviotan®", ovvero il tannino idrolizzabile da castagno.

BIBLIOGRAFIA

- ANTONGIOVANNI M., BUCCIONI A., PETACCHI F., MARTINI A., MINIERI S. (2005): *Effect of glycerides and free short chain fatty acids replacing avilamycin in the diet of broiler chickens*, «Proc. 15th European Symposium on Poultry Nutrition», Balatonfüred, Hungary, Sept. 25-29, pp. 260-262.
- ANTONGIOVANNI M., BUCCIONI A., MINIERI S., PETACCHI F., FUSI E., CAMPAGNOLI A., REBUCCI R. (2006): *Effect of dietary butyric glycerides on immune response of two weeks old broiler chicks*, «World's Poultry Sci. J.», XII European Conference, Sept. 10-14, 12, pp. 470-471.
- ANTONGIOVANNI M., BUCCIONI A., PETACCHI F., LEESON S., MINIERI S., MARTINI A., CECCHI A. (2007): *Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition*, «Italian J. Anim. Sci.», 6, pp. 19-27.
- ANTONGIOVANNI M., MASSI P., TOSI G., PARINI M., BUCCIONI A., TEMPESTA B., MINIERI S. (2011): *La monobutyryne: un promoteur de croissance et produit de prévention et thérapie contre les infections entériques communes des poulets de chair*, «Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole», Tours, 29-30 Mars, pp. 523-527.
- ANTONGIOVANNI M., BUCCIONI A., RAPACCINI S., MINIERI S., MELE M. (2011): *Effect of two types of tannins on the biohydrogenation steps of polyunsaturated fatty acids in the rumen: an in vitro study*, «Advanced Animal Biosciences», Proc. 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Aberystwyth (GB), Sept. 6-9, pp. 425.
- BUCCIONI A., MINIERI S., RAPACCINI S., ANTONGIOVANNI M., MELE M. (2011): *Effects of chestnut and quebracho tannins on fatty acids profile in rumen liquid and solid associated bacteria. An in vitro study*, «Animal», 5 (10), pp. 1521-1530.
- PERRUCCI S., BRAJON G., FICHI G., ROSSI G., KANG M., CORRIAS F., PIAZZA A., BUCCIONI A., PETACCHI F., TOSI G., ANTONGIOVANNI M. (2005): *Effects of dietary short chain fatty acids on experimentally induced coccidiosis and necrotic enteritis in broilers vaccinated against coccidiosis*, «Proc. IX International Coccidiosis Conference», Iguassu, Brasil, Sept. 19-23, pp. 140.

ARIANNA BUCCIONI*, MAURO ANTONGIOVANNI*, SARA MINIERI*,
STEFANO RAPACCINI*, ANTONIO PEZZATI*

Studio in vitro dell'effetto di alcuni tannini sulla bioidrogenazione ruminale degli acidi grassi insaturi

INTRODUZIONE

I tannini estratti dal castagno (*Castanea sativa* Miller), specie largamente diffusa in Italia, appartengono alla classe degli idrolizzabili (HT) e differiscono molto da quelli condensati (CT) per il loro ruolo nutrizionale. Prove *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che i CT, se introdotti nelle diete per piccoli ruminanti, possono migliorare le performance produttive, agire da antiparassitari intestinali e migliorare il bilancio energia-proteina della dieta riducendo l'escrezione azotata conseguente da un eccesso proteico della dieta, ridurre la produzione di metano ruminale attraverso la selezione dei microrganismi (Getachew et al., 2008). A questo, poi, si aggiungono gli effetti sulle bioidrogenazioni ruminali degli acidi grassi polinsaturi (Vasta et al., 2010). Al contrario, pochi sono gli studi riguardanti gli effetti degli HT e dei loro metaboliti. Negli ultimi anni sono stati fatti molti sforzi nel mettere a punto delle strategie finalizzate all'arricchimento di latte e carne proveniente dall'allevamento dei ruminanti in molecole bioattive quali l'acido Rumenico (RA), Vaccenico (VA) e Linolenico (LNA) e le strategie legate all'alimentazione animale rimangono quelle più efficaci e immediate. L'impiego dei tannini di castagno come integratore in diete destinate ai ruminanti potrebbe rappresentare una buona opportunità per modulare i processi di bioidrogenazione degli acidi grassi polinsaturi al fine di favorire il by pass ruminale di RA, LNA e VA e, conseguentemente, l'incremento di questi nel latte e nella carne.

* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie sez Scienze Animali, Università di Firenze

MATERIALE E METODI

Diete e fermentazione in vitro

Campioni di una dieta controllo (C, composta da paglia di grano, farina di estrazione di soia, farina di orzo, farina di mais, glutine e integratore minerale-vitaminico nei seguenti rapporti 30/13.2/9.6/15.2/30/2 sulla sostanza secca, SS) e di due diete ottenute addizionando a C due differenti concentrazioni di estratto di tannino di castagno (SaviotaN[®] Gruppo Mauro Saviola srl, titolo: 750g di equivalenti tannici/kg SS) TC1 (49 g/kg SS) e TC2 (82 g/kg SS) sono stati incubati con liquido ruminale ovino seguendo la metodica di Buccioni et al. (2006). I tempi scelti per il campionamento sono stati i seguenti: 6, 12, 18 h; al momento di ogni prelievo è stato misurato il pH.

Analisi sui campioni di alimento

I campioni delle diete sono stati essiccati a 60°C per 24 h in stufa ventilata e analizzati per il profilo bromatologico classico, le frazioni fibrose e proteiche secondo le metodiche AOAC (1990), Van Soest et al. (1991), Licitra (1996). La composizione chimica della dieta controllo era: SS, 897.7 g/kg; CP, 139.8 g/kg; NPN, 7.8 g/kg; SP, 26.6 g/kg; EE, 15.3 g/kg; NDF, 406.3 g/kg; ADF, 195.4 g/kg; ADL, 28.3 g/kg; ADIP, 11.2 g/kg; NDIP, 21.1 g/kg; ceneri, 63.8 g/kg; NFC, 395.9 g/kg; amido, 252.6 g/kg (dati espressi rispetto alla SS).

Frazionamento del contenuto microbico ruminale

Il frazionamento del contenuto ruminale è stato effettuato seguendo la metodica di Martin et al. (1994). La frazione microbica considerata è stata quella dei batteri associati alla fase solida (SAB) poiché costituita prevalentemente da cellulolitici, attivi nelle bioidrogenazioni; al termine del frazionamento i microrganismi sono stati liofilizzati per poi essere metilati e analizzati per la determinazione del profilo in acidi grassi mediante gascromatografia (Buccioni et al., 2006).

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati seguendo la procedura GLM del SAS (1999) usan-

AG	C _{6h}	C _{12h}	C _{18h}	TC1 _{6h}	TC1 _{12h}	TC1 _{18h}	TC2 _{6h}	TC2 _{12h}	TC2 _{18h}	e.s.m.
C15 I	0.26 ^α	0.19 ^{αβ}	0.20 ^{αβ}	0.24 ^α	0.33 ^{ββ}	0.33 ^{ββ}	0.27 ^α	0.37 ^{ββ}	0.37 ^{ββ}	0.02
C15 A	0.34 ^α	0.44 ^{αβ}	0.37 ^{αα}	0.31 ^α	0.50 ^{αβ}	0.55 ^{ββ}	0.40 ^α	0.85 ^{ββ}	0.66 ^{αγ}	0.03
C17 I	0.76 ^{αα}	0.88 ^{αβ}	0.88 ^{αβ}	0.85 ^{βαα}	0.98 ^{ββ}	0.94 ^{ββ}	0.40 ^{αα}	0.58 ^{αβ}	0.59 ^{αβ}	0.03
C17A	0.11 ^a	0.13 ^a	0.12 ^a	0.00 ^{βαα}	0.51 ^{ββ}	0.51 ^{ββ}	0.16 ^{αα}	0.22 ^{αβ}	0.16 ^{αα}	0.01

I=iso, A=anteiso; AG=acido grasso; P<0.05 a, b significatività fra diete entro tempo; α, β significatività entro dieta a tempi differenti;

Tab. 1 *Profilo degli acidi grassi ramificati presenti nei SAB a differenti tempi di fermentazione (g/100 g acidi grassi totali)*

AG	C _{6h}	C _{12h}	C _{18h}	TC1 _{6h}	TC1 _{12h}	TC1 _{18h}	TC2 _{6h}	TC2 _{12h}	TC2 _{18h}	e.s.m.
C18:2 _{c9c12}	25.2 ^α	24.1 ^{αβ}	22.5 ^{αγ}	25.4 ^α	24.5 ^{αβ}	21.9 ^{βγ}	25.2 ^α	23.5 ^{bcβ}	22.0 ^{bcγ}	0.22
C18:2 _{c9c11}	0.56 ^{αα}	0.64 ^{αβ}	0.27 ^{αγ}	0.57 ^{βαα}	0.90 ^{ββ}	0.88 ^{ββ}	0.51 ^{αα}	0.73 ^{αβ}	0.70 ^{αβ}	0.01
C18:3 _{c9c12c15}	2.37 ^{αα}	1.40 ^{αβ}	1.13 ^{αγ}	2.20 ^{βαα}	1.15 ^{ββ}	1.17 ^{αβ}	2.75 ^{αα}	1.80 ^{αβ}	1.73 ^{ββ}	0.03
C18:3 _{c9c11c15}	0.55 ^{αα}	0.63 ^{αα}	0.26 ^{αβ}	0.40 ^{βαα}	0.40 ^{βαα}	0.57 ^{ββ}	0.52 ^{ααα}	0.53 ^{αα}	0.70 ^{αβ}	0.04
C18:1 _{c11}	2.02 ^{αα}	3.03 ^{αβ}	3.45 ^{αγ}	2.14 ^{βαα}	5.62 ^{ββ}	5.58 ^{ββ}	3.94 ^{αα}	4.13 ^{αβ}	4.14 ^{αβ}	0.02
C18:1 _{c9}	18.4 ^{αα}	14.1 ^{αβ}	14.2 ^{αβ}	17.6 ^{βαα}	14.6 ^{ββ}	14.9 ^{ββ}	18.9 ^{αα}	17.7 ^{αβ}	17.7 ^{αβ}	0.20
C18:0	14.9 ^{αα}	18.7 ^{αβ}	21.8 ^{αγ}	14.3 ^{βαα}	16.7 ^{ββ}	16.7 ^{ββ}	14.2 ^{βαα}	15.2 ^{αβ}	15.3 ^{αβ}	0.11

P<0.05 a, b, c significatività fra diete entro tempo; α, β, γ significatività entro dieta a tempi differenti

Tab. 2 *Contenuto in LA, LNA e dei loro intermedi di bioidrogenazione presenti nei SAB a differenti tempi di fermentazione (g/100 g acidi grassi totali)*

do il seguente modello lineare a due fattori di interazione: dieta e tempo di fermentazione.

$$y_{ij} = \mu + D_i + T_j + D_i \cdot T_j + e_{ij}$$

dove y_{ij} è l'osservazione; μ è la media; D_i la dieta ($i = 1$ to 5); T_j tempo di fermentazione ($j = 1$ to 3); $D_i \cdot T_j$ interazione fra la dieta e il tempo di fermentazione e e_{ij} l'errore residuo. Il livello di significatività è stato fissato per $P < 0.05$.

RISULTATI

Il profilo degli acidi grassi ramificati e di quelli relativi agli intermedi derivanti dalla bioidrogenazione dell'acido Linoleico (LA) e LNA nei SAB sono riportati in tabella 1 e 2.

DISCUSSIONE

Le percentuali di tannino impiegate nelle diete fermentate non hanno va-

riato il pH del liquido ruminale tamponato che è rimasto intorno a valori di 6.74 ± 0.2 . Dalla letteratura si evince che vi sono meno informazioni sulle modalità di interazione tra i tannini e le cellule batteriche rispetto a quelle che riguardano la complessazione delle proteine alimentari da parte di queste molecole polifenoliche. Sicuramente il valore di pH gioca un ruolo importante nell'interazione tannino – microrganismo perché alcune attività batteriche possono subire modificazioni a seguito delle variazioni nell'ambiente ruminale legate a tale parametro (Min et al., 2003). In particolare, i complessi tannino-proteina si formano intorno a pH neutro valore che è assai vicino a quello ottimale perché avvenga correttamente la bioidrogenazione ruminale dell'LA e LNA con la massima produzione di RA. La crescita costante della concentrazione di isoacidi, con particolare riferimento all'iso C17:0 che rimane costantemente più elevato rispetto all'isomero anteiso, è indice di una buona crescita della frazione microbica cellulosolitica. Considerando che la concentrazione di questi acidi grassi nel fermentato contenente l'estratto di tannino di castagno è maggiore rispetto al controllo pone l'attenzione sul fatto che questo integratore polifenolico non implica una particolare sofferenza dei microrganismi i quali al contrario sembrano crescere a ritmi costanti. Prendendo in considerazione gli effetti sulla bioidrogenazione degli acidi LA e LNA (tab. 2) è possibile notare che la presenza dell'estratto tannico di castagno non induce un rallentamento dell'attività della linoleico e linolenico isomerasi e che pertanto dall'LA e LNA i microrganismi producono rispettivamente RA e acido linolenico coniugato (CALNA); infatti, la concentrazione di questi acidi grassi non differisce tra le diete ma si può notare solo una tendenza alla diminuzione per il contenuto di LA e LNA nel fermentato contenente i tannini di castagno. Al contrario, sia il VA che l'RA si accumulano maggiormente con le diete contenenti tannini rispetto a al fermentato relativo alla dieta C. Ciò potrebbe trovare una spiegazione prendendo in considerazione una selezione della flora microbica con particolare riferimento alla diminuzione dei batteri responsabili della riduzione da VA ad acido stearico (SA) descritti in lavori pubblicati recentemente che hanno individuato nel *Butyrivibrio proteoclasticum* il principale microrganismo sensibile alla presenza di sostanze polifenoliche nel liquido ruminale (Vasta et al., 2010). L'accumulo di VA, a sua volta, può aver indotto per feed-back negativo un incremento nella produzione di RA come conseguente diminuzione della velocità di bioidrogenazione. Il fatto che la riduzione del doppio legame in cis9 non venga bloccata dalla presenza dei tannini nella dieta ma solo rallentata è confermata anche dalla riduzione dell'acido oleico (OA, cis9 C18:1).

CONCLUSIONI

I tannini di castagno rappresentano una buona opportunità per modulare le bioidrogenazioni ruminali favorendo l'accumulo di RA e VA, senza turbare l'equilibrio microbico come accade per altre specie di tannino molto più aggressive sulla flora microbica.

RIASSUNTO

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare gli effetti del tannino estratto dal castagno sulle vie di bioidrogenazione che conducono alla formazione dell'acido linoleico coniugato e dell'acido vaccenico nonché monitorare la produzione di acidi grassi ramificati, markers delle attività microbiche ruminali. Campioni di una dieta contenenti due differenti livelli di tannino di castagno sono stati messi a confronto in una prova *in vitro*. Le vie di bioidrogenazione degli acidi C18:2 cis9, cis12 and C18:3 cis9, cis12, cis15 sono state influenzate dalla presenza del tannino di castagno favorendo l'accumulo del C18:1 trans11, durante la fermentazione.

ABSTRACT

The aim of the present trial was to study the effects of tannins extracted from chestnut on the biohydrogenation pathway of conjugated linoleic and vaccenic acids and to monitor the branched chain fatty acid profile as rumen microbial markers. Samples of two diets integrated with two different levels of chestnut tannins were compared in an *in vitro* trial. The biohydrogenation pathway of C18:2 cis9, cis12 and C18:3 cis9, cis12, cis15 was affected by the presence of chestnut tannins in the diets, favouring the accumulation of C18:1 trans11 during rumen fermentation.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1990): *Official Methods of Analysis*, 1/2 vol., 15th edition, AOAC, Arlington, VA, USA.
- BUCCIONI A., ANTONGIOVANNI M., PETACCHI F., MELE M., SERRA A., SECCHIARI P., BENVENUTI D. (2006): *Effect of dietary fat quality on C18:1 fatty acids and conjugated linoleic acid production: an in vitro rumen fermentation study*, «Anim. Feed Sci. Technol.», 127, pp. 268-282.
- GETACHEW G., PITTOFF W., PUTNAM D.H., DANDEKAR A., GOYAL S., DEPETERS E.J. (2008): *The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis*, «Anim. Feed Sci and Technol.», 140, pp. 444-416.

- LICITRA G. (1996): *Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feed*, «Anim. FeedSci.Technol.», 57, pp. 347-358.
- MARTIN C., WILLIAMS A.G., MICHALET-DOREAU B. (1994): *Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents*, «J. Anim. Sci.», 72, pp. 2962-2968.
- MIN B.R., BARRY T.N., ATTWOOD G.T., McNABB W.C. (2003): *The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review*, «Anim. Feed Sci. and Technol.», 106, pp. 3-19.
- SAS USER'S GUIDE (1999): Statistics, Version 8.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B., LEWIS B.A. (1991): *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition*, «J. Dary Sci.», 74, pp. 3583-3597.
- VASTA V., YÁÑEZ-RUIZ D.R., MELE M., SERRA A., LUCIANO G., LANZA M., BIONDI L., PRIOLO A. (2010): *Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumens of sheep fed a diet containing added tannins*, «Appl. Env. Microbiol», in proof (vol. 76, No 8, doi:10.1128/AEM 02583-09).

ANNA NUDDA*, GIANNI BATTACONE*, MAURO DECANDIA**,
MARIA SITZIA**, GIUSEPPE PULINA*

Effetto della somministrazione di tannini sulle prestazioni produttive e sui parametri ruminali di pecore al pascolo

INTRODUZIONE

L'alimentazione degli ovini da latte allevati nelle aree mediterranee si basa prevalentemente sul pascolamento di essenze foraggere la cui qualità è altamente variabile in funzione della stagione e della famiglia botanica di appartenenza. In particolare, nel periodo primaverile le erbe da pascolo, soprattutto quelle a prevalenza di leguminose, sono caratterizzate da una alta concentrazione di composti azotati solubili. In questa stagione, grazie alla elevata disponibilità foraggera, gli allevatori tendono a ridurre le integrazioni di concentrati, con conseguente forte sbilanciamento nel rapporto fra di azoto e carboidrati solubili (CS) ingeriti dagli animali (Cannas, 2004). In queste condizioni, l'inclusione di tannini nella dieta potrebbe influenzare positivamente l'efficienza della fermentazione ruminale, con rilevanti effetti positivi sullo stato nutrizionale dei pascolanti (Min et al., 2003). Nei ruminanti al pascolo, infatti, l'inclusione di tannini condensati nella razione ha comportato la riduzione della degradazione proteica ruminale e ha aumentato il flusso di proteina nell'intestino (Waghorn, 1990).

Poiché lo sbilanciamento del rapporto N/CS è uno dei problemi alimentari primaverili più diffusi nell'allevamento ovino da latte con alimentazione al pascolo, con questa prova si sono voluti testare gli effetti dell'aggiunta di differenti concentrazioni di tannini di castagno nel concentrato sulle prestazioni produttive e sulla funzionalità ruminale degli animali.

* Dipartimento di Agraria, sezione di Scienze Zootecniche, Università di Sassari

** AGRIS Sardegna, Dipartimento di Produzioni Animali

MATERIALI E METODI

Animali e trattamenti

Sono state utilizzate 36 pecore di razza Sarda in fase intermedia di lattazione (90-120 giorni di mungitura, DIM), suddivise in 3 gruppi di 12 animali ciascuno. Le pecore erano mantenute su pascolo costituito da 76% di *Medicago polymorpha* L., 20% di *Lolium multiflorum* L. e 4% di altre essenze. Agli animali sono stati somministrati 300 g/d di fieno di erba medica e una integrazione di mangime commerciale (87,1% SS; sulla SS, PG 17,6%, NDF 29,4%), contenente differenti concentrazioni di estratto di tannino di castagno (SaviotaN[®] Gruppo Mauro Saviola srl; titolo: 750g di equivalenti tannici/kg SS), secondo lo schema: T0 (gruppo controllo senza tannini), T1 e T2 mangime al 6% e al 12% di tannini sulla SS, rispettivamente. Al fine di rendere le razioni isoenergetiche e isoproteiche, le dosi di concentrato somministrate sono state di 260, 280 e 300g/capo/giorno per i gruppi T0, T1 e T2, rispettivamente. La prova ha avuto una durata complessiva di 8 settimane, di cui 2 di adattamento al concentrato tannico e 6 settimane di rilievi sperimentali.

Rilievi e determinazioni analitiche

Con frequenza settimanale, sono state misurate la produzione individuale di latte da cui sono stati prelevati i campioni per determinarne i contenuti in grasso, in proteine totali, in urea e in cellule somatiche (CCS). È stato prelevato il liquido ruminale con sonda esofagea a inizio, metà e fine prova per determinarne il pH e i contenuti in AGV (acetico, proprionico e butirrico), in NH₃ e in acidi grassi.

Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza che include l'effetto fisso del gruppo, del rilievo e la loro interazione. Il livello di significatività è stato fissato per $P \leq 0,05$; i valori con $P \leq 0,10$ sono stati considerati tendenzialmente significativi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'inclusione di tannino di castagno nell'alimentazione delle pecore (tab. 1) non ha modificato la produzione di latte e i contenuti in grasso e proteine,

PARAMETRI	T0	T1	T2
Produzione di latte, g/d	1311	1316	1303
Grasso, %	5,6	5,4	5,5
Proteine, %	5,14	5,07	5,08
Lattosio, %	4,62 ^e	4,67 ^{ed}	4,71 ^d
Urea, mg/dl	51,1	51,6	52,6
CCS, log10 (*1000/ml)	3,03 ^A	2,67 ^B	2,73 ^B

Tab. 1 *Produzione e composizione del latte in pecore alimentate con differenti dosi di tannini di castagno*

	T0	T1	T2
pH	6,22 ^e	6,34 ^d	6,27 ^{ed}
Acetico, % degli AGV	61,7 ^A	59,4 ^B	62,6 ^A
Propionico, % degli AGV	22,0	21,9	21,1
Butirrico, % degli AGV	16,2 ^a	18,8 ^b	16,3 ^a
Ammoniaca, mg/L	2,41 ^a	2,12 ^{ab}	1,91 ^b
C18:2 n6, % dei FA	4,5 ^A	4,8 ^{AB}	5,5 ^B
C18:3 n3, % dei FA	2,3 ^e	2,9 ^d	2,9 ^d
C18:1 trans11	4,39	4,36	4,71
CLA c9t11	0,19	0,13	0,06

¹ T0 = 0%, T1 = 6%, T2 = 12 % di tannini di castagno commerciale; A,B, P≤0.01; a,b, P≤0.05; e,d, P≤0.1.

Tab. 2 *Parametri del liquido ruminale di pecore alimentate con differenti dosi di tannini di castagno*

che sono diminuiti linearmente in tutti i gruppi sperimentali con il procedere della prova, come atteso. Contrariamente all'ipotesi sperimentale, il contenuto di urea nel latte non è stato ridotto dalla inclusione dei tannini, nonostante la concentrazione ruminale di NH₃ si sia tendenzialmente e linearmente ridotta (tab. 2). Il CCS è diminuito nei gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo a conferma di un effetto analogo precedentemente osservato da Min et al. (2005) nel latte di capre al pascolo su essenze ricche in tannini.

L'inclusione dei tannini nella razione ha comportato, a livello ruminale, una riduzione dell'acido acetico e un aumento del butirrico nel gruppo T1 (tab. 2) e un tendenziale aumento degli acidi Linoleico (LA) e acido alfa-linolenico (LNA) nei gruppi trattati indipendentemente dalla dose: quest'ultimo risultato potrebbe derivare dal rallentamento dei processi di bioidrogenazione ruminale, cui dovrebbe conseguire un accumulo sia dell'acido vaccenico (C18:1 trans11) che del c9, t11 CLA.

CONCLUSIONI

I risultati della prova mostrano che la somministrazione di 270-300 g/capo d⁻¹ di concentrato, arricchito con tannini di castagno al 6% oppure al 12% sulla SS, non altera la quantità e la qualità di latte prodotta da pecore condotte su pascolo primaverile ricco in leguminose. Un interessante effetto positivo è stato tuttavia trovato per il contenuto in cellule somatiche nel latte e per la concentrazione di NH₃ nel liquido ruminale.

RIASSUNTO

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare gli effetti della supplementazione di tannino estratto dal castagno sulla produzione e sulla qualità del latte e sui parametri di fermentazione ruminale in pecore al pascolo. Sono state testate 3 differenti dosi di tannino di castagno (0, 6 e 12% sulla SS del concentrato) su 3 gruppi di 12 animali ciascuno. L'inclusione dei tannini non ha modificato la produzione di latte e i contenuti in grasso, proteine e urea ma ha determinato la riduzione del contenuto in cellule somatiche. L'inclusione dei tannini ha comportato la riduzione della produzione di NH₃ nel rumine e un rallentamento dei processi di bioidrogenazione ruminale, favorendo l'accumulo dell'acido linoleico e linolenico.

ABSTRACT

Aim of this work was to study the effects of chestnut tannin on milk production traits and rumen fluid parameters in Sarda dairy sheep grazing on pasture. Three different doses of tannin were tested (0, 6 and 12% on concentrate DM basis) on 3 groups (12 animals for each group). The inclusion of tannins did not modify milk production and fat, protein and urea contents, whereas interestingly reduced the somatic cell count. The inclusion of tannins decreased the production of NH₃ in the rumen and slowdown the rumen biohydrogenation processes, favouring the rumen accumulation of linoleic acid and linolenic acid.

BIBLIOGRAFIA

- CANNAS A. (2004): *Feeding of lactating ewes*, in *Dairy Sheep Nutrition*, G. Pulina ed., CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 79-108.
- MIN B.R., BARRY T.N., ATTWOOD G.T., McNABB W.C. (2003): *The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review*, «Animal Feed Science and Technology», 106, pp. 3-19.

WAGHORN G.C. (1990): *Effect of condensed tannin on protein digestion and nutritive value of fresh herbage*, «Proceedings of the Australian Society of Animal Production», 18, pp. 412-415.

MARCELLO MELE*, ARIANNA BUCCIONI**, ANDREA SERRA*,
STEFANO RAPACCINI**, LUIGI MARENCHINO***,
MAURO ANTONGIOVANNI**, PIERLORENZO SECCHIARI*

Modificazione del profilo lipidico del latte ovino per effetto del tannino di castagno nella dieta

INTRODUZIONE

Nell'allevamento ovino l'impiego del pascolo come fonte foraggiera è uno dei punti fondamentali che caratterizzano tale sistema di allevamento. L'introduzione del foraggio fresco nella dieta dei ruminanti ha il vantaggio di consentire l'arricchimento in acidi grassi polinsaturi (PUFA) della frazione lipidica del latte; per tale motivo la concentrazione di PUFA nel latte ovino è di norma più elevata rispetto a quella del latte bovino o caprino, dove l'uso del pascolo è meno frequente. Il principale acido grasso dell'erba fresca è l'acido alfa-linolenico (C18:3 cis9 cis 12 cis 15; LNA) che nel rumine viene normalmente bioidrogenato ad acido vaccenico (C18:1 trans11; VA) e, come ultimo step, completamente saturato ad acido stearico (C18:0; SA). In letteratura si riporta che i polifenoli hanno la capacità di modulare le bioidrogenazioni (BH) degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) favorendo l'incremento di questi ultimi nel latte o nella carne (Vasta et al., 2010; Buccioni et al., 2012). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto una strategia nutrizionale basata sul pascolamento e sull'utilizzo dei tannini di castagno, che favorisca l'aumento dei PUFA nel grasso del latte, migliorando la qualità nutrizionale di quest'ultimo e, conseguentemente, dei prodotti caseari da esso derivanti. Poiché l'inclusione di foraggio fresco nella dieta, specialmente se derivante da pascolo giovane, porta con sé alcune problematiche quali l'innalzamento del contenuto in cellule somatiche e l'aumento di concentrazione di urea ematica,

* Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agro-Ecosistema, sez. Scienze Zootecniche, Università di Pisa

** Dipartimento di Biotecnologie Agrarie sez. Scienze Animali, Università di Firenze

*** Gruppo Mauro Saviola srl

si è voluto inoltre verificare se l'impiego del tannino di castagno poteva contemporaneamente migliorare il benessere animale come conseguenza di un miglior bilanciamento delle componenti energetiche e proteiche della dieta.

MATERIALE E METODI

Novantasei pecore di razza sarda, omogenee per peso, età, ordine di parto e stadio di lattazione, sono state divise in due gruppi: gruppo controllo (C) e gruppo trattato (T). Entrambe erano alimentate sul medesimo pascolo composto da avena, loietto e trifoglio bianco, ma, al momento della mungitura, ricevevano rispettivamente 500g/c/die di un concentrato contenente (dieta T) o meno (dieta C) estratto di tannino di Castagno (SaviotaN, ® Gruppo Mauro Saviola srl, titolo: 750g di equivalenti tannici/kg SS; 8% sulla ss del concentrato). Le diete erano isoproteiche e iso energetiche. Campioni dei due concentrati sono stati essiccati a 60°C per 24 h in stufa ventilata e analizzati per il profilo bromatologico classico, le frazioni fibrose e proteiche secondo le metodiche AOAC (1990), Van Soest et al. (1991). I campioni di latte massale relativi a ciascun gruppo, prelevati tre volte a settimana per una durata di due mesi, sono stati analizzati per le principali caratteristiche chimico fisiche (grasso, proteina, cellule somatiche e urea) e per il profilo in acidi grassi (Mele et al., 2006). Le prime due settimane sono state di adattamento e le successive 5 settimane sono state considerate come sperimentali.

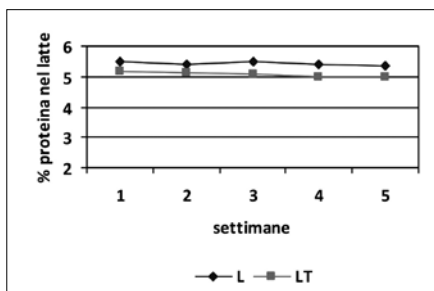
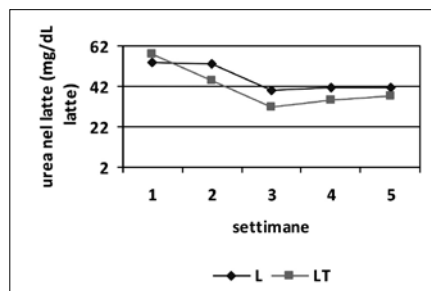
Analisi statistica

I dati sono stati analizzati seguendo la procedura GLM del SAS (1999) usando il seguente modello lineare a due fattori di interazione: dieta e tempo di fermentazione.

$$y_{ij} = \mu + D_i + T_j + D_i \cdot T_j + e_{ij}$$

dove y_{ij} è l'osservazione; μ è la media; D_i la dieta ($i = 1$ to 2); T_j tempo di campionamento ($j = 1$ a 15); $D_i \cdot T_j$ interazione fra la dieta e il tempo di campionamento e e_{ij} l'errore residuo. Il livello di significatività è stato fissato per $P < 0.05$.

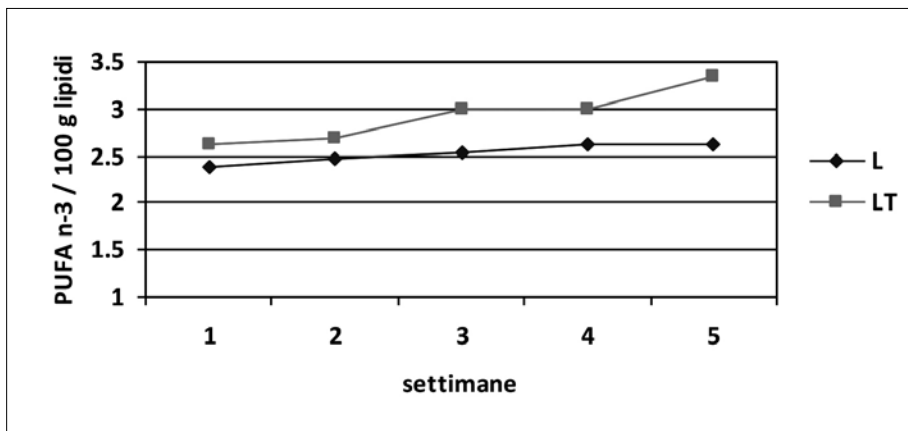
	GRUPPO C	GRUPPO T	E.S.	P
Produzione di latte (Kg/capo/die)	0,99	0,98	0,01	ns
Grasso (g/100g latte)	5,8	5,78	0,02	ns
Proteina (g/100g latte)	5,46	5,1	0,02	<0.001
Caseina (g/100g latte)	4,27	4,19	0,05	ns
Urea (mg/dl latte)	44,7	37,89	0,52	<0.001
LOG 10 SCC(x1000)	3,27	2,92	0,01	0.001

Tab. 1 *Produzione giornaliera e caratteristiche chimico-fisiche del latte*Graf. 1 *Variazione dell'urea nel latte*Graf. 2 *Variazione della proteina del latte*

RISULTATI

L'inclusione del tannino di castagno nella dieta degli ovini da latte ha indotto una riduzione del contenuto di urea del latte (-15%) (graf. 1). Il controllo di tale parametro è particolarmente importante sia per la prevenzione di dismetabolie sia per l'ottimizzazione dell'utilizzo dell'energia metabolica degli alimenti. Il gruppo alimentato con la dieta integrata con l'estratto tannico ha prodotto un latte caratterizzato da una minor percentuale di proteina (-6%), come descritto nel grafico 2. D'altra parte il contenuto di caseina nel latte dei due gruppi sperimentali non è risultato differente, evidenziando che il minor contenuto in proteina grezza del latte del gruppo T è probabilmente dovuto a un minor contenuto di azoto non proteico e/o di siero proteico.

Dopo una settimana di trattamento con il tannino di castagno il numero di casi legati a forti manifestazioni di diarrea si è dimezzato (-50%) per scomparire del tutto dopo la terza settimana. Ciò ha indotto una forte diminuzione del contenuto in cellule somatiche (SCC). Le produzioni sono rimaste costanti e simili in entrambi i gruppi. In tabella 1 vengono riportati dati relativi alla produzione e alla composizione chimica del latte relativo ai due gruppi di alimentazione. Per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi



Graf. 3 *Variazione del contenuto in acidi grassi polinsaturi del latte*

polinsaturi, l'analisi del grasso ha mostrato come la presenza dell'estratto di tannino di castagno abbia protetto i PUFA dalla bioidrogenazione (graf. 3). In particolare, si è verificato un aumento di PUFA omega-3.

DISCUSSIONE

La presenza del tannino di castagno nella dieta ha permesso un miglior bilanciamento della componente proteica in eccesso rispetto a quella energetica, squilibrio tipicamente dovuto al pascolamento su erba giovane. Il tannino, infatti, complessa una parte della proteina alimentare attraverso la formazione di un legame che coinvolge l'ossidrilico della molecola polifenolica e il carbossile del legame peptidico della proteina. In questo modo la proteina eccedente viene protetta dalla degradazione microbica, riducendo di fatto la produzione di urea conseguente all'eccesso di ammoniaca che deriva dalla proteolisi microbica. Poiché il complesso tannino-proteina è reversibile a pH acido, quale quello abomasale, la proteina viene resa disponibile all'animale ospite in fase post ruminale (Min et al., 2003). Per quanto riguarda la riduzione del contenuto in proteina esso è relativo alla componente delle siero proteine, probabilmente a causa del ridotto assorbimento di qualche amminoacido limitante nella sintesi endomammaria di queste proteine. Il fatto che la componente caseinica non abbia avuto flessioni ha un importante rilievo in termini di caseificazione, in quanto il latte viene utilizzato per la produzione di formaggio e non destinato al consumo diretto. I tannini di castagno hanno protetto gli acidi grassi polinsaturi dalla bioidrogenazione. Dalla letteratura

scientifica è noto che le sostanze polifenoliche sono in grado di indurre delle variazioni nei rapporti fra i ceppi microbici che sono i principali responsabili delle idrogenazioni dei doppi legami presenti sulla catena carboniosa degli acidi grassi che, se insaturi, sono tossici per i batteri ruminanti (Vasta et al., 2010; Buccioni et al., 2012). Il maggior apporto di PUFA omega-3 al tessuto mammario ha permesso di aumentare la percentuale di questi acidi grassi nel latte. L'inclusione di foraggio fresco nelle diete per ruminanti favorisce di per se un maggior apporto di PUFA nel latte ma la presenza del tannino di castagno ha rafforzato questo effetto.

CONCLUSIONI

L'inclusione dei tannini di Castagno nella dieta per ovini al pascolo può rappresentare una buona strategia per ottimizzare gli effetti dovuti all'inclusione di foraggio fresco nell'alimentazione, migliorando la qualità della frazione lipidica del latte e favorendo il benessere dell'animale.

RIASSUNTO

L'alimentazione delle pecore è caratterizzata dalla presenza del foraggio fresco derivante dal pascolamento, frequente nell'allevamento estensivo e obbligatorio in quello biologico. L'impiego di questa tecnica, nel caso dei ruminanti, ha degli importanti riflessi sulla qualità dei prodotti (maggiore contenuto in acidi grassi polinsaturi, acido linoleico coniugato e vitamina A), ma è accompagnato da effetti negativi inerenti il contenuto in urea e cellule somatiche con conseguente peggioramento dello stato di salute dell'animale legato all'eccesso proteico della dieta. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare gli effetti dell'introduzione del tannino di castagno nella dieta di ovini alimentati al pascolo come unica fonte foraggiera.

ABSTRACT

Grazing is a peculiar characteristic of extensive dairy ewe systems, mainly in organic production. Continue grazing positively affects the nutritional characteristics of dairy products (more polyunsaturated fatty acids, conjugated linoleic acid and vitamin A), but negative effects on milk urea content, somatic cell count and health status of ewes have been also reported, as a consequence of the excess of soluble protein in the diet. The aim of the research was to investigate the effect of chestnut tannins in the diet of grazing dairy ewe on milk yield and composition.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1990): *Official Methods of Analysis*, 1/2 vol., 15th edition, AOAC, Arlington, VA, USA.
- BUCCIONI A., DECANDIA M., MINIERI S., MOLLE G., CABIDDU A. (2012): *Lipid Metabolism in the rumen: new insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors*, «Anim. Feed sci and technol», In press.
- GETACHEW G., PITTROFF W., PUTNAM D.H., DANDEKAR A., GOYAL S., DEPETERS E.J. (2008): *The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis*, «Anim. Feed Sci and Technol.», 140, pp. 444-416.
- MELE M., BUCCIONI A., PETACCHI F., SERRA A., BANNI S., ANTONGIOVANNI M., SECCHIARI P. (2006): *Effect of forage/concentrate ratio and soy bean oil supplementation on milk yield and composition from Sarda ewes*, «Anim. Res.», 55, pp. 273-285.
- MIN B.R., BARRY T.N., ATTWOOD G.T., McNABB W.C. (2003): *The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review*, «Anim. Feed Sci. and Technol.», 106, pp. 3-19.
- SAS USER'S GUIDE (1999): Statistics, Version 8.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B., LEWIS B.A. (1991): *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition*, «J. Dary Sci.», 74, pp. 3583-3597.
- VASTA V., YÁÑEZ-RUIZ D.R., MELE M., SERRA A., LUCIANO G., LANZA M., BIONDI L., PRIOLO A. (2010): *Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumens of sheep fed a diet containing added tannins*, «Appl. Env. Microbiol.», in proof (vol. 76, No 8, doi:10.1128/AEM 02583-09).

Le opportunità di impiego dei tannini di castagno a livello agronomico. Interazioni con azoto, fosforo e ferro

INTRODUZIONE

I tannini naturali di origine vegetale, estratti da Castagno (*Castanea sativa* Mill.), sono l'oggetto della presente comunicazione. Il quadro di riferimento è quello agronomico e, in particolare, lo studio sperimentale di tali prodotti a livello delle interazioni con alcune delle principali colture agrarie. Il tutto in rapporto a pratiche agronomiche che riguardano, essenzialmente, la nutrizione vegetale e il loro possibile effetto biostimolante.

Secondo Bate-Smith e Swain (2003), i tannini sono «sostanze fenoliche solubili in acqua, con un peso molecolare compreso tra 500 e 3.000, e che, oltre alla normale reattività dei fenoli, posseggono la capacità di precipitare alcaloidi (solfato di cinconina), gelatina e altre proteine».

Tra le varie categorie di tannini, quelli presenti nel Castagno, in base alla classificazione strutturale proposta da Freudenberg (ibid.), sono del tipo "idrolizzabile" per cui, se trattati con acidi o basi o enzimi idrolitici (tannasi), danno luogo a zuccheri e acidi fenolici. I tannini idrolizzabili, commercialmente definiti anche acido tannico, sono una miscela di gallotannini, la cui composizione varia a seconda del materiale usato per l'estrazione e che, per blanda idrolisi, sia per via chimica che enzimatica, danno prevalentemente glucosio e acido gallico.

La proprietà tipica dei tannini vegetali, che li contraddistingue dalle altre sostanze polifenoliche, è la loro capacità di combinarsi con proteine e altri polimeri naturali, quali pectine e cellulosa. Da ciò deriva anche la loro attività inibitoria nei confronti di molti enzimi (Hagerman, 2002). Peraltro, Benoit et

* Università di Pisa

al. (1968) hanno verificato che «il principale effetto dei tannini sullo sviluppo microbico non è quello di determinare tossicità, perché la decomposizione di composti a basso peso molecolare come amminoacidi e zuccheri (associati ai tannini nel prodotto grezzo, cioè non purificato), non è influenzata in modo apprezzabile dai tannini».

Grazie alla presenza della frazione di non-tannini e alla struttura chimica dei tannini, i prodotti in oggetto formano facilmente complessi con numerosi ioni polivalenti, e in particolare con il ferro (South e Miller, 1998; Rao e Gianfreda, 2000). Questa caratteristica assume un interesse non trascurabile in campo agronomico, tanto che Huang J. L. et al. (1999) hanno impiegato il tannino di *Larix spp.* per preparare complessi solubili con ferro, manganese e zinco. Tali complessi sono stati studiati come fertilizzanti micronutritivi per melo e *Ginkgo spp.*, ottenendo risultati di evidente interesse applicativo.

I primi studi di laboratorio sull'effetto inibente dei tannini purificati, sia di castagno che di mimosa, a carico della nitrificazione di solfato ammonico aggiunto a un terreno agrario, sono di Basaraba (1964). Le ricerche in oggetto, hanno dimostrato che entrambi ritardano la nitrificazione del 20-30% già a concentrazioni dello 0,5-1,0% di tannino nelle prime due settimane dall'applicazione e che l'effetto si protrae per 12 settimane. Circa le cause dell'effetto osservato, l'A. rileva che la riduzione del tasso di nitrificazione «non significa necessariamente che i tannini siano tossici per i batteri nitrificanti di per sé». In proposito, cita White (1956), che, in precedenza, aveva ipotizzato come l'effetto fosse legato alla capacità dei tannini di combinarsi chimicamente con gli enzimi extracellulari dei microrganismi. Basaraba suggerisce anche che la riduzione di azoto ammoniacale libero nel suolo, dopo l'aggiunta di tannini, sia legata alla sua immobilizzazione da parte di microrganismi eterotrofi che attaccano sostanze ricche di carbonio (zuccheri, acidi, ecc.), normalmente presenti nei tannini commerciali.

In uno studio a carattere agro-ambientale, incentrato sui tannini di pioppo, Fierer et al. (2001) osservano che il meccanismo d'inibizione della nitrificazione non è al momento chiaro, anche se documentate ricerche hanno dimostrato che i tannini sono in grado di ridurre l'attività microbica attraverso un effetto d'inibizione diretta (Scalbert, 1991; Field e Lettiga, 1992), formazione di complessi con gli enzimi extracellulari (Benoit e Starkey, 1968; Scalbert, 1991) e con i substrati proteici (Swain, 1979; Bradley et al., 2000). Le conclusioni a cui giungono sono che i tannini di piccole dimensioni (tetrameri e molecole più piccole) hanno un forte effetto biologico diretto in quanto agiscono più spesso come substrati o, in qualche caso, come tossine. Le frazioni di maggior peso molecolare, per contro, hanno principalmente

effetti biochimici, potendo complessare i substrati presenti nel suolo. Tutte le frazioni, comunque, influenzano la disponibilità di azoto.

Per quanto attiene all'attività anti-ureasica, Gianfreda et al. (1995) hanno trovato che il cosiddetto "acido tannico" (gallotannini) inibisce fortemente l'attività ureasica (la costante d'inibizione è $K_i = 0,040$ mM). Alla concentrazione di 0,1 mM l'attività ureasica, nelle prove di cui viene dato conto, si riduce del 72,4%. La dipendenza dei parametri cinetici (V_{max} e K_m) dalla concentrazione di "acido tannico" suggerisce la presenza di un meccanismo puro d'inibizione non competitiva. Si formano complessi solubili e non solubili tannato-ureasi sia aumentando i tempi di contatto che il rapporto "acido tannico"/ureasi. Il meccanismo è legato alla formazione di legami reversibili e irreversibili col substrato, che si realizzano immediatamente dopo il contatto. La successiva polimerizzazione ossidativa dei tannini, evidenziata dal loro imbrunimento, aumenta ulteriormente il grado di complessazione, rendendo le molecole enzimatiche sempre meno accessibili.

SINTESI DELL'ATTIVITÀ SVOLTA PRESSO IL DAGA-UNIVERSITÀ DI PISA

In riferimento a quanto sopra, l'attività agronomica svolta dal 2001 sui tannini di castagno di Nuova Rivart, estratti in acqua e concentrati con tecnologie a membrana, ha riguardato tutta una serie di effetti che tali prodotti sono in grado di espletare.

A livello di laboratorio, in camera di crescita, lo studio si è inizialmente orientato all'individuazione della prima dose utile in grado di dar luogo a significativi effetti su semi di *Triticum vulgare* L. e *Avena sativa* L. allevati in capsule Petri su carta bibula. Rispetto al testimone, già a 2,5 - 5 ppm di tannini le plantule hanno fatto segnare un differente tasso di sviluppo. In particolare ha colpito il marcato stimolo rizogeno a livello di capillizio radicale, cui ha corrisposto un epicotile più verde e sviluppato.

Passando al terreno, stante il pH acido del prodotto, è stato impostato uno specifico studio volto alla correzione di terreni alcalini, in riferimento alla banda prossima alla fila di semina/trapianto. Gran parte di questa attività si è svolta su tabacco Virginia Bright, coltura che notoriamente si avvantaggia di condizioni di terreno sabbioso e sub-acido. In parallelo, sempre su tabacco, si è studiato l'impiego dell'azadirachtina, quale agente nematocida-nematostatico. Tale insetticida, di origine naturale, estrinseca e mantiene la sua efficacia purché veicolato in acqua con pH compresi tra 6 e 6,5. Le prove hanno interessato, nel tempo, vari ambienti del nord e centro Italia e hanno riguardato

la simultanea applicazione, in microirrigazione, di questo prodotto e tannino di castagno, allo scopo di mantenere il pH dell'acqua sui valori in precedenza indicati. Rispetto ai testimoni, senza correzione del pH o con acqua corretta con acido citrico, l'effetto è risultato significativamente migliore, nel senso che le piante trattate con tannino hanno fatto segnare sempre un superiore tasso iniziale di crescita, indipendentemente dalla presenza o meno di nematodi (*Meloidogyne spp.*). Durante le analisi nematologiche sugli apparati radicali è stato verificato che il capillizio risultava molto più sviluppato in corrispondenza dell'uso del tannino nell'acqua irrigua e che il trattamento dava luogo a un controllo migliore dell'avversità, rispetto all'azadirachtina da sola o veicolata in acqua corretta con acido citrico. Concentrandoci sull'aspetto fisiologico e nutritivo, è stato possibile determinare, in cicli di prove successive, che la maggiore crescita iniziale delle piante è risultata associata a un maggior *recovery* di P2O5 da parte della pianta, sulle cui cause agiscono probabilmente sia l'aspetto fisiologico dello stimolo alla crescita iniziale dell'apparato radicale che l'effetto del tannino sull'aumento dell'assimilabilità del fosforo nel suolo conseguente all'acidificazione (effetto, quest'ultimo, dimostrato in modo indipendente in laboratorio, in assenza di pianta, formulando tannino e roccia fosfatica tenera).

Un altro aspetto considerato nelle ricerche è stato quello del rilascio dell'azoto. In prove di laboratorio, svolte secondo la metodica modificata Stanford e Smith (Magni et al., 2008), abbiamo verificato che l'azoto ureico, già in presenza di basse concentrazioni di tannino (1%) dà luogo a una curva di rilascio comparabile ai classici "Nitrogen Slow Release Fertilizers", tipo metilenurea. In numerose prove sperimentali di campo, sia su grano che mais, i risultati conseguiti hanno dimostrato che l'effetto consente, a parità di resa quali-quantitativa, una riduzione del totale di azoto applicato alla coltura di circa il 25% sulla base del minore dilavamento della forma nitrica e della maggiore efficienza complessiva dell'azoto contenuto nel fertilizzante che, nei suoli subalcalini o alcalini, subisce ridotte perdite per volatilizzazione. Al riguardo si deve considerare che tali perdite possono raggiungere valori elevati, anche dell'ordine del 15-30% dell'azoto ammoniacale o ureico quando le applicazioni hanno luogo in superficie, senza il successivo interrimento (caso dei cereali a ciclo autunno-vernino). Tutto questo ha un importante significato a livello del *recovery* di N da parte della pianta, con vantaggi evidenti a livello economico e ambientale.

A livello specialistico il tannino è stato anche impiegato per formulare un concime complessato con ferro. Questo prodotto, in una serie di ricerche condotte prevalentemente su colture arboree da frutto (pero, actinidia, vite,

ecc.) con chiari sintomi di clorosi ferrica, ha dimostrato un'ottima efficienza in applicazioni attuate in microirrigazione, tanto da far regredire rapidamente la sintomatologia. In proposito, sono allo studio altre combinazioni con magnesio e microelementi nonché formulazioni applicabili per via fogliare.

L'attività sperimentale sin qui condotta ha permesso il conseguimento di quattro patent UE con estensione negli USA e in Giappone.

RIASSUNTO

Dopo un esame della bibliografia relativa agli effetti dei tannini a carico del ciclo dell'azoto e alla disponibilità di ferro nel suolo, vengono presentati i principali risultati delle ricerche svolte presso il DAGA-Univ. Pisa, che hanno portato negli anni al deposito di 4 brevetti (l'ultimo del 2012), alla formulazione di nuovi concimi con azoto a lenta cessione e ferro complessato con tannini di castagno, nonché di correttivi in grado di interagire positivamente con la crescita e lo stato di sanità delle colture.

ABSTRACT

After a literature survey on the effects of tannins on soil Nitrogen cycle and Iron availability, the main results of the research activity carried out at DAGA-Univ. Pisa are presented. These results led to the filing of 4 patents (the last in 2012), to the formulation of new Nitrogen slow-release fertilizers, and Iron fertilizers with chestnut tannins as complexing agent. Also some correctives were investigated, to improve plant growth and health.

BIBLIOGRAFIA

- BARGIACCHI E., COSTA G., DELLA CROCE C., FOSCHI L., PAMPANA S., MIELE S., RIZZI G. (2004): EP-1464635 24-03-2010, priorità: 06-10-2004.
- BARGIACCHI E., BERTOLA R., COSTA G., DELLA CROCE C., MIELE S., POMPEIANO A., ZAMBELLI P. (2008): EP-06756296.7-1218, priorità 07-10-2005.
- BARGIACCHI E., COSTA G., MIELE S., MAGNI S. (2011): EP 2 345 628, priorità 15-01-10.
- BARGIACCHI E., MIELE S., MILLI G., BERTOLA R. (2012): Paper 51B presented at 45th Tobacco Workers' Conference, Williamsburg VA (USA) 2012, CORESTA.org database.
- BATE-SMITH E. C., SWAIN T. (1962): in Mason and Florkin (eds.), *Comparative Biochemistry*, vol. 3A, Academic press, NY, 705-809.
- BENOIT R.E., STARKEY R.L. (1968): «Soil Sci.», 105, pp. 203-208.
- BRADLEY R.L., TITUS B.D., PRESTON C.P. (2000): «Soil Biol. & Biochem.», 32, pp. 1227-1240.
- FIELD J.A., LETTINGA G. (1992): in Hemingway R. W. Et al. (eds.), *Plant Polyphenols*, Plenum Press, NY, 673-692.

- FIERER N., SCHIMEL J.P., CATES R. G., ZOU J. (2001): «Soil Biol. & Biochem.», 33, pp. 1827-1839.
- GIANFREDI L., DECRISTOFARO A., RAO M.A., VIOLANTE A. (1995): «Soil Sci. Soc. Am. J.», 59, pp. 811-815.
- HAGERMAN A.E. (2002): web publication Miami Univ., Ohio (USA).
- HUANG J. L. SUN D. W., XIAO S.C. (1999): «J. Nanjing Forestry University», 23, 3, pp. 25-28.
- MAGNI S., FOSCHI L., PICCOTINO D., MIELE S. (2008): European Turfgrass Society Congress, Pisa, May 19-20, Atti.
- MIELE S., MILLI G., BARGIACCHI E. (2010): Paper presented at CORESTA Congress 2010, Edinburgh, UK, Sept. 12-16, CORESTA.org database.
- MIELE S., BARGIACCHI E., BERTOLA R. (2011): The 9th New Ag Intern. Conference & Exhibition, Athens (Greece), June 28-30, 2011, New Ag International June-July 2011 issue, 77-78.
- MIELE S., BARGIACCHI E., MILLI G. (2011): 2011 Meetings of the CORESTA Study Groups, Santhiago, Chile, Nov. 6-11, 2011, CORESTA.org database.
- RAO M. A., GIANFREDI L. (2000): «Soil Biol. Biochem.», 32, 1921-1926.
- ROMANI A., MIELE S., BARGIACCHI E., CAMPO M., BUZZINI P. (2011) Paper presented at 102nd AOCS Annual Meeting & Expo, Cincinnati (OH)-USA, 01/05-05-2011, Abstract book page 112.
- SCALBERT A. (1991): «Phytochemistry» 30, 3875-3883.
- SWAIN T. (1979): In: Rosenthal G.A. et al. (eds.) Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. Academic Press, NY, 657-682.

ENRICA BARGIACCHI*

I tannini di castagno nella legislazione italiana dei fertilizzanti

INTRODUZIONE

Il percorso autorizzativo dei concimi a base di tannini di castagno, iniziato dopo il deposito delle prime domande di brevetto, ha attraversato tre legislature e tre riferimenti normativi, risultando tra i più lunghi nella storia, alquanto complicata, della legislazione italiana dei fertilizzanti: dal luglio 2004 al settembre 2011. È stato un percorso accidentato, a causa: 1) dell'innovatività del prodotto, che aveva come sponsor solo la sua validità agronomica; 2) della necessità d'individuare e far approvare da apposita commissione (attivata in modo alquanto estemporaneo) nuovi metodi d'analisi; 3) del ritardo che ha contraddistinto il periodo tra il compimento della procedura TRIS e la pubblicazione su GU del decreto autorizzativo per l'estratto vegetale con tannini: quasi tre mesi! In sintesi, da tutta questa vicenda abbiamo tratto un'amara conclusione: che il tempo, per la burocrazia, non ha lo stesso valore che ha per le attività produttive: il settore va riformato, perché non si può, da una parte, pensare di promuovere l'innovazione tecnologica, e, dall'altra, azzoppare le aziende che la attuano con pastoie burocratiche che penalizzano il ritorno degli investimenti anticipati.

LA NORMATIVA

La normativa italiana sui fertilizzanti è stata abbastanza disomogenea fino al recepimento della direttiva del Consiglio 76/116/CEE, con la legge 19

* *Consorzio INSTM- Firenze*

ottobre 1984, n. 748, “*Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti*” (GU 6-11-1984). Tra l’altro, ho un personale ricordo dell’on. Antonio Baslini, tra i firmatari della proposta, quando, all’epoca, consegnò al prof. Miele e a me il testo definitivo, stampato sulla carta giallina della Camera dei Deputati. Era una legge nata per i produttori di concimi chimici e adattata alle esigenze dei fabbricanti di concimi organici e organo-minerali con l’inserimento della categoria “concimi nazionali”. Per *concime* s’intendevano esclusivamente le sostanze aventi lo scopo precipuo di apportare un elemento nutritivo, in determinate forme e solubilità. Tutti gli altri prodotti, in grado di modificare le caratteristiche del terreno, migliorandone la fertilità, venivano definiti ammendanti o correttivi. Questa legge, modificata a più riprese con l’inserimento di nuove voci e metodi d’analisi, ha segnato l’agricoltura italiana per oltre un ventennio. I maggiori problemi nascevano dall’assoluta dicotomia tra mondo dei “chimici” e degli “organici”. Memorabili i sequestri di concimi fosfatici con acidi umici del decennio 1990-2000! Ostativa, per i tannini, la definizione di soluzioni azotate: «Prodotto ottenuto per via chimica e per soluzione, in acqua, sotto forma stabile a pressione atmosferica, *senza aggiunta di sostanze organiche fertilizzanti di origine animale o vegetale*». Era apparentemente un limite insormontabile.

Con l’entrata in vigore del Reg. (CE) 2003/2003, che uniformava gran parte della normativa negli Stati membri, almeno per i cosiddetti concimi CE, si rese necessaria una revisione che si realizzò con il D.lgs. 917/2006. Qui erano solo richiamati i concimi CE e dettagliati quelli “nazionali”. Entravano per la prima volta termini nuovi: substrati di coltivazione, prodotti ad azione specifica, concimi per l’agricoltura biologica, tracciabilità. Il D.lgs. 917 naufragò ben presto per mancanza di adeguamento formale alla procedura di notifica, istituita dalla direttiva 98/34/CE (procedura TRIS), e pertanto, dopo modifiche e inserimenti importanti di nuovi prodotti, l’intera normativa venne convogliata e adeguata ai tempi nel D.lgs. 75/2010 del 29-04-2010.

Il passaggio fu salutare, anche perché coincise con l’inserimento, nella versione “base” del decreto, dei seguenti prodotti:

- estratto vegetale contenente tannini, tra gli agenti complessanti di cui allegato 1 punto 11;
- soluzione di concime azotato contenente tannini, al capitolo 2 Concimi minerali semplici, par. 2.2. Concimi azotati fluidi;
- concime a base di ferro complessato con estratti vegetali contenenti tannini, al capitolo 8 Concimi a base di microelementi (oligoelementi), par. 8.1 Concimi a base di un solo microelemento. Ferro.

Era rimasto fuori il prodotto fondamentale: l’estratto di tannini di casta-

gno tal quale, per il quale era stato scelto l'inserimento come correttivo e che sarebbe entrato in legge oltre 7 anni dopo la prima istanza, a più riprese ritirata e riformulata, per ovviare a successive posizioni ostative "a prescindere" da parte della commissione ex 748/1984. L'istanza che ha poi avuto successo è stata quella presentata nel 2009, quando l'iter dei due prodotti formulati con tannini, quello con azoto e quello con ferro, era ormai in dirittura d'arrivo.

Nel momento di massima difficoltà si pensò anche di fare un'istanza per l'inserimento del prodotto tra i biostimolanti nell'ambito dell'agricoltura biologica, istanza superata per l'avvenuto inserimento dei tannini nel decreto di modifica al D.lgs. 75/2010.

A questo punto, restano due aspetti normativi da approfondire. Entrambi riguardano l'inserimento tra i fertilizzanti ammessi proprio per l'agricoltura biologica. Per l'estratto di tannini di castagno, la procedura è nazionale, di tipo amministrativo, e al momento in corso. Per il complesso tannino-ferro è invece necessario intervenire a livello di modifica del Reg. (CE) 2003/2003, in quanto sono ammessi all'uso in agricoltura biologica solo agenti chelanti o complessanti presenti in quel testo, ovvero tutti quelli di sintesi... chimica. Ancora una volta la realtà è fonte d'infinite sorprese...

Etichette dei concimi a base di tannini

CORRETTIVI- CORRETTIVI DIVERSI	
ESTRATTO DI TANNINI DI CASTAGNO LIQUIDO	
pH in acqua	3.0 – 3.5
CARBONIO (C) ORGANICO sul t.q.	MIN. 9 %
TANNINI sul t.q.	MIN. 13 %
Autorizzazione: D.M. 30-06-2011, pubbl. on GU n° 215 15-09-2011 (modificazioni al D.Lgs. 75/2010)	

CORRETTIVI- CORRETTIVI DIVERSI	
ESTRATTO DI TANNINI DI CASTAGNO SOLIDO	
pH in acqua	3.0 – 3.5
CARBONIO (C) ORGANICO sul t.q.	MIN. 50 %
TANNINI sul t.q.	MIN. 75 %
Autorizzazione: D.M. 30-06-2011, pubbl. on GU n° 215 15-09-2011 (modificazioni al D.Lgs. 75/2010)	

CONCIME NAZIONALE – CONCIME MINERALE SEMPLICE – AZOTATO FLUIDO SOLUZIONE DI CONCIME AZOTATO CONTENENTE TANNINI	
Composizione	
Azoto (N) totale	20 %
Azoto (N) ureico	20 %
pH	intervallo 4-6 -
Contenuto in TANNINI	minimo 0.8 %
Tiolo massimo di ferro	0.43 %
Temperatura d'immagazzinamento	Superiore a 4°C
Istruzioni relative alla prevenzione degli incidenti nel corso dell'immagazzinamento	Vedi Scheda di Sicurezza
D.Lgs. 75/2010 del 28/04/2010, pubblicato in suppl. ord. GU n° 121 del 26/05/2010	

CONCIME NAZIONALE – CONCIME A BASE DI MICROELEMENTI CONCIME A BASE DI FERRO COMPLESSATO CON ESTRATTI VEGETALI CONTENENTI TANNINI	
Composizione	
Ferro (Fe) solubile in acqua	5 %
Ferro (Fe) in forma complessata	Min. 4.8 %
Contenuto in tannini	5 %
Temperatura d'immagazzinamento	Superiore a 4°C
Istruzioni relative alla prevenzione degli incidenti nel corso dell'immagazzinamento	Vedi Scheda di Sicurezza allegata
Agente complessante: estratto vegetale contenente tannini	
D.Lgs. 75/2010 del 28/04/2010, pubblicato in suppl. ord. GU n° 121 del 26/05/2010	
Utilizzare soltanto in caso di biocenosi riconosciuta. Non superare le dosi autorizzate.	

RIASSUNTO

Dopo un breve esame dei ritardi e delle problematiche sorte nel corso dell'iter autorizzativo del correttivo e dei concimi a base di tannini di castagno per l'inserimento nella legge italiana dei fertilizzanti, essenzialmente collegate alle loro caratteristiche innovative, che hanno richiesto anche l'approvazione di nuovi metodi di analisi, sono descritti i prodotti e le loro etichette d'uso. Per il correttivo è in corso l'inserimento tra i prodotti ammessi in agricoltura biologica.

ABSTRACT

Delays and problems arisen during the authorization process for including the chestnut tannin based corrective and fertilizers in the Italian law of fertilizers are briefly examined. They were essentially related to the innovative characteristics of these products, previously requiring new analytical methods been approved. Products and their labels are described. For the corrective the authorization in organic farming is in progress.

BIBLIOGRAFIA

- L. 748/1984 del 19 ottobre 1984, "*Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti*" (GU Rep. Ital. 6-11-1984).
 Reg. (CE) 2003/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 13 ottobre 2003 relativo ai concimi (GU UE 21-11-2003).
 D.lgs. 75/2010 del 29-04-2010 "*Riordino e revisione della disciplina in materia fertilizzanti, a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009 n° 88*" (GU Rep. Ital. 26-05-2010).

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 antimutagena, 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®) e quello di vinaccioli (Leucoselect™, Phytosome®), 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 ₅₀ (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), EC₅₀ (μM) e composizione percentuale per sottoclassi di tannini delle frazioni commerciali da estratto di castagno Saviotan®*

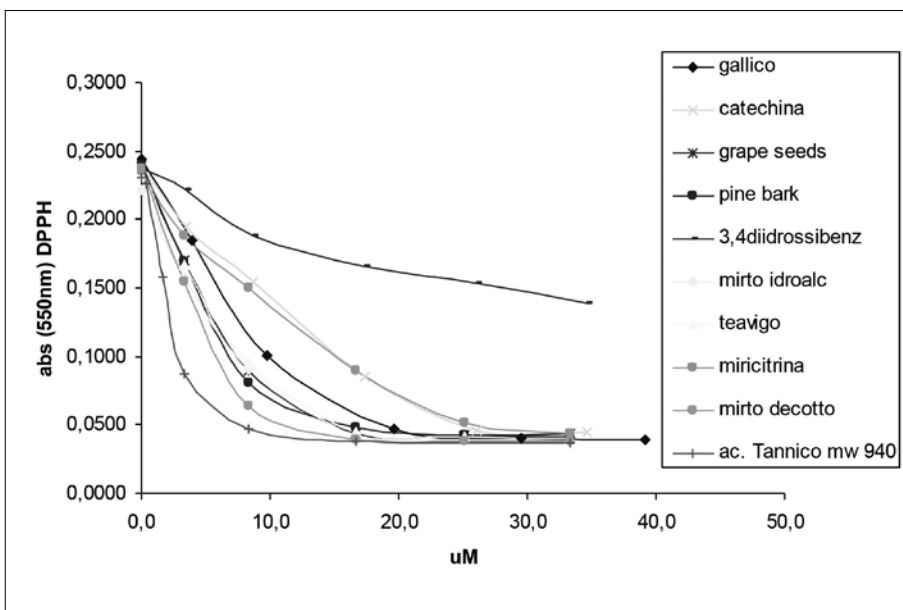


Fig. 1 *Cinetiche di decadimento del radicale stabile DPPH· in soluzione, in presenza di estratti ricchi in tannini e di singoli composti*

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.

Il controllo dei nematodi nelle colture ortive: prove *in vitro* con i tannini di castagno

INTRODUZIONE

Sono state eseguite numerose ricerche su estratti vegetali e agro-industriali, come possibili sostituti di prodotti chimici convenzionali. La decomposizione di residui vegetali può produrre sostanze con proprietà nematocide, che possono essere utilizzate contro i nematodi fitoparassiti. I tannini, che si possono ritrovare in un'ampia varietà di piante e in quasi tutte le parti di esse, sono costituiti da diversi componenti tra i quali acqua, polifenoli solubili e loro derivati, che risultano tossici per funghi, batteri e lieviti (Scalbert, 1991). Prove sperimentali hanno evidenziato la capacità dei tannini di controllare l'infestazione dei galligeni (Mian e Kabana Rodríguez, 1982; Maistrello et al., 2010), come pure di agire sulla schiusura di larve di *Heterodera glycines* Ichinohe (Hewlett et al., 1997). Sono state condotte prove *in vitro* per capire il meccanismo di azione dei tannini estratti dalla corteccia di castagno su alcuni stadi biologici di *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood allevata in serra su pomodoro Marmande.

MATERIALI E METODI

Per le prove sono state utilizzate salierine in vetro, con copertura a tenuta e per i tannini è stato utilizzato il prodotto SAVIOTAN® (Nuova Rivart, Radicofani, SI). Il piano di lavoro era così strutturato: Tesi 1 - Soluzione di acqua (testimone); Tesi 2 - Soluzione sterile Saviotan, 2 g/l di tannino; Tesi 3 - Soluzione sterile

* Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia, Firenze

** Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

Saviotan, 2 g/l di tannino + bisolfito; Tesi 4 - Soluzione sterile Saviotan, 5 g/l di tannino; Tesi 5 - Soluzione sterile Saviotan, 5 g/l di tannino + bisolfito. Per ciascuna delle 4 prove in oggetto le salierine impiegate sono state 20 (5 tesi x 4 repliche) e in ciascuna salierina sono stati introdotti 2 cc della soluzione con tannino da saggiare, o di acqua sterile. L'incubazione è avvenuta sempre in cella climatizzata, al buio, a una temperatura costante di 24°C.

Le *uova* sono state raccolte manualmente da ovisacchi isolati da radici di pomodoro infestate dal galligeno. Sono state poste in ciascuna salierina con 10 µl di acqua. L'osservazione e i conteggi delle larve schiuse dalle uova insegmentate o da quelle embrionate sono stati effettuati rispettivamente ogni 2 giorni per 22 giorni e quotidianamente per 11 giorni. Le *larve libere* sono state raccolte dagli ovisacchi e sono state poste nelle salierine con 10 µl di acqua. Le osservazioni in questo caso riguardavano la motilità delle larve infestanti immerse nelle varie soluzioni. I rilievi sono stati fatti quotidianamente per 11 giorni. A 5 e 7 giorni dall'inizio della prova un certo numero di larve immerse nelle soluzioni trattate che apparivano immobili sono state trasferite in acqua per capire se le diverse concentrazioni di tannino avessero avuto azione nematostatica e/o nematocida. Per quanto riguarda invece le *larve racchiuse negli ovisacchi*, sono state isolate dagli ovisacchi e poste in 10 µl di acqua sterile per salierina, per un totale di 100 ovisacchi (5 x 4 x 5). Osservazioni e conteggi sul numero di larve schiuse dai medesimi sono stati fatti ogni 2 giorni per 18 giorni. Al 18° giorno sono stati effettuati i conteggi, per ciascuna replica delle 5 tesi, relativi al numero di uova e larve rimaste ancora al loro interno.

I dati percentuali finali ottenuti da ciascuna prova sono stati trasformati in valori angolari e sono stati analizzati statisticamente (analisi della varianza e il test di Fisher).

RISULTATI

Per quanto riguarda le *uova insegmentate* (tab. 1), durante i primi 4 giorni di osservazione la percentuale di larve di II stadio schiuse è apparsa molto limitata, addirittura nulla nella tesi testimone. Poi si è notato un aumento graduale nella loro schiusura, sempre più accentuato nelle tesi 2 e 3 (minor concentrazione di tannini), rispetto alle tesi testimone e alle tesi 4 e 5. La presenza del bisolfito non ha inciso sul tasso di schiusura.

Dalla tabella 1 è evidente che nelle tesi 1, 2 e 3 la schiusura si è bloccata a 16 e 18 giorni; nelle tesi 4 e 5, la schiusura delle larve, che nei primi 10 giorni

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE										
		2 gg	4 gg	6 gg	8 gg	10 gg	12 gg	14 gg	16 gg	18 gg	20 gg	22 gg
1	0,0 g/l	0,00	0,00	4,29	8,86	17,29	43,03	70,23	70,65	70,65	70,65	70,65 AB
2	2 g/l	0,00	0,39	7,96	16,58	31,57	62,21	84,98	95,55	95,55	95,55	95,55 B
3	2 g/l + bisolf.	0,00	2,23	6,80	13,06	20,03	44,84	79,42	88,73	92,50	92,50	92,50 B
4	5 g/l	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,18	20,35	23,51	23,51	25,59	26,36 A
5	5 g/l + bisolf.	0,00	0,23	0,23	0,72	1,65	6,91	19,74	26,32	26,55	26,72	29,03 A

I dati sono medie di 4 repliche.
Nella colonna le medie seguite da lettere maiuscole diverse risultano significativamente differenti per $P = 0,01$ (Anova e test di Fisher).

Tab. 1 *Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla schiusura di uova insegmentate di M. incognita: % di larve schiuse*

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE										
		1 gg	2 gg	3 gg	4 gg	5 gg	6 gg	7 gg	8 gg	9 gg	10 gg	11 gg
1	0,0 g/l	35,09	44,98	51,65	60,20	67,39	77,35	79,35	81,98	83,26	85,91	86,79
2	2 g/l	19,78	35,08	37,22	40,19	45,15	48,89	59,71	68,21	80,50	82,63	83,04
3	2 g/l + bisolf.	23,68	38,27	50,41	55,85	59,46	61,58	65,65	68,43	70,13	73,29	74,13
4	5 g/l	16,40	38,13	49,20	52,13	54,57	55,51	57,28	58,22	58,22	60,09	60,09
5	5 g/l + bisolf.	28,30	31,52	36,26	41,10	48,61	50,20	53,25	54,79	59,45	72,21	72,21

Vedi nota tabella 1.

Tab. 2 *Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla schiusura di uova embrionate di M. incognita: % di larve schiuse*

è apparsa inconsistente, dal 12° giorno in poi è aumentata gradualmente, se pur con valori più contenuti. Le uova non schiuse delle tesi 4 e 5, al 22° giorno, avevano assunto una colorazione marrone scuro. Dall'analisi statistica effettuata sui dati finali è evidente che non esiste una differenza significativa tra i valori medi percentuali di larve schiuse da uova insegmentate delle tesi 1, 2 e 3. È apparsa però altamente significativa la differenza tra il valore percentuale medio raggiunto dalle uova immerse nelle soluzioni a concentrazione più elevata rispetto a quelle a minor concentrazione.

Per quanto riguarda le *uova embrionate* (tab. 2) dal primo giorno di osservazione si è notato una pronta emergenza di larve da tutte e 5 le tesi, che è aumentata in maniera graduale protrandosi quasi fino all'ultimo giorno. Le differenze rilevate tra i valori medi del tasso di schiusura al termine della prova non sono risultate statisticamente significative tra loro.

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE										
		1 gg	2 gg	3 gg	4 gg	5 gg	6 gg	7 gg	8 gg	9 gg	10 gg	11 gg
1	0,0 g/l	95,13	92,64	92,64	91,55	90,64	89,13	88,52	88,52	86,31	83,49	82,27 D
2	2 g/l	90,01	88,46	88,46	87,98	87,71	85,36	79,46	68,52	66,46	62,53	62,53 C
3	2 g/l + bisolf.	88,60	86,66	84,99	80,55	78,94	72,12	67,19	66,18	60,92	54,10	52,49 BC
4	5 g/l	84,39	87,11	79,12	68,61	61,38	43,38	34,23	34,47	31,45	31,45	31,45 A
5	5 g/l + bisolf.	83,02	81,97	76,18	71,45	68,51	65,94	59,54	56,75	51,54	48,09	47,06 B
Vedi nota tabella 1.												

Tab. 3 Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla motilità di larve di II stadio di *M. incognita*: % di larve mobili

Per quanto riguarda le *larve di II stadio libere* (tab. 3) è emersa una graduale perdita di motilità, particolarmente accentuata nelle larve immerse nelle soluzioni con la maggiore concentrazione di tannini (tesi 4 e 5), come evidenziato anche al termine delle prove dalle differenze altamente significative tra il testimone e tutte le altre tesi, in particolare tra la tesi 4 e le altre tesi.

La prova condotta trasferendo in acqua sterile un certo numero di larve di II stadio, all'apparenza immobili, immerse nelle diverse concentrazioni di tannino, ha dato come risultato che solo quelle delle tesi 4 e 5 (5 g/l di tannino con e senza bisolfito), in ragione di 1/3 e di 1/5 rispettivamente, avevano ripreso la loro motilità; nelle tesi 2 e 3 tutte le larve si erano riativate.

Per quanto riguarda le *larve di II stadio incluse negli ovisacchi* (tab. 4) le larve sono schiuse in maniera graduale, per tutta la durata della prova, dagli ovisacchi della tesi 1 e in linea generale anche dalle tesi 2 e 3. Dagli ovisacchi immersi nella soluzione a più alta concentrazione di tannino, la schiusura invece si è bloccata tra l'14° e il 16° giorno. La massima percentuale di schiusura è stata rilevata nella tesi testimone. Al termine della prova il tasso di schiusura in tutte le tesi con tannini era significativamente inferiore rispetto al controllo, ma non statisticamente diversi tra loro.

A fine prova è stato anche conteggiato il numero di uova e larve rimaste ancora all'interno degli ovisacchi immersi nelle varie soluzioni. L'aspetto delle uova e delle larve rimaste negli ovisacchi immersi nella soluzione di tannino della tesi 2 era normale, quelle immerse in soluzione di tannino a 2 g/l più bisolfito apparivano vacuolizzate; quelle della tesi 4 distorte e vacuolizzate ma ancora vive; deformate, vacuolizzate e tutte morte quelle della tesi 5. In quest'ultima tesi anche le uova erano oltremodo vacuolizzate.

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE								
		2 gg	4 gg	6 gg	8 gg	10 gg	12 gg	14 gg	16 gg	18 gg
1	0,0 g/l	4,18	10,65	11,27	13,30	21,68	26,62	30,38	32,03	33,06 A
2	2 g/l	1,57	3,09	4,75	6,66	7,37	7,91	8,74	9,44	10,01 B
3	2 g/l + bisolf.	1,42	2,09	2,20	2,48	2,59	2,73	2,73	3,74	3,90 B
4	5 g/l	2,94	4,19	4,30	4,62	4,79	4,92	5,12	5,22	5,22 B
5	5 g/l + bisolf.	1,45	2,66	2,96	3,05	3,05	3,14	3,16	3,16	3,16 B
Vedi nota tabella 1.										

Tab. 4 Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla schiusura di larve di II stadio da ovisacchi di *M. incognita*: % di larve schiuse

Gli ovisacchi trattati con il tannino, hanno assunto velocemente un colore bruno rossiccio.

CONCLUSIONI

Considerando le *uova insegmentate*, alle concentrazioni più elevate si è osservato un iniziale rallentamento dell'embriogenesi cui è seguita la schiusa delle larve a una percentuale assai ridotta, mentre l'analisi delle uova non schiuse ha indicato che i tannini hanno agito bloccando l'embriogenesi stessa. Al contrario, alle concentrazioni più basse di tannini si è osservata un'accelerazione dell'embriogenesi rispetto al testimone e la schiusura quasi totale delle larve dalle uova. L'aggiunta di bisolfito non ha interferito sul tasso di schiusura. A fine prova le uova delle tesi 4-5 sono apparse imbrunite e alcune ancora insegmentate. Il prodotto non ha agito nei confronti delle *uova embrionate*. Infatti le percentuali medie di schiusura delle tesi trattate non si sono statisticamente differenziate da quelle del testimone. Il tannino invece, oltre a bloccare in parte l'embriogenesi alla concentrazione più elevata, ha agito, essenzialmente nei confronti delle *larve libere di II stadio*, da nematostatico alla dose più bassa (le larve immobili trasferite in acqua riprendevano la loro attività), da nematostatico ed essenzialmente da nematocida alla dose più elevata. Comunque, dalle larve immerse nelle diverse soluzioni di tannino solo percentuali statisticamente inferiori a quella del testimone erano in grado di rimanere attive. Le due concentrazioni con o senza bisolfito hanno evidenziato una notevole azione nei confronti degli *ovisacchi*, contenendo notevolmente la schiusura delle larve da questi. Alla concentrazione più alta le larve apparivano anche deformate e vacuolizzate.

I migliori risultati si sono ottenuti con soluzioni di tannino di 5 g/l con o senza l'aggiunta di bisolfito. A tale concentrazione il tannino, oltre a bloccare

e/o a rallentare l'embriogenesi, ha agito come nematostatico ed essenzialmente come nematocida nei confronti delle larve libere infestanti e hanno determinato il blocco dell'embriogenesi e la schiusura delle larve all'interno degli ovisacchi.

RIASSUNTO

Si è testato l'effetto di prodotti a base di tannino di castagno su alcuni stadi biologici del nematode galligeno *Meloidogyne incognita*. L'attività nematocida è stata testata con due concentrazioni (2-5 g/l) con e senza bisolfito, per periodi variabili tra 11 e 22 giorni. La concentrazione con 2 g/l di tannino ha stimolato in modo significativo l'embriogenesi e la schiusa delle larve da uova insegmentate, mentre il trattamento alla dose più alta ha inibito e ritardato l'embriogenesi riducendo il tasso di schiusura delle uova. Questo prodotto vegetale ha rivelato un'azione significativa sulla motilità delle larve di II stadio mostrando proprietà nematostatica e soprattutto nematocida alla dose più alta. Infine ha mostrato un significativo effetto inibitorio sull'emergenza delle larve dagli ovisacchi. Tutte queste proprietà rendono il prodotto un mezzo interessante per una nuova strategia di controllo nella gestione nematodi parassiti.

ABSTRACT

The effect of chestnut tannins was evaluated against some biological stages of *Meloidogyne incognita*. The nematicidal activity was tested at two concentrations (2-5 g/l) with and without bisulphite, for periods varying between 11 and 22 days. Treatment of 2 g/l of tannin stimulated significantly the embryogenesis and the juvenile hatching from unsegmented eggs, whereas treatment at higher dose inhibited and delayed the embryogenesis reducing the hatching rate from eggs. This vegetable product revealed a very significant action on free juveniles motility showing nematostatic and mainly nematicidal properties at higher concentration. Finally tannin exhibited a significant inhibitory effect in hatching of juveniles included in egg masses. All these properties make of this by-product an interesting means for a new control strategy in nematode pest management.

RINGRAZIAMENTI

La presente ricerca è stata promossa e sostenuta finanziariamente dalla Società Agrostar S.r.l. (Cavriago, Reggio Emilia).

BIBLIOGRAFIA

HEWLETT T.E., HEWLETT E.M., DICKSON D.W. (1997): *Response of Meloidogyne spp., Heterodera glycine and Radopholus similis to tannic acid*, «Supplement to the Journal of Nematology», 29, 4S, pp. 737-741.

- MAISTRELLO L., VACCARI G., SASANELLI N. (2010): *Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode Meloidogyne javanica*, «Helminthologia», 47, pp. 48-57.
- MIAN I.H., RODRIGUEZ-KABANA R. (1982): *Organic amendments with high tannin and phenolic contents for control of Meloidogyne arenaria in infested soil*, «Nematropica», 12, pp. 221-234.
- SCALBERT A. (1991): *Antimicrobial properties of tannins*, «Phytochemistry», 30, pp. 3875-3883.