



Relazione Finale sul progetto

Impiego di un omogeneizzato di aloe nel periparto di bovine da latte: effetti su performance, condizioni metaboliche e benessere animale” “ALBO” (ID 67)

Ente Finanziatore MiPAAF SAQ X Uff. Agr. Biol. /o / COSVIR IV Uff. Ricerca

Responsabile Scientifico: Dr Erminio Trevisi

Finalità del progetto

Lo scopo generale del progetto è stato quello di definire un protocollo per l'alimentazione di bovine in transizione, idoneo per la zootecnia biologica, che includesse un omogeneizzato di *Aloe arborescens* Mill. come nutraceutico, quale modulatore della risposta immunitaria e/o dello stress infiammatorio. Nel dettaglio gli obiettivi del progetto si sono articolati in 9 fasi finalizzate a:

- i. definire le condizioni più opportune per la preparazione dell'omogeneizzato di *Aloe arborescens*;
- ii. valutare eventuali effetti dell'aloè sul biochimismo ruminale e quindi sulla possibile interferenza della normale attività digestiva delle bovine e dei ruminanti;
- iii. ottimizzare la metodica di analisi di alcune componenti dell'aloè (antrachinoni);
- iv. valutare l'eventuale assorbimento degli antrachinoni caratteristici di aloè (aloina A e B, ed aloè-emodina) e la correlata cinetica di assorbimento nel sangue bovino;

- v. valutare gli effetti relativi alla somministrazione dell'omogeneizzato di aloe sullo stato di salute e di benessere delle bovine in transizione, in particolare sulla attenuazione dei processi infiammatori nel post-parto e sulle loro conseguenze in termini di minor ricorso a farmaci allopatici;
- vi. valutare la relazione tra eventuali effetti biologici desiderabili (produzione quantitativa, fertilità, riduzione della lipomobilizzazione, profilo ematochimico) sulle bovine in relazione alla dose di assunzione dell'omogeneizzato di aloe;
- vii. rilevare l'eventuale accumulo/persistenza nel sangue e il passaggio nel latte, degli antrachinoni caratteristici di Aloe (aloina A e B, ed aloe-emodina) al fine di un possibile impiego in lattazione;
- viii. studiare l'effetto sui vitelli nati da madri che hanno ricevuto l'omogeneizzato di aloe nelle fasi terminali di gravidanza ed alimentati con il colostro materno;
- ix. valutare i possibili vantaggi economici dell'impiego di aloe nel periparto in allevamenti biologici.

Nei 18 mesi di progetto il gruppo di ricerca da me coordinato ha svolto tutte le attività previste dal protocollo sperimentale finanziato. Le due Unità Operative (UO) dell'Università Cattolica del S. Cuore, l'Istituto di Zootecnica (UO1; coordinata dal Dr Erminio Trevisi) e l'Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale (UO2; coordinata dal Dr Luigi Lucini), hanno operato in stretto collegamento tra loro in tutte le suddette fasi.

I. Definire le condizioni più opportune per la preparazione dell'omogeneizzato di Aloe arborescens (WP1).

La prima fase del progetto è stata dedicata alla caratterizzazione della pianta di *Aloe arborescens*, in modo da poter disporre di un prodotto con una composizione sufficientemente standardizzata.

- a) Scelta della tipologia di pianta (WP1.2):** Sia per le prove *in vivo* che *in vitro* è stata utilizzata la specie *Aloe arborescens* Miller. Tutte le piante sono state fornite dall'Azienda Agricola G. Dester, situata a Manerba del Garda (BS), ditta floro-vivaistica specializzata nella produzione di piante d'Aloe. La scelta della specie è stata effettuata sulla base di alcune analisi preliminari, volte a verificare il contenuto di aloina, delle specie più comuni di Aloe. In particolare l'attenzione si è concentrata sul confronto tra la *Aloe arborescens* Miller con la più nota *Aloe barbadensis* Miller,

la specie più diffusa per l'utilizzo del parenchima acquifero della foglia (gel d'aloe). Tale test ha consentito di evidenziare un maggior tenore, e spesso più stabile, di antrachinoni dell' *Aloe arborescens* Miller.

E' stato anche eseguito da parte dell'UO2 un confronto tra piante di differente età, 3 e 5 anni. Da questa comparazione si è potuto osservare che le piante di tre anni hanno un contenuto in aloina statisticamente non differente da quelle di età maggiore ($\alpha=0,01$). Pertanto è stato dimostrato che le piante di cinque anni, commercialmente considerate superiori per il supposto maggior contenuto di principi attivi, non presentano una qualità significativamente superiore a quelle di 3 anni, almeno nelle condizioni di allevamento studiate. Tali prove non hanno inoltre evidenziato differenze tra coltivazione in serra a tunnel con copertura plastica, a confronto di sistemi di allevamento in serra con copertura in vetro.

In seguito a tali risultati si è deciso di utilizzare nel presente progetto piante di *Aloe arborescens* di 3 anni di età, afferenti a lotti omogenei, allevate sotto serra a tunnel con copertura plastica.

b) Preparazione degli omogeneizzati a base di *Aloe arborescens* (WP1.3, WP1.4 e WP1.9). L'omogeneizzato è stato ottenuto prelevando da pianta di *Aloe arborescens* Miller di 3 anni tutte le foglie, oltre che l'estremità tenera dei fusti centrali e laterali, visto il loro basso grado di lignificazione. Tale decisione è stata adottata in seguito al riscontro preliminare che ha dimostrato come non vi siano differenze significative nel contenuto in aloina (indice degli antrachinoni) tra le foglie presenti sul fusto centrale e quelle sui fusti laterali dello stesso cespo. In realtà le foglie più giovani di *Aloe arborescens* Miller presentano un contenuto superiore al 30% in aloina rispetto a quelle più vecchie, ma tali differenze non sono risultate significative ($\alpha=0.01$) per l'elevata variabilità del contenuto di ciascuna foglia.

L'omogeneizzazione è stata condotta con cutter a lame orizzontali, in acciaio, senza preventivi trattamenti del vegetale. In ciascuna sessione di omogeneizzazione che ha previsto l'impiego di 2-3 piante, una aliquota del preparato è stata sottoposta ad analisi per il contenuto in aloina. Il contenuto medio di aloina valutato in 5 differenti preparati è risultata pari a $1848 \pm 122 \text{ mg kg}^{-1}$.

Dalla bibliografia emerge come l'aloina sia una molecola poco stabile nel tempo, in particolare in relazione ad alcuni fattori ambientali quali temperatura, luce ed ossigeno. Al fine di poter garantire la somministrazione alle bovine di un prodotto stabile nel tempo e rappresentativo di quello della pianta fresca, è stata studiata la stabilità sia delle aloine che degli acemannani, β -polisaccaridi caratteristici dell'aloè cui sono ascritte proprietà nutraceutiche. L'omogeneizzato tal quale è stato conservato in differenti regimi termici ed aerobici. In particolare differenti frazioni tal quale di uno stesso omogeneizzato a base d'Aloe sono stati conservati a temperature ambiente (+22°C), frigorifero (+4°C) e freezer (-18°C). Alcuni campioni sono stati preventivamente degasati mediante flusso di azoto gassoso, simulando un ambiente povero di ossigeno. A 5 tempi prestabiliti, su un arco temporale di circa 2 mesi, l'omogeneizzato in ciascuna condizione di conservazione è stato analizzato per la determinazione del contenuto in aloina e β -polisaccaridi. I campioni d'Aloe conservati a temperatura di frigorifero e degassati hanno mostrato la massima stabilità dell'aloina rispetto a quelli mantenuti a temperatura ambiente (tempo di scomparsa dell'aloina, DT50, pari a 40 giorni e 20 giorni a 22 °C e 4 °C rispettivamente). I campioni a -18 °C sono risultati stabili per l'intero periodo testato. Per quanto riguarda i β -polisaccaridi, il DT50 è risultato pari a 3 e 11 giorni nei campioni di gel d'aloè omogeneizzato e conservato a 22 °C e 4 °C rispettivamente. Anche in questo caso, i campioni sono risultati stabili a -18 °C. Nei campioni conservati a temperatura ambiente e frigorifero, non degasati è stato evidenziato un graduale cambiamento di colore della massa vegetale, oltre che uno sviluppo di muffe bianche. Queste ultime sono emerse prima (12 giorni) nei campioni conservati a temperatura ambiente e successivamente (21 giorni) in quelli conservati a temperatura di frigorifero.

Sulla base di questi risultati è stato deciso di conservare in freezer porzioni di omogeneizzato fogliare di 100 o 200 g, da scongelare immediatamente prima della somministrazione. Tali aliquote sono state preparate prontamente dopo l'omogeneizzazione e conservate in buste di plastica sigillate, avendo cura di rimuovere la maggior quota d'aria. In occasione della preparazione di ciascuna partita di omogeneizzato, al fine di monitorare il contenuto nel tempo e conoscere il valore iniziale di aloina, sono stati eseguiti campionamenti.

ii. Valutazione dell'effetto di tale omogeneizzato sul biochimismo ruminale, allestendo una specifica prova sperimentale di fermentazione in vitro (WP1.1, WP1.5, WP1.6, WP1.7, WP1.8).

Questa attività ha indagato la presenza di eventuali effetti dell'aloè sui processi digestivi a livello ruminale. Sono state effettuate due prove in vitro utilizzando un sistema di fermentazione costituito da una batteria di minifermentatori in vetro di capacità nominale di 100 ml. La tecnica prevede l'incubazione del campione (substrato) con liquido ruminale (inoculo) in presenza di un medium composto principalmente da una soluzione tampone e altre soluzioni volte a fornire fattori di crescita e creare un ambiente anaerobico favorevole alla crescita dei batteri ruminanti. Le valutazioni della fermentescibilità si basano sulla misurazione della quantità di gas prodotto nel corso della fermentazione, strettamente correlata alla produzione di acidi grassi volatili. Il liquido ruminale è stato prelevato da due bovine non in lattazione e alimentate con una razione basata su fieno di graminacee (8 kg/capo/giorno), concentrato (1 kg/capo/giorno) e integrazione oligominerale e vitaminica. Il prelievo è stato effettuato al mattino a distanza di circa 6 ore dal pasto e movimentato sotto flusso di anidride carbonica.

Due differenti campioni di alimenti (fieno di medica e farina di orzo), preventivamente macinati a 1 mm sono stati impiegati come substrato per le fermentazioni, alla dose di 0.5 g di materiale tal quale per unità di fermentazione.

Immediatamente prima dell'aggiunta dell'inoculo ruminale, nelle unità di fermentazione delle tesi sperimentali sono state aggiunte quantità crescenti di omogeneizzato fresco di *Aloe arborescens*, corrispondenti ad un impiego di 40, 200 e 1000 g / capo / giorno per una ipotetica bovina con un volume ruminale pari a 100 litri.

Una tesi di controllo negativo è stata allestita con solo inoculo ruminale, quindi senza alcun substrato, per tenere conto degli effetti della quota di sostanza organica sospesa nell'inoculo impiegato nelle tesi sperimentali. Sono state inoltre predisposte altre tesi di controllo positivo dove al liquido ruminale sono state aggiunte dosi di omogeneizzato di aloè equivalenti alle quantità di esso utilizzata nelle diverse tesi, in questo caso per tenere conto anche dell'effetto attribuibile al materiale fermentescibile presente nell'omogeneizzato e poter quindi meglio evidenziare quello dovuto invece al solo apporto di enzimi.

La produzione di gas è stata misurata a 2, 4, 6, 8, 14, 20 e 24 ore dall'avvio della fermentazione. La fermentazione è stata interrotta dopo 8 e 24 ore (tre repliche per ogni tesi) immergendo le bottiglie in un bagno di acqua e ghiaccio. Il contenuto delle bottiglie è stato quindi filtrato e sciacquato ripetutamente. Il filtro con il materiale indigerito è stato essiccato e analizzato per il contenuto in sostanza secca.

Per ogni bottiglia, i volumi cumulativi di gas ottenuti a ciascun tempo di incubazione (rapportati alla sostanza organica incubata), sono stati elaborati utilizzando la procedura NLIN del SAS, secondo il seguente modello:

$$\text{Volt} = b * (1 - e^{-ct})$$

dove:

Volt = volume misurato al tempo t (ore)

b = massima produzione potenziale di gas

c = velocità di produzione di gas

t = tempo (ore).

I principali risultati sono presentati nei grafici 1 e 2, che illustrano i dati relativi alla digeribilità in vitro della sostanza secca (IVDMD). L'impiego dell'aloë ha inciso poco sulla capacità digestiva della micropopolazione ruminale. Infatti, sia al controllo intermedio effettuato dopo 8 ore di fermentazione (valore prossimo a quello del tempo medio di permanenza dei concentrati nel rumine di una bovina in lattazione) sia a quello finale, dopo 24 ore (analogo a quello di permanenza di foraggi quali la medica nello stesso rumine) non si sono registrate differenze di rilievo tra le diverse tesi a confronto. Si può comunque osservare come l'aggiunta di aloë comporti una maggiore digestione del foraggio di medica al tempo più breve, mentre la digeribilità della farina di orzo non è stata modificata. A 24 ore si nota un certo miglioramento nella digeribilità di entrambi i materiali fermentati con l'impiego dell'aloë alle dosi più elevate (peraltro difficilmente utilizzabili nella pratica zootecnica).

I dati relativi alla produzione di gas sono invece illustrati nel grafico 3. Le differenze tra le tesi sono state molto contenute e l'aloë non ha modificato la quantità di gas complessivamente prodotta in 24 ore di fermentazione in vitro.

Senza enfatizzare tale risultato si può asserire che l'aggiunta di aloë non penalizza i processi digestivi ruminali sia nel caso di alimenti fibrosi (medica) quanto di prodotti ricchi in amido (orzo).

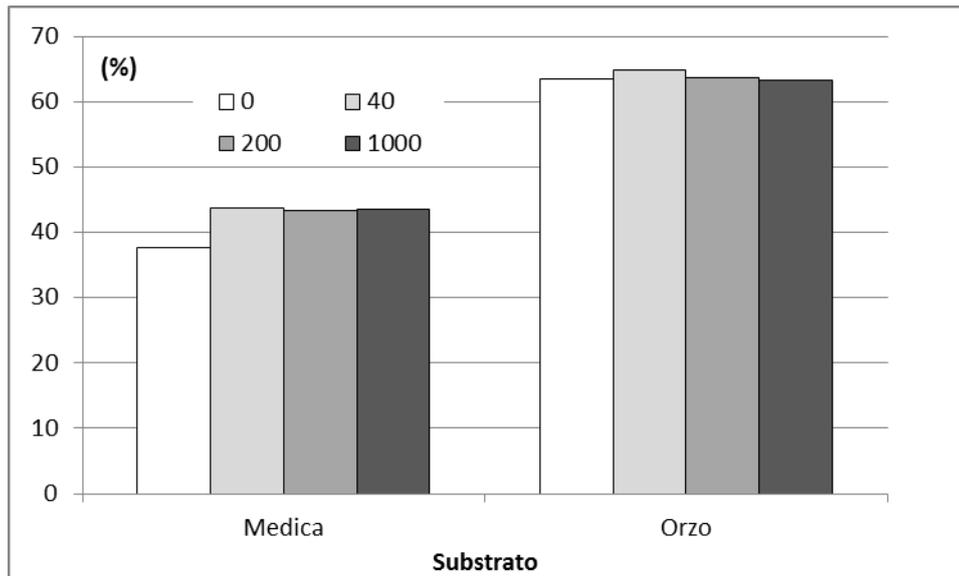


Grafico 1: Effetto dell'aggiunta di un omogeneizzato fresco di *Aloe arborescens* (le dosi sono espresse come g/100 l di contenuto ruminale) sulla digeribilità in vitro della sostanza secca (IVDMD) di un fieno di medica e di una farina di orzo dopo 8 ore di incubazione.

Questo suggerisce che l'aloë potrebbe avere avuto un effetto positivo sull'efficienza delle sintesi microbiche in quanto risulta diminuito il rapporto tra gas prodotto e sostanza digerita.

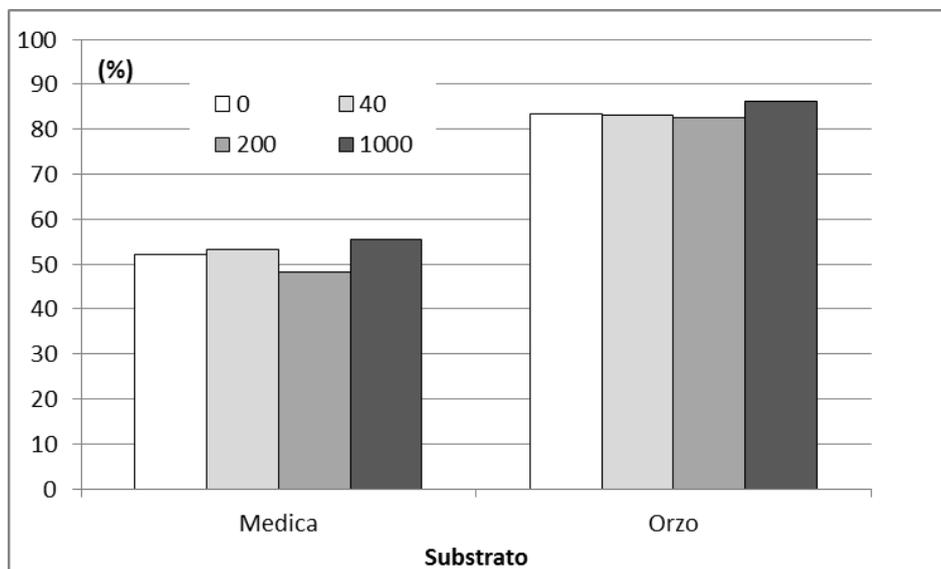


Grafico 2: Effetto dell'aggiunta di un omogeneizzato fresco di *Aloe arborescens* (le dosi sono espresse come g/100 l di contenuto ruminale) sulla digeribilità in vitro della sostanza secca (IVDMD) di un fieno di medica e di una farina di orzo dopo 24 ore di incubazione.

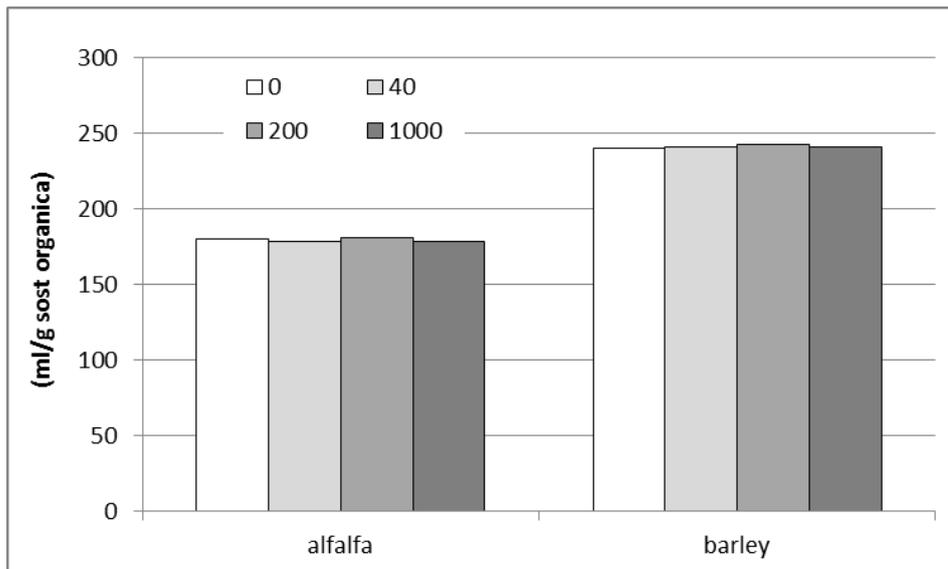


Grafico 3: Effetto dell'aggiunta di un omogeneizzato fresco di *Aloe arborescens* (le dosi sono espresse come g/100 l di contenuto ruminale) sulla produzione di gas in vitro, dopo 24 ore di incubazione, impiegando come substrato un fieno di medica oppure una farina di orzo.

L'effetto positivo osservato con le dosi più elevate di omogeneizzato, pur non avendo un significato pratico sono comunque interessanti perché indicano che, anche a dosaggi 5 - 10 volte più elevati rispetto a quelli presumibilmente adottabili nell'alimentazione delle bovine da latte, l'aloè non interferisce negativamente con il metabolismo ruminale ma, al contrario, tende a migliorarne la capacità digestiva.

Per quanto concerne il contenuto di aloine, è stato infine verificato che sin dall'ottava ora di fermentazione non si è potuta rilevare alcuna traccia nei fermentati. Ciò suggerirebbe una loro rapida degradazione da parte dei batteri ruminali oppure una rapida trasformazione o coniugazione con altre sostanze.

III. Ottimizzare la metodica di analisi di alcune componenti dell'aloè (antrachinoni) (WP2.3).

a) Metodo di analisi delle aloine in omogeneizzati d'Aloè e in digestati ruminali

Una metodica analitica ad hoc per la determinazione dell'aloina è stata sviluppata considerando sia le condizioni di estrazione che la determinazione strumentale. Entrambi i fattori sono stati studiati in modo da garantire adeguata precisione, accuratezza, specificità e robustezza del metodo interno. Da ciascun campione da sottoporre ad analisi, sono stati prelevati 2 g dopo omogeneizzazione con Ultra-Turrax, miscelati con 4 mL di soluzione NaCl al 20% in acqua distillata e infine addizionati 8 mL di miscela estraente etile acetato -

metanolo (1:9 v/v). Dopo agitazione per 10 minuti con vortex, il campione è stato centrifugato (2000 giri/min per 15 min.) e la fase organica surnatante prelevata. Il campione è stato estratto con altri 4 mL di miscela, agitato per 10 minuti con vortex e centrifugato per altri 15 minuti. La seconda aliquota di estratto (fase surnatante) è stata prelevata e riunita con quella precedente. Tutte le soluzioni per l'analisi sono state preparate dall'estratto, successivamente diluito 1:300 con metanolo, inserite in vials ed analizzate tramite cromatografia liquida con rivelazione a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

L'acquisizione multiple reaction monitoring (MRM) è stata effettuata con due ioni derivati aventi un rapporto massa/carica superiore a 100, per garantire un'elevata specificità dell'analisi. Le condizioni strumentali di analisi sono state le seguenti:

| | |
|------------------|---|
| fase mobile | acqua (A) e metanolo (B) |
| flusso | da 0 mi. a 2.5 min. 65 % B, da 4 min. in poi 80 % B |
| colonna | Agilent zorbax Eclipse plus C18 100*3.0 mm, 3.5 µm |
| Volume iniettato | 5 µL |
| Condizioni MS: | polarità: negativa, interfaccia ElectroSpray Ionization (ESI) |
| Transizioni MRM | aloina: m/z da 417 a 297 dwell 600 energia di collisione 15 V |
| aloe-emodina: | m/z da 269 a 240 dwell 300 energia di collisione 25 V |

La quantificazione è stata realizzata con il metodo dello standard esterno e la calibrazione dello strumento eseguita per ciascun giorno d'analisi impiegando uno standard di riferimento certificato. Tutti i risultati ottenuti sono poi stati espressi in mg kg⁻¹, tenendo conto del fattore di diluizione applicato.

b) Metodo di analisi del contenuto in antrachinoni nel plasma

Tutti i campioni di plasma sono stati analizzati con metodo interno, mediante estrazione in solvente e determinazione LC/MS/MS.

Prove preliminari sono state condotte per valutare le migliori condizioni di estrazione soprattutto in relazione alla necessità di precipitare le proteine, in relazione alla stabilità dell'aloina e dell'aloe-emodina in differenti solventi, alla stabilità nell'estratto, all'effetto matrice (soppressione ionica) ed al recupero da plasma. Le migliori condizioni di estrazione sono state osservate in metanolo acidificato (1% HCOOH), sia per quanto riguarda la precipitazione delle proteine plasmatiche, che la stabilità di aloina ed aloe-emodina in solvente ed in estratto. In tali condizioni, tuttavia, è stata osservata una significativa soppressione ionica nella determinazione strumentale LC-MS/MS, per cui si è

deciso di procedere con quantificazione mediante standards in matrice. In tali condizioni, sono state condotte prove di recupero a tre livelli di fortificazione (12, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), con 3 replicati per livello. Il recupero medio è risultato pari a 83% (RSD=15%) per aloina e 87% (RSD=21%) per aloe-emodina.

La determinazione del contenuto di aloina ed aloe emodina è avvenuta a partire da 400 μL di plasma, estratti con 1 mL di acido formico all'1% in metanolo, agitati per 3 minuti su vortex e centrifugati (5000 giri per 6 minuti). La fase surnatante è stata prelevata, filtrata con filtri da 0.4 μm , inserita in vials e sottoposta ad analisi LC-MS/MS con acquisizione MRM. Le condizioni strumentali di analisi sono state le seguenti:

| | |
|------------------|---|
| fase mobile | acqua (A) e metanolo (B) |
| flusso | da 0 min. a 2.5 min. 65 % B, da 4 min. in poi 80 % B |
| colonna | Phenomenex PFP(2) 100*2.6 mm, 2.1 μm |
| Volume iniettato | 10 μL |
| Condizioni MS: | polarità: negativa, interfaccia ElectroSpray Ionization (ESI) |
| Transizioni MRM | aloina: m/z da 417 a 297, dwell 600, energia di collisione 15 V |
| aloe-emodina: | m/z da 269 a 240, dwell 300, energia di collisione 25 V |

La quantificazione è stata realizzata con il metodo dello standard esterno e la calibrazione dello strumento eseguita per ciascun giorno d'analisi impiegando lo standard di riferimento certificato in matrice (matrix-matched standard). Tutti i risultati ottenuti sono poi stati espressi in $\mu\text{g L}^{-1}$, tenendo conto del fattore di diluizione applicato.

c) Set up e validazione metodo analitico per la determinazione di antrachinoni nel latte

Analogamente a quanto fatto per il plasma, anche sul latte sono state condotte prove preliminari per eliminare la frazione lipidica, ottimizzare il recupero e ridurre la soppressione ionica di massa. La determinazione del contenuto di aloina ed aloe emodina è avvenuta a partire da 2 mL di latte, acidificati con 300 μL di acido formico ed estratti con 3 mL di acetonitrile, agitando per 3 minuti su vortex e centrifugando (5000 giri per 6 minuti). La fase surnatante è stata prelevata, filtrata con filtri da 0.4 μm , inserita in vials e sottoposta ad analisi LC-MS/MS con acquisizione MRM. Le condizioni strumentali di analisi sono state le stesse usate per la determinazione degli analiti nei campioni di plasma, ma è stata analizzata la sola aloina in ragione dell'assenza di aloe-emodina dal torrente ematico.

La quantificazione è stata realizzata con il metodo dello standard esterno e la calibrazione dello strumento eseguita per ciascun giorno d'analisi impiegando lo standard di riferimento certificato in matrice (matrix-matched standard). Tutti i risultati ottenuti sono poi stati espressi in $\mu\text{g L}^{-1}$, tenendo conto del fattore di diluizione applicato.

In tali condizioni, sono state condotte prove di recupero a tre livelli di fortificazione (12, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$), con 3 replicati per livello. Il recupero medio è risultato pari a 70% (RSD=17%).

IV. Valutare l'assorbimento ematico di antrachinoni contenuti nell'omogeneizzato di aloe in bovine da latte in fase medio-avanzata (WP2: WP2.1, WP2.2, WP2.4)

Tale prova è stata condotta con lo scopo di verificare il possibile assorbimento intestinale ed il conseguente passaggio nel plasma di antrachinoni dopo somministrazione unica di un preparato di Aloe a bovine da latte. La prova è stata eseguita presso lo stabulario dell'Istituto di Zootecnica della Facoltà di Agraria di Piacenza, in condizioni ambientali controllate: fotoperiodo costante (14 ore di luce e 10 di buio al giorno); temperatura controllata ($23\text{-}25^{\circ}\text{C}$ nei periodi con elevate temperature esterne e $18\text{-}20^{\circ}\text{C}$ nella parte restante dell'anno) e umidità relativa costante (valori medi oscillanti attorno al 60%). Lo stabulario dispone di poste fisse, mangiatoie individuali dotate di tramoggia per la distribuzione computerizzata del concentrato, palette per la distribuzione dei foraggi regolate da un temporizzatore e misuratori della quantità d'acqua consumata da ciascuna bovina. I pasti dei foraggi (fieno e silo-mais) sono somministrati ad intervalli regolari di 12 ore (8:00 a.m. e p.m.), mentre il concentrato è distribuito in 8 pasti uguali offerti ad intervalli di 3 ore, a partire da 30 minuti prima della distribuzione di foraggi del mattino. Duecento grammi di omogeneizzato di Aloe arborescens sono stati somministrati oralmente assieme ai foraggi del mattino, a 6 bovine in fase medio-avanzata di lattazione, in buono stato di salute perfettamente adattate alle condizioni dello stabulario dell'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del S. Cuore ed ai prelievi ematici. Contestualmente all'Aloe è stata somministrata una quota di vitamina A rumino-protetta in ragione di 50000 UI per kg di sostanza secca ingerita, allo scopo di verificare la velocità di transito del concentrato e delle particelle fini presenti nella dieta (Bertoni et al., 1997)¹.

¹ BERTONI G., TREVISI E., BANI P., AMENDOLA F. 1997. Effetti della potenzialità lattifera sulla velocità di transito e sulla digeribilità degli alimenti nella vacca da latte. Atti XII Congr. Naz. A.S.P.A., Pisa, 23-26 giugno, **12**: 15-16.

Immediatamente dopo la somministrazione dell'Aloe e della vitamina A sono stati eseguiti prelievi ematici frequenti in modo da poter descrivere la cinetica di assorbimento della vitamina A, dell'aloina e dell'aloemodina. In particolare è stato realizzato un prelievo prima della somministrazione dell'omogeneizzato d'Aloe (e vitamina A), nonché 2, 4, 6, 8, 11 e 24 ore dopo la sua somministrazione. Tutti i prelievi ematici sono stati eseguiti dalla vena giugulare con provette sottovuoto contenenti litio-eparina come anticoagulante. I campioni sono stati immediatamente collocati in acqua e ghiaccio, e sottoposti a centrifugazione (3500 giri per 16 minuti a 4 °C) necessaria per la separazione del plasma dal sangue. Il plasma ottenuto è stato poi congelato in più frazioni a -20 °C fino all'analisi. Inoltre le bovine riceventi l'aloemodina sono state monitorate nel giorno della somministrazione e nei giorni seguenti per verificare il loro stato di salute, l'ingestione di sostanza secca e la produzione di latte.

A seguito della somministrazione di aloemodina non è stato osservato alcun effetto negativo, come confermato dall'assenza di problemi di salute e dalla mancanza di variazioni a livello di ingestione e di produzione di latte.

Per quanto riguarda i dati relativi alla presenza dei vari principi somministrati e monitorati a livello del plasma sono stati espressi come media \pm deviazione standard della determinazione in duplicato di ciascun campione dei 6 animali impiegati nella ricerca e sono riportati nella tabella 1. Sulla base dei risultati ottenuti si può osservare come:

- ✓ la vitamina A ha mostrato il tipico andamento delle bovine in fase avanzata di lattazione. In particolare ha mostrato il picco tra 8 ed 11 ore (in media 11 ore; tabella 1), un tempo di prima comparsa pari a $1,14 \pm 1,10$ ore e una velocità media di transito pari a $44,8 \pm 31,1$ %/h;
- ✓ l'aloemodina ha mostrato un assorbimento più rapido di quello del palmitato ed è stata ritrovata a livello ematico a partire dalla seconda ora dalla somministrazione in 1 soggetto su 4. Il livello ematico è risultato dell'ordine di grandezza dei $\mu\text{g L}^{-1}$, e la presenza di aloemodina è stata rilevata anche dopo 24 ore dalla somministrazione, seppure a livelli prossimi al limite minimo di rilevazione e pertanto non sempre quantificabili. Il picco di assorbimento dell'aloemodina è stato osservato a circa 4 ore dalla somministrazione di Aloe in 2 soggetti ed a circa 11 ore nei rimanenti altri due, a conferma che il passaggio dell'omogeneizzato di Aloe dal rumine è rapido, simile

a quello dei liquidi (2 soggetti) o tutt'al più delle particelle solide fini (2 soggetti). E' interessante osservare come tale molecola sia ancora presente 24 ore dopo la sua

Tabella 1 – Andamento della vitamina A palmitato e dell'aloina nel plasma di 6 bovine in fase medio-avanzata di lattazione, dopo la loro somministrazione avvenuta in coincidenza del primo pasto di concentrato.

| Ore da somministrazione (T) | Vitamina A palmitato (% valore a T0) | Aloina ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 100,0 \pm 0,0 | 0,00 (N.D.) |
| 2 | 164,3 \pm 148,1 | 0,35 \pm 0,61 |
| 4 | 325,5 \pm 198,8 | 6,20 \pm 5,81 |
| 6 | 539,5 \pm 544,9 | 3,35 \pm 3,19 |
| 8 | 641,4 \pm 636,9 | 2,76 \pm 2,03 |
| 12 | 729,4 \pm 717,4 | 2,15 \pm 1,51 |
| 24 | 321,0 \pm 192,3 | 0,88 \pm 0,57 |

ND = al di sotto del limite di rilevamento

somministrazione, pur in modeste quantità ed al limite della rilevazione analitica;

- ✓ l'aloë-emodina non è invece mai stata rilevata in nessun campione, indicando che non v'è assorbimento di tale molecola.

Nel complesso l'assorbimento di aloina appare rapido, ben più elevato della vitamina A almeno in 2 soggetti su 6, ma presenta una notevole differenza tra individui, che merita di essere approfondita. Il fatto che dopo 24 ore dalla somministrazione dell'omogeneizzato sia ancora rilevabile nel plasma suggerisce una sua persistenza e, quindi, un suo possibile ruolo a livello metabolico e fisiologico. Occorre tuttavia considerare che gli animali utilizzati per tale test erano in fase avanzata di lattazione e quindi con un transito digestivo piuttosto lento ed un livello di assunzione di sostanza secca inferiore a quello delle bovine più fresche (e più produttive).

v. Valutazione dell'omogeneizzato di Aloe su bovine da latte nella fase di periparto (WP3.1)

Questa attività ha rappresentato la fase più rilevante della ricerca perché ha avuto lo scopo di monitorare gli effetti della somministrazione di aloë sullo stato di salute, sulla produzione quanti-qualitativa del latte, sul profilo metabolico ed infiammatorio delle

bovine da latte, nonché verificare eventuali effetti sui vitelli alimentati con il colostro materno.

Definizione del dosaggio. A seguito dei risultati ottenuti dalle precedenti attività sperimentali, le due UO hanno stabilito i dosaggi dell'omogeneizzato di *Aloe arborescens* da somministrare alle bovine nel corso del periparto. La dose inferiore (A1) è stata fissata in 100 g/capo/d, quantità che non ha evidenziato alcuna conseguenza negativa a livello di fermentazioni ruminanti e con un apporto di aloina, se riferito al peso vivo, inferiore a quello assunto da una persona che segue una cura prolungata a base di aloe. Il dosaggio superiore (A2) è stato invece fissato a 200 g/capo/d, ovvero il doppio di A1, così come già era stato ipotizzato nel protocollo (WP 3.1) e considerato che a livello ruminale non vi sono stati effetti negativi, ma semmai positivi.

In secondo luogo è stato anche definito il protocollo per la preparazione, conservazione e somministrazione di un prodotto standardizzato nel tempo. Sulla base delle precedenti fasi di progetto, che hanno consentito di caratterizzare l'essenza vegetale e le sue trasformazioni durante le manipolazioni, si è stabilito che la preparazione più adeguata del prodotto di Aloe consistesse nella sua omogeneizzazione con apposito mulino; nel frazionamento alle dosi di somministrazione; nel rapido congelamento a -20°C senza l'aggiunta di alcun additivo e nel suo scongelamento al momento della somministrazione. In questo modo il preparato si è dimostrato stabile all'ossidazione e di facile somministrazione alle bovine.

Stalla sperimentale. La prova è stata realizzata presso l'allevamento bovino del Centro di Saggio CERZOO di proprietà dell'Università Cattolica del S. Cuore, che presenta condizioni di allevamento, alimentazione e gestione rappresentative delle procedure operative tipiche italiane coniugate ad una elevata standardizzazione e controllo delle procedure. Le bovine sono ospitate in un'unica stalla caratterizzata da una corsia di alimentazione su pavimento pieno e da una zona di riposo con cuccette individuali su lettiera di paglia, rinnovata ogni 3-4 giorni. Lo stabulario è dotato di un sistema di condizionamento ambientale (ventilatori combinati a nebulizzatori e gocciolatori collocati sulla corsia di alimentazione), che consente di mantenere la temperatura ambientale entro range di sostanziale termoneutralità anche nei periodi estivi più caldi. La mungitura è effettuata in una sala a spina di pesce (6+6) ad intervalli di 12 ore (1:30 e

13:30). Lo stabulario è inoltre provvisto di sistemi automatizzati di rilevazione delle performance e di talune condizioni sanitarie delle bovine, per mezzo dei quali, in occasione di ogni mungitura, si procede all'identificazione individuale dei soggetti con due differenti dispositivi, un podometro posizionato sull'arto posteriore destro ed un collare, che permettono l'acquisizione, in due appositi *softwares*, dei seguenti dati:

- ✓ attività motoria (numero passi), produzione di latte, conducibilità elettrica e peso vivo (podometro, sistema AFIMILK, SAE Afikim, Israele);
- ✓ attività motoria (movimenti del collo) e attività ruminativa (collare, sistema RUMINACT, Milkline, Podenzano, Piacenza).

Secondo tali procedure standard, lo stato di salute individuale delle bovine è valutato più volte al giorno e viene richiesto tempestivamente l'intervento del veterinario aziendale in caso di necessità.

Agli animali è somministrata una razione completa (o Unifeed) in un'unica distribuzione (al mattino), contenente principalmente insilato di mais, fieno di erba medica e concentrati, le cui caratteristiche chimico-nutrizionali sono state mantenute costanti nel corso della prova. Le razioni assegnate alle bovine sono state formulate in modo da coprire i fabbisogni consigliati da INRA (1989) per l'energia e NRC (2001) per le proteine, sulla base dell'età, del peso vivo e della lunghezza media di lattazione rappresentative della mandria. Gli oligoelementi e le vitamine sono somministrate in accordo con le disposizioni della vigente legislazione UE, a copertura dei fabbisogni.

Scelta delle bovine in sperimentazione. Nel complesso sono state selezionate 36 bovine sulla base delle seguenti caratteristiche: età, numero lattazioni, peso vivo, stato di ingrassamento, merito genetico, epoca di parto. Le bovine sono state suddivise in 3 gruppi omogenei:

- ✓ controllo (12 bovine, senza alcuna aggiunta alimentare all'unifeed = CTR),
- ✓ A1 (12 bovine, 100 g/d di aloe a partire da 2 settimane prima della data presunta del parto sino a 14 giorni dopo il parto) e
- ✓ A2 (12 bovine, 200 g/d di aloe per lo stesso periodo del trattamento A1).

L'omogeneizzato di aloe è stato somministrato individualmente alle bovine dei trattamenti A1 e A2, al mattino in occasione della distribuzione della foraggiata. Per avere la certezza della reale assunzione della quota di aloe assegnata, la somministrazione è avvenuta per via orale, utilizzando un apposito contenitore di

plastica per uso alimentare, facendo bere alla bovina l'omogeneizzato di aloe diluito in acqua a temperatura di circa 37°C.

Controlli sulle bovine. Oltre alle rilevazioni consentite dai dispositivi individuali collocati sugli animali (produzione di latte, attività motoria, conducibilità elettrica e peso vivo con il podometro e attività ruminativa con il collare) le bovine sono state singolarmente monitorate nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione, per i seguenti aspetti:

- ✓ stato di salute, anche con l'ausilio delle indicazioni provenienti dai dispositivi automatici, è stato richiesto l'intervento del veterinario aziendale in presenza di sintomi patologici (es. febbre, ridotta ruminazione). Le diagnosi e gli eventuali trattamenti farmacologici sono stati registrati;
- ✓ stima dello stato di ingrassamento (metodo proposto dall'*Agricultural Development and Advisory Service*, su scala 1-5), ogni due settimane ed il giorno dopo il parto;
- ✓ temperatura rettale, a circa -14, -7, -3 giorni dal parto, il mattino seguente al parto e dopo 3 e 7 gg dallo stesso;
- ✓ due visite ginecologiche tra 7-10 e 28-35 giorni di lattazione, quindi ogni intervento inseminativo o visita sino alla diagnosi di gravidanza o alla riforma;
- ✓ prelievi ematici dalla vena giugulare immediatamente prima del pasto del mattino, rispettivamente circa 21, 14 (prima della somministrazione dell'omogeneizzato), 7 e 3 giorni prima del parto presunto; il mattino seguente il parto, nonché a 3, 7, 14 (ultimo giorno della somministrazione del prodotto), 21, 28 giorni di lattazione. L'ematocrito è stato determinato immediatamente, mentre al termine della prova, sul plasma stoccato a -20°C, si è proceduto alla determinazione dei seguenti parametri: aptoglobina, ceruloplasmina, albumine, colesterolo, paraoxonasi, bilirubina, zinco, calcio, proteine totali, globuline, mieloperossidasi, ROM totali, GOT, GGT, glucosio, NEFA, BHB, creatinina, urea, vitamina A, e vitamina E (WP3.3). Inoltre, il plasma è stato analizzato per la determinazione della concentrazione di antrachinoni caratteristici (aloina ed aloe-emodina);
- ✓ prelievi rappresentativi di colostro della prima mungitura e di latte dalla mungitura del mattino a 7, 14, 21 e 28 giorni di lattazione rispettivamente. Tali campioni sono analizzati entro poche ore dal prelievo con uno strumento (MilkoScan™ FT120) che si avvale dell'analisi ad infrarosso con trasformata di Fourier (FTIR) per la

determinazione di: grasso, proteine, caseine, urea, lattosio, acidità titolabile, attitudine alla coagulazione. Inoltre su apposite aliquote è stato determinato il contenuto in cellule somatiche ed è stata eseguita la ricerca di alcuni antrachinoni caratteristici (aloina ed aloè-emodina).

Inoltre sono state eseguite le analisi dei principi immediati (umidità, proteina grezza, sostanze grasse grezze, fibra grezza, NDF, ADF, amido, ceneri) su tutti gli alimenti somministrati alle bovine, omogeneizzato di aloè incluso. In particolare, sull'omogeneizzato di Aloè utilizzato durante la sperimentazione si è proceduto anche alla determinazione del contenuto in aloina A e aloina B, ad ogni preparazione, nonché del contenuto in β -polisaccaridi (acemannani) nel parenchima fogliare a cura dell'UO2. Le analisi sui vari componenti della dieta sono state poi utilizzate per la stima delle razioni effettivamente ingerite dalle bovine (WP3.2).

Elaborazione Statistica: Delle 36 bovine utilizzate nel corso della prova sono state escluse dall'elaborazione 6 soggetti: 4 bovine (1 in CTR e A2 e 2 in A1) perché hanno manifestato zoppie durante la fase di asciutta e nonostante la visita podologica e le eventuali terapie eseguite al termine della lattazione precedente; 2 bovine perché hanno anticipato il parto (1 in CTR ed 1 in A2) e ciò non ha consentito la raccolta completa dei campioni programmati in asciutta e, nel caso della bovina appartenente al gruppo A2 di completare il trattamento previsto con aloè. Pertanto, anche in considerazione del fatto che i soggetti previsti nella ricerca erano 10 per gruppo, si è preferito escludere le bovine con qualche anomalia dalla elaborazione per evitare un aumento della variabilità includendo fatti estranei al trattamento. Nella tabella 2 sono riportate le caratteristiche delle bovine al momento della formazione dei gruppi. L'analisi statistica è pertanto stata eseguita su 30 capi (10 per gruppo) utilizzando l'analisi della varianza per osservazioni ripetute, della procedura MIXED del software package SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Prima dell'analisi si è proceduto alla verifica della distribuzione normale di ciascun parametro mediante calcolo degli indici di asimmetria rispetto agli assi delle ascisse (curtosi) e delle ordinate e, quando necessario, alla normalizzazione dei dati mediante trasformazione logaritmica, quadratica o con radice quadrata. Il modello statistico ha incluso i fattori di classificazione fissi (gruppo di trattamento, distanza parto), il fattore casuale individuale (bovina entro gruppo) e l'interazione gruppo*distanza parto.

Tabella 2 – Caratteristiche delle bovine utilizzate nel corso della sperimentazione.

| Bovina | Gruppo | Lattazioni inclusa quella della prova (n°) | Peso Vivo a 30 giorni pre-parto (kg) | EVM (kg/lattazione precedente) | BCS a 30 giorni pre-parto (Punti) | Lunghezza asciutta (gg) | Somministrazione Aloe (gg) | |
|--------------|-----------|--|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------|
| | | | | | | | pre-parto | post-parto |
| 378 | CTR | 2 | 700 | 11056 | 2,40 | 56 | | |
| 324 | | 4 | 785 | 14871 | 2,40 | 70 | | |
| 347 | | 3 | 685 | 11153 | 2,45 | 55 | | |
| 304 | | 5 | 740 | 12801 | 2,75 | 107 | | |
| 275 | | 5 | 820 | 10937 | 3,10 | 59 | | |
| 393 | | 2 | 740 | 13420 | 2,75 | 51 | | |
| 374 | | 3 | 655 | 11337 | 2,85 | 58 | | |
| 405 | | 2 | 660 | 10824 | 2,15 | 52 | | |
| 381 | | 2 | 750 | 10925 | 2,80 | 56 | | |
| 331 | | 4 | 740 | 11059 | 2,65 | 59 | | |
| media | | 3,20 | 728 | 11838 | 2,63 | 62 | | |
| ds | | 1,23 | 53 | 1384 | 0,28 | 17 | | |
| 279 | ALOE (A1) | 5 | 760 | 14278 | 2,50 | 52 | 10 | 15 |
| 390 | | 2 | 680 | 9069 | 2,65 | 58 | 12 | 13 |
| 294 | | 5 | 820 | 11808 | 2,15 | 58 | 17 | 15 |
| 407 | | 2 | 610 | 10004 | 2,30 | 55 | 15 | 14 |
| 313 | | 5 | 810 | 9975 | 2,80 | 58 | 18 | 14 |
| 411 | | 2 | 600 | 11429 | 2,40 | 59 | 20 | 14 |
| 331 | | 5 | 700 | 10941 | 2,25 | 52 | 14 | 14 |
| 375 | | 3 | 780 | 14115 | 2,55 | 48 | 10 | 14 |
| 383 | | 2 | 690 | 15456 | 2,30 | 49 | 8 | 16 |
| 349 | | 3 | 775 | 11801 | 3,00 | 74 | 16 | 15 |
| media | | 3,40 | 723 | 11888 | 2,49 | 56 | 14 | 14 |
| ds | | 1,43 | 79 | 2100 | 0,27 | 7 | 4 | 1 |
| 397 | ALOE (A2) | 2 | 640 | 13137 | 2,25 | 59 | 15 | 14 |
| 390 | | 3 | 680 | 11448 | 2,25 | 57 | 16 | 14 |
| 413 | | 2 | 630 | 10788 | 2,30 | 62 | 16 | 14 |
| 253 | | 7 | 690 | 11707 | 2,35 | 63 | 21 | 14 |
| 400 | | 2 | 720 | 12629 | 2,20 | 55 | 13 | 14 |
| 394 | | 2 | 680 | 14562 | 2,30 | 76 | 18 | 14 |
| 403 | | 2 | 630 | 13369 | 2,50 | 57 | 17 | 14 |
| 385 | | 2 | 640 | 9525 | 2,70 | 55 | 15 | 14 |
| 313 | | 4 | 845 | 14579 | 2,90 | 58 | 17 | 13 |
| 376 | | 2 | 670 | 11140 | 2,35 | 56 | 10 | 15 |
| media | | 2,80 | 683 | 12288 | 2,41 | 60 | 16 | 14 |
| ds | | 1,62 | 64 | 1656 | 0,23 | 6 | 3 | 0 |

In particolare il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{iklm} = \mu + G_i + T_k + (G^*T)_{ik} + B_l(i) + e_{iklm}$$

dove:

Y_{ijklm} = osservazione m-esima della l-esima bovina B_l entro l'i-esimo gruppo G_i , alla k-esima distanza parto T_k ;

μ = media totale;

G_i = effetto dell' i -esimo gruppo ($i = A1, A2, CTR$);

T_k = effetto della k -esima distanza parto, con un numero di livelli variabile in funzione dei parametri valutati;

$(G*T)_{ik}$ = effetto dell'interazione tra l' i -esimo gruppo e la k -esima distanza parto;

$Bl(i)$ = effetto dell' l -esima bovina, entro l' i -esimo gruppo;

e_{iklm} = effetto casuale o errore.

L'analisi è stata effettuata utilizzando la migliore tra le 3 strutture di covarianza utilizzata (Compound symmetry, Autoregressive, Spatial power) cioè quella che mostra l'indice AIC (Akaike's Information Criterion; Akaike, 1974) inferiore, come suggerito da Littell et al. (1998, J. Anim. Sci. 76:1216-1231). Il confronto tra i gruppi, a parità di distanza dal parto, è stato analizzato utilizzando l'opzione PDIFF del SAS.

Risultati (WP3.5).

Dieta. Gli alimenti utilizzati per alimentare le bovine nel corso della sperimentazione sono risultati di buona qualità, dal punto di vista igienico e nutrizionale. Le diete offerte alle bovine, sia prima che dopo il parto, sono risultate adeguate a coprire i fabbisogni nutrizionali. Le caratteristiche medie delle razioni utilizzate sono presentate nella tabella 3.

L'omogeneizzato di *Aloe arborescens* ha presentato in media una sostanza secca di 6,89%, con la seguente composizione (dati sul secco): proteine gregge 13,41%, lipidi greggi 1,74%, fibra greggia 12,55%; ceneri 18,40%, estrattivi inazotati 46,10% e fibra neutro detersa 24,10%. Inoltre è stato valutato il contenuto di alcune vitamine (in mg/l di tal quale) e minerali (mg/100 g di tal quale): vitamina A 81,2; vitamina E 1,16 mg/l; β -carotene 3,2 mg/l; sodio 12, potassio 41, calcio 134 e magnesio 31.

La somministrazione dell'aloè è stata effettuata per bocca, onde evitare che l'amarezza del prodotto potesse modificare l'ingestione degli altri alimenti, catturando le bovine al momento della distribuzione della foraggiata che avveniva verso le ore 8:00 in lattazione e le 9:00 in asciutta. Tale somministrazione non ha determinato effetti negativi sugli animali che anzi hanno ingerito regolarmente il prodotto. Onde evitare disparità di trattamento tra le bovine, anche i soggetti di controllo sono stati regolarmente intrappolati ogni mattino nel corso del periparto per un periodo analogo a quello dei soggetti trattati e sono stati avvicinati dal personale preposto alle operazioni sulle bovine.

Tabella 3. Composizione chimico-nutrizionale delle diete somministrate alle bovine nel corso della prova

| INGREDIENTI [% su s.s.] | Vacche in asciutta | Vacche in lattazione |
|--|--------------------|----------------------|
| Silomais | 25,0 | 35,0 |
| Granella di mais | - | 14,2 |
| Fieno di prato disidratato | 51,6 | 12,8 |
| Fieno di medica disidratata | - | 12,6 |
| Farina di soia | 7,3 | 9,0 |
| Mais fioccato | - | 7,2 |
| Semi di girasole | - | 3,2 |
| Semola di mais glutinata | - | 2,8 |
| Supplemento vitaminico minerale [§] | 1,0 | 1,7 |
| Grassi idrogenati | - | 1,6 |
| Paglia di frumento | 15,3 | - |
| COMPOSIZIONE CHIMICA | | |
| Energia Netta Latte [Mcal/kg su s.s.] | 1,36 | 1,70 |
| Proteine Grezze [% su s.s.] | 12,5 | 15,4 |
| NDF [% su s.s.] | 54,9 | 34,6 |
| Amido e Zuccheri [% su s.s.] | 12,5 | 29,0 |
| Lipidi [% su s.s.] | 2,7 | 3,5 |
| [§] 42.9% Ca ₂ PO ₄ ; 28.6% urea; 14.3% MgO; 7.1% NaCl; 7.1% supplemento minerale-vitaminico (1500000 IU/kg vitamina A; 150000 IU/kg vitamina D; 7000 IU/kg vitamina E; 10 mg/kg Co; 70 mg/kg I; 1100 mg/kg Mn; 500 mg/kg Cu; 23 mg/kg Se; 4000 mg/kg Zn) | | |
| Alla razione unifeed è stata aggiunta acqua per mantenere il tenore di sostanza secca al 52%. | | |

Stato di salute. La somministrazione dell'omogeneizzato di *Aloe arborescens*, nelle quantità e con le modalità indicate nel protocollo, non ha determinato effetti negativi sull'appetito. Come sempre dopo il parto un elevato numero di bovine ha presentato almeno una patologia con sintomatologia clinica (53% dei capi). Il gruppo A2 ha mostrato un minor numero di bovine con problemi di salute (40% dei capi vs 60% degli altri 2 gruppi) ed un minor numero di patologie per capo (0,5 problemi/capo vs 0,8 e 1,0 dei gruppi A1 e CTR). Le patologie più comuni sono state la ritenzione (20% dei capi in A1 e 10% in A2 e CTR), la mastite (10% in A1 e CTR, 0% in A2), la chetosi (30% in A1, 10% in A2 e 20% in CTR) e l'endometrite (20% in A1, 10% in A2, 50% in CTR). Nel complesso le patologie sono state lievi e non sempre hanno richiesto l'uso di farmaci allopatici. Anche in questo caso tuttavia la situazione migliore è stata osservata in A2 (un solo trattamento con antibiotici in utero), seguita da A1 (2 trattamenti antibiotici sistemici, uno con sulfamidico in mammella ed un trattamento antinfiammatorio) e da CTR (5 trattamenti con antibiotici: uno sistemico, uno in mammella e 3 in utero; 2 trattamenti con sulfamidici sistemici). A livello della temperatura rettale non sono emerse differenze tra A2 e CTR, mentre A1 ha

mostrato più soggetti con rialzo termico nei primi giorni di lattazione (ben 3 con temperatura prossima a 40°C) ed una temperatura media di circa 0,2°C superiore agli altri due gruppi nella prima settimana di lattazione. Nel complesso quindi la somministrazione di aloe ha evidenziato una situazione migliore rispetto al gruppo di CTR, specie al dosaggio superiore (A2), sia per numero di affezioni, che per numero e tipo di trattamenti allopatrici.

Ruminazione. Per questo aspetto non sono state osservate differenze di rilievo tra i 3 gruppi. L'andamento nel periparto è simile a quello riportato in un recente lavoro del nostro Istituto (Soriani et al., 2012²), con un evidente calo nel giorno del parto. Sebbene i dati meritino un approfondimento statistico, si evidenzia un numero di atti ruminativi medi giornalieri più elevati nel corso del primo mese di lattazione delle bovine che hanno ricevuto aloe.

Stato di ingrassamento e peso vivo. A livello di peso vivo le differenze sono state modeste tra i gruppi, mentre di rilievo è risultata la variazione dello stato di ingrassamento (BCS). In tutte le bovine vi è stata la usuale riduzione di BCS nel corso della prima settimana di lattazione, ma nel gruppo A2 tale riduzione delle riserve corporee è stato significativamente inferiore ($P < 0,05$) tra 21 giorni prima del parto ed il 28° giorno di lattazione sia rispetto ad A1 che CTR: -0,29; -0,47 punti e -0,51 punti rispettivamente in A2, A1 e CTR. Questo risultato indica una minore lipomobilizzazione con l'uso del dosaggio più elevato di aloe ($P < 0,001$ vs CTR e $P < 0,05$ vs A1).

Produzione quanti-qualitativa del latte. La produzione di latte è stata analoga tra i 3 gruppi nel 1° mese di lattazione (grafico 1), anche se le bovine con aloe hanno mostrato una produzione media leggermente più elevata: A1 e A2 38,7 Kg/capo/d rispetto a CTR 37,4 kg/capo/d (NS). A livello della composizione del latte (tabella 4) sono state osservate differenze a livello del:

- ✓ tenore di grasso nella prima settimana di lattazione, che è risultato inferiore in A1 e A2 rispetto al CTR. Tale differenza si è manifestata sia nel colostro, dove tuttavia i

² Soriani N., Trevisi E., Calamari L. 2012. Relationships between rumination time, metabolic conditions and health status in dairy cows during the transition period. J. Anim. Sci. (doi 10.2527/jas.2011-5064)

dati hanno mostrato una maggiore variabilità, che nel campione raccolto al 7° giorno di lattazione ($P < 0,10$ tra A1CTR e $P < 0,05$ tra A2 e CTR);

- ✓ tenore di proteine e caseine, leggermente più elevate in A2 rispetto ad A1 e CTR per l'intero primo mese di lattazione. Al 7° giorno di lattazione la differenza tra A2 e CTR è risultata statisticamente significativa ($P < 0,05$);

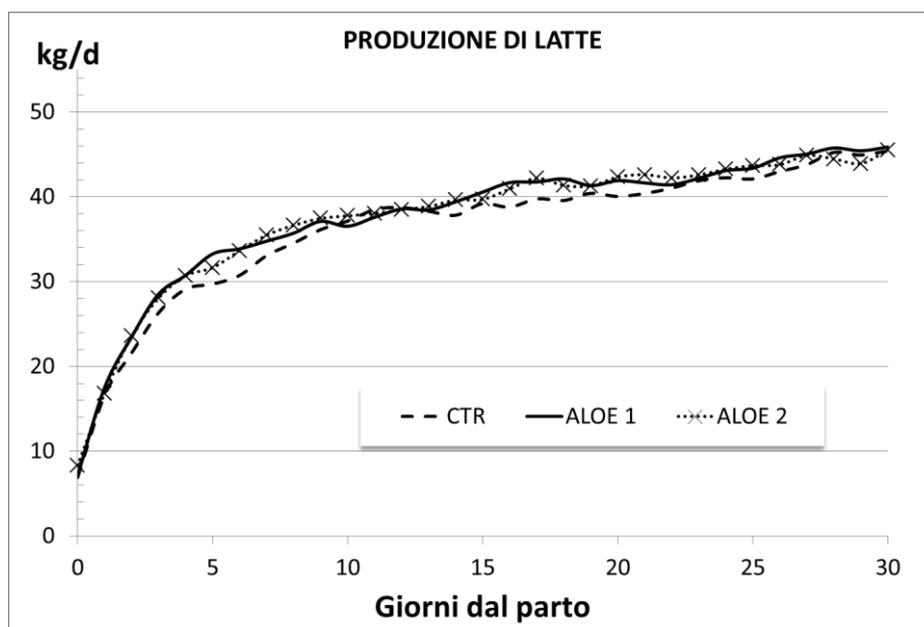


Figura 1. Andamento della produzione di latte nel primo mese di lattazione nelle bovine riceventi 0 (CTR), 100 (A1) o 200 (A2) g/d di omogeneizzato di aloe tra 14 giorni prima e 14 giorni dopo il parto.

- ✓ valore di acidità titolabile, più elevata in A2 rispetto a CTR e con valori intermedi in A1.

Inoltre, il contenuto in cellule somatiche del latte, principale indicatore della sanità della ghiandola mammaria, è risultato più basso nei gruppi che hanno ricevuto l'omogeneizzato di aloe, per l'intero primo mese di lattazione. La differenza è stata più marcata tra i gruppi A2 e CTR ($P < 0,05$ a 21 e 28 giorni di lattazione).

Fertilità. Per quanto riguarda gli indici riproduttivi va preliminarmente osservato che nei gruppi A1 e CTR, 3 e 2 bovine rispettivamente sono state riformate a causa di forza maggiore, senza essere inseminate per la presenza di gravi difetti o affezioni mammarie. In particolare in due bovine, una per gruppo, è stata diagnosticata la presenza di un patogeno (microalga del genere *Prototheca*) nel latte, che non potendo essere curato ha determinato la loro anticipata riforma; in una bovina (gruppo A1) si è verificata una grave

Tabella 4. Andamento dei parametri controllati nel colostro e nel latte nel corso del primo mese di lattazione in bovine riceventi 0 (CTR), 100 (A1) o 200 (A2) g/d di omogeneizzato di aloe tra 14 giorni prima e 14 giorni dopo il parto.

| Parametro | unità di misura | Tesi | Giorni di lattazione | | | | |
|--------------------|-----------------|------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Grasso | % | CTR | 7,38 | 5,16 | 4,10 | 3,59 | 3,71 |
| | | A1 | 6,81 | 4,18 | 4,19 | 3,94 | 3,51 |
| | | A2 | 6,03 | 3,80 | 4,00 | 3,77 | 3,64 |
| Proteine Totali | % | CTR | 18,36 | 3,92 | 3,42 | 3,28 | 3,23 |
| | | A1 | 16,42 | 3,87 | 3,53 | 3,26 | 3,12 |
| | | A2 | 17,98 | 3,99 | 3,55 | 3,38 | 3,26 |
| Lattosio | % | CTR | 2,92 | 4,65 | 4,96 | 4,98 | 5,00 |
| | | A1 | 3,27 | 4,42 | 4,87 | 4,93 | 4,99 |
| | | A2 | 3,06 | 4,81 | 4,99 | 5,07 | 4,76 |
| Urea | mg/dl | CTR | 47,27 | 24,74 | 24,83 | 21,95 | 20,85 |
| | | A1 | 48,07 | 21,60 | 21,00 | 20,20 | 21,41 |
| | | A2 | 38,28 | 22,51 | 20,54 | 20,39 | 21,93 |
| Caseine | % | CTR | \ | 2,81 | 2,48 | 2,38 | 2,38 |
| | | A1 | \ | 2,83 | 2,62 | 2,41 | 2,31 |
| | | A2 | \ | 2,96 | 2,65 | 2,53 | 2,45 |
| Acidità titolabile | °SH/50ml | CTR | \ | 3,87 | 3,39 | 3,16 | 3,09 |
| | | A1 | \ | 4,05 | 3,45 | 3,32 | 3,30 |
| | | A2 | \ | 4,09 | 3,64 | 3,52 | 3,44 |
| Cellule somatiche | n/mcl | CTR | \ | 675 | 1331 | 400 | 826 |
| | | A1 | \ | 235 | 204 | 223 | 233 |
| | | A2 | \ | 152 | 308 | 52 | 273 |

mastite ambientale al 3° mese di lattazione che ha consigliato la riforma immediata; un'altra bovina si è procurata una grave ferita al capezzolo al 4° mese di lattazione, che pure ha causato la riforma anticipata (gruppo CTR), mentre nella quinta bovina, già alla 5° lattazione, la inadeguata funzionalità degli sfinteri dei capezzoli ha comportato la decisione di non procedere ad alcuna inseminazione per l'elevato rischio di affezioni mammarie. Tutto ciò considerato il gruppo A2 ha presentato nel complesso la situazione migliore (100% di bovine gravide, con $2,2 \pm 1,5$ interventi inseminativi/gravidanza ed un intervallo parto concepimento di 115 ± 50 giorni) sia rispetto ad A1 (71% di bovine gravide, con $2,8 \pm 2,2$ interventi inseminativi/gravidanza ed un intervallo parto concepimento di 98 ± 53 giorni) che a CTR (63% di bovine gravide, con $2,0 \pm 1,2$ interventi inseminativi/gravidanza ed un intervallo parto concepimento di 105 ± 57 giorni). Il CTR si è quindi caratterizzato per aver avuto le performance peggiori, attribuibili soprattutto alla riforma di 3 bovine per problematiche connesse all'ipofunzionalità dell'apparato riproduttivo (1 caso di ascesso

all'utero, 1 caso di infezione cronica alla mucosa, 1 caso di infertilità o *repeated breeding*). Valutando questi dati secondo l'indice di fertilità complessiva proposto da Esslemont e Eddy (1977)³, denominato Fertility Status Index (FSI), il gruppo A2 ha presentato la situazione migliore (65 punti), seguito da A1 (45 punti), mentre CTR ha evidenziato la situazione peggiore (20 punti). Considerando che 80 è ritenuto il punteggio FSI ottimale, si può dunque osservare che il trattamento nutraceutico ha determinato un buon miglioramento delle performance riproduttive.

Stato metabolico. A livello metabolico sono emerse molteplici differenze tra i gruppi che hanno ricevuto aloe (specie Aloe 2) rispetto a CTR. Nella tabella 5 sono riportate le medie e deviazioni standard dei 3 gruppi per ciascun parametro determinato. Le differenze degne di nota hanno riguardato:

- ✓ glucosio. La glicemia ha presentato un livello più elevato in A2 nella prima settimana di lattazione rispetto ad A1 e CTR;
- ✓ colesterolo, che ha mostrato un graduale aumento dopo il parto in tutte le bovine, ma più marcato nei due gruppi aloe rispetto al CTR ($P < 0,05$ al 21° e 28° giorno di lattazione vs A2 e $P < 0,05$ al 35° giorno di lattazione vs A1);
ceruloplasmina. Dopo un iniziale aumento nei primi 10 giorni di lattazione, il livello di questa proteina positiva di fase acuta si è progressivamente ridotto in A2, è rimasto praticamente costante in A1, mentre è continuato ad aumentare in CTR. Dal 21° giorno di lattazione le differenze tra A2 e CTR sono risultate statisticamente significative;
- ✓ aptoglobina. Anche questa proteina positiva di fase acuta è aumentata, al pari della ceruloplasmina, dopo il parto, mostrando il picco al 3° giorno di lattazione. Successivamente ha evidenziato un progressivo calo, che è risultato più repentino in A1 ed A2 rispetto al controllo (NS);
- ✓ bilirubina. In tutti i gruppi la bilirubina ha presentato un aumento dopo il parto seguito da un calo. In CTR tale aumento è risultato più marcato ed il calo più lento di A2 (rispettivamente $P < 0,10$ sino al 3° giorno di lattazione e $P < 0,05$ dal 10° al 21° giorno di lattazione), mentre in A1 i livelli sono risultati intermedi agli altri due gruppi;

³ Esslemont, R.J. and Eddy R.G. 1977 The control of cattle fertility: the use of computerized records. Br. Vet. J., 133: 346-355

Tabella 4. Andamento dei parametri ematici nel periparto delle bovine riceventi 0 (CTR), 100 (A1) o 200 (A2) g/d di omogeneizzato di aloe tra 14 giorni prima e 14 giorni dopo il parto.

| Parametro | unità di misura | Tesi | Giorni dal parto | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|--|------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | | -28 | -21 | -14 | -10 | -7 | -3 | 0,5 | 3 | 7 | 10 | 14 | 21 | 28 | 35 |
| Ematocrito | l/l | CTR | 0,333 | 0,313 | 0,302 | 0,318 | 0,318 | 0,320 | 0,341 | 0,330 | 0,327 | 0,320 | 0,290 | 0,295 | 0,283 | 0,298 |
| | | A1 | 0,343 | 0,340 | 0,315 | 0,325 | 0,328 | 0,331 | 0,353 | 0,327 | 0,314 | 0,311 | 0,301 | 0,290 | 0,285 | 0,292 |
| | | A2 | 0,327 | 0,319 | 0,327 | 0,330 | 0,342 | 0,332 | 0,362 | 0,330 | 0,318 | 0,308 | 0,304 | 0,296 | 0,289 | 0,302 |
| Glucosio | mmol/l | CTR | 4,43 | 4,37 | 4,30 | 4,31 | 4,16 | 4,12 | 4,76 | 3,54 | 3,46 | 3,56 | 3,87 | 3,69 | 3,84 | 4,01 |
| | | A1 | 4,20 | 4,12 | 4,27 | 4,17 | 4,13 | 4,09 | 4,63 | 3,39 | 3,46 | 3,56 | 3,51 | 3,74 | 3,86 | 3,97 |
| | | A2 | 4,21 | 4,18 | 4,30 | 4,16 | 4,19 | 4,06 | 4,59 | 3,49 | 3,83 | 3,68 | 3,57 | 3,69 | 3,81 | 3,87 |
| Colesterolo | mmol/l | CTR | 3,06 | 2,79 | 2,44 | 2,43 | 2,21 | 2,11 | 1,92 | 1,82 | 2,12 | 2,33 | 2,66 | 3,34 | 3,79 | 4,43 |
| | | A1 | 3,01 | 2,78 | 2,46 | 2,34 | 2,25 | 2,13 | 1,83 | 1,94 | 2,23 | 2,71 | 3,12 | 3,75 | 4,40 | 5,05 |
| | | A2 | 3,00 | 2,83 | 2,69 | 2,47 | 2,42 | 2,45 | 2,08 | 2,03 | 2,46 | 2,84 | 3,24 | 3,94 | 4,50 | 4,85 |
| Urea | mmol/l | CTR | 3,39 | 3,33 | 3,32 | 3,41 | 3,41 | 4,23 | 4,94 | 4,17 | 3,52 | 3,20 | 3,32 | 3,54 | 3,41 | 3,99 |
| | | A1 | 3,92 | 3,66 | 3,41 | 3,27 | 3,78 | 3,91 | 4,97 | 3,38 | 3,17 | 3,05 | 3,15 | 3,27 | 3,51 | 3,63 |
| | | A2 | 3,75 | 3,57 | 4,16 | 3,39 | 3,41 | 3,34 | 4,17 | 2,73 | 3,12 | 3,26 | 3,56 | 3,42 | 3,70 | 4,33 |
| Calcio | mmol/l | CTR | 2,70 | 2,69 | 2,64 | 2,72 | 2,59 | 2,64 | 2,22 | 2,39 | 2,60 | 2,64 | 2,72 | 2,68 | 2,67 | 2,70 |
| | | A1 | 2,62 | 2,62 | 2,56 | 2,59 | 2,55 | 2,64 | 2,03 | 2,44 | 2,57 | 2,60 | 2,63 | 2,69 | 2,68 | 2,69 |
| | | A2 | 2,60 | 2,62 | 2,59 | 2,54 | 2,58 | 2,55 | 2,13 | 2,38 | 2,62 | 2,54 | 2,55 | 2,67 | 2,63 | 2,59 |
| Zinco | µmol/l | CTR | 14,79 | 14,44 | 13,36 | 13,69 | 12,34 | 11,79 | 9,78 | 10,79 | 11,85 | 12,45 | 14,10 | 13,44 | 11,92 | 13,54 |
| | | A1 | 14,36 | 14,02 | 13,38 | 13,44 | 12,70 | 12,58 | 8,47 | 10,44 | 12,80 | 13,16 | 12,61 | 13,37 | 12,37 | 13,54 |
| | | A2 | 13,73 | 13,78 | 12,91 | 12,89 | 13,50 | 13,34 | 8,91 | 11,68 | 12,57 | 12,92 | 12,29 | 12,22 | 11,97 | 11,61 |
| Ceruloplasmina | µmol/l | CTR | 3,10 | 2,98 | 2,84 | 2,82 | 2,84 | 2,73 | 2,78 | 3,49 | 3,18 | 3,12 | 3,32 | 3,40 | 3,63 | 3,64 |
| | | A1 | 2,86 | 2,87 | 2,78 | 2,73 | 2,70 | 2,53 | 2,95 | 3,29 | 3,33 | 3,28 | 3,30 | 3,18 | 3,10 | 3,11 |
| | | A2 | 2,63 | 2,73 | 2,63 | 2,58 | 2,71 | 2,92 | 2,93 | 3,16 | 3,41 | 3,17 | 2,98 | 2,91 | 2,84 | 2,82 |
| Proteine Totali | g/l | CTR | 81,01 | 79,32 | 75,47 | 74,93 | 70,79 | 69,32 | 72,02 | 70,53 | 74,33 | 76,75 | 78,42 | 81,45 | 83,07 | 86,06 |
| | | A1 | 81,07 | 80,02 | 76,73 | 75,10 | 73,47 | 71,39 | 70,50 | 71,48 | 73,68 | 76,70 | 79,18 | 80,72 | 82,88 | 86,60 |
| | | A2 | 81,03 | 78,87 | 78,89 | 75,91 | 74,20 | 72,89 | 70,61 | 70,01 | 74,88 | 78,25 | 79,69 | 82,90 | 82,70 | 81,55 |
| Albumine | g/l | CTR | 36,66 | 36,33 | 36,08 | 36,89 | 35,85 | 35,42 | 37,05 | 35,62 | 35,48 | 36,36 | 36,58 | 36,67 | 35,96 | 37,12 |
| | | A1 | 36,45 | 36,38 | 36,12 | 36,26 | 36,52 | 36,47 | 36,73 | 35,56 | 35,05 | 35,61 | 36,30 | 36,25 | 37,05 | 38,08 |
| | | A2 | 35,48 | 35,51 | 36,05 | 35,79 | 36,09 | 35,59 | 36,18 | 34,48 | 35,16 | 35,31 | 36,26 | 36,92 | 36,74 | 36,49 |
| Globuline | g/l | CTR | 44,35 | 43,00 | 39,39 | 38,04 | 34,93 | 33,90 | 34,97 | 34,91 | 38,85 | 40,39 | 41,83 | 44,78 | 47,11 | 48,94 |
| | | A1 | 44,62 | 43,64 | 40,62 | 38,85 | 36,95 | 34,91 | 33,77 | 35,91 | 38,63 | 41,09 | 42,88 | 44,47 | 45,82 | 48,52 |
| | | A2 | 45,55 | 43,36 | 42,84 | 40,12 | 38,11 | 37,30 | 34,44 | 35,52 | 39,72 | 42,52 | 43,27 | 45,99 | 45,96 | 45,46 |
| GOT | U/l | CTR | 70,63 | 67,87 | 66,69 | 68,69 | 64,47 | 64,65 | 81,90 | 97,60 | 135,38 | 130,78 | 111,20 | 96,73 | 90,90 | 93,77 |
| | | A1 | 74,73 | 78,48 | 72,25 | 74,71 | 71,53 | 68,94 | 86,46 | 107,10 | 116,31 | 119,11 | 119,96 | 103,02 | 96,15 | 96,65 |
| | | A2 | 70,65 | 68,20 | 70,97 | 69,41 | 71,68 | 81,15 | 92,23 | 101,99 | 113,48 | 108,83 | 104,27 | 98,65 | 91,73 | 88,05 |
| GGT | U/l | CTR | 24,82 | 22,56 | 21,12 | 21,81 | 20,24 | 21,03 | 22,05 | 20,73 | 24,89 | 26,30 | 25,75 | 27,33 | 29,02 | 30,10 |
| | | A1 | 25,70 | 25,53 | 22,06 | 22,91 | 19,59 | 23,46 | 26,28 | 22,95 | 22,02 | 25,05 | 25,04 | 25,63 | 27,28 | 27,38 |
| | | A2 | 24,72 | 22,37 | 23,47 | 23,14 | 24,59 | 22,21 | 26,33 | 22,32 | 23,86 | 22,09 | 24,41 | 23,31 | 25,84 | 26,31 |
| Bilirubina Totale | µmol/l | CTR | 1,13 | 1,10 | 1,40 | 2,05 | 3,78 | 4,38 | 10,16 | 7,54 | 10,23 | 8,24 | 6,53 | 4,07 | 2,82 | 3,15 |
| | | A1 | 1,12 | 1,23 | 1,25 | 1,64 | 2,54 | 3,23 | 7,15 | 7,63 | 5,22 | 4,27 | 4,06 | 3,48 | 2,81 | 2,31 |
| | | A2 | 1,04 | 0,83 | 0,90 | 1,89 | 2,24 | 2,87 | 5,96 | 4,38 | 4,77 | 3,91 | 3,70 | 2,31 | 2,65 | 1,66 |
| Aptoglobina | g/l | CTR | 0,14 | 0,18 | 0,11 | 0,12 | 0,11 | 0,11 | 0,46 | 0,75 | 0,50 | 0,47 | 0,30 | 0,23 | 0,40 | 0,22 |
| | | A1 | 0,13 | 0,12 | 0,13 | 0,15 | 0,13 | 0,19 | 0,34 | 0,79 | 0,46 | 0,15 | 0,18 | 0,23 | 0,14 | 0,23 |
| | | A2 | 0,21 | 0,20 | 0,19 | 0,20 | 0,20 | 0,28 | 0,43 | 0,63 | 0,33 | 0,15 | 0,20 | 0,24 | 0,19 | 0,49 |
| NEFA | mmol/l | CTR | 0,156 | 0,180 | 0,198 | 0,257 | 0,452 | 0,478 | 0,852 | 0,783 | 0,992 | 0,984 | 0,728 | 0,617 | 0,542 | 0,483 |
| | | A1 | 0,169 | 0,220 | 0,228 | 0,234 | 0,318 | 0,434 | 0,691 | 0,919 | 0,734 | 0,653 | 0,727 | 0,596 | 0,441 | 0,371 |
| | | A2 | 0,168 | 0,283 | 0,192 | 0,240 | 0,316 | 0,395 | 0,602 | 0,460 | 0,610 | 0,580 | 0,556 | 0,420 | 0,440 | 0,330 |
| BOHB | mmol/l | CTR | 0,488 | 0,470 | 0,536 | 0,630 | 0,679 | 0,696 | 0,958 | 1,337 | 1,685 | 1,143 | 0,747 | 1,031 | 0,942 | 0,729 |
| | | A1 | 0,557 | 0,461 | 0,491 | 0,482 | 0,525 | 0,580 | 0,835 | 0,983 | 0,729 | 0,881 | 0,889 | 0,762 | 0,598 | 0,575 |
| | | A2 | 0,560 | 0,482 | 0,498 | 0,539 | 0,511 | 0,596 | 0,837 | 0,826 | 0,608 | 0,638 | 0,739 | 0,797 | 0,604 | 0,709 |
| Creatinina | µmol/l | CTR | 103,74 | 108,10 | 106,55 | 112,49 | 116,86 | 117,78 | 121,47 | 101,94 | 96,29 | 94,84 | 91,33 | 86,88 | 83,28 | 85,27 |
| | | A1 | 103,15 | 102,34 | 105,66 | 106,48 | 112,15 | 116,73 | 117,43 | 101,68 | 101,32 | 97,47 | 95,53 | 92,83 | 91,83 | 93,06 |
| | | A2 | 97,63 | 96,82 | 98,18 | 100,24 | 100,74 | 100,43 | 104,29 | 93,03 | 94,18 | 94,22 | 91,60 | 87,18 | 87,50 | 87,49 |
| Paraoxonasi | U/ml | CTR | 124,11 | 120,65 | 113,26 | 115,05 | 105,59 | 99,92 | 90,49 | 97,42 | 97,96 | 104,41 | 118,48 | 126,69 | 120,17 | 134,34 |
| | | A1 | 107,84 | 104,56 | 97,91 | 95,10 | 94,04 | 91,10 | 81,34 | 83,48 | 97,90 | 103,59 | 104,43 | 111,06 | 113,29 | 124,14 |
| | | A2 | 97,94 | 93,82 | 95,77 | 90,38 | 89,00 | 86,30 | 76,41 | 79,28 | 98,57 | 106,38 | 110,15 | 106,75 | 102,91 | 101,46 |
| ROM Totali | mg H ₂ O ₂ /100 ml | CTR | 13,42 | 12,95 | 12,83 | 12,32 | 12,18 | 11,58 | 13,26 | 14,53 | 14,32 | 13,70 | 14,07 | 13,80 | 14,25 | 14,98 |
| | | A1 | 16,65 | 14,52 | 15,34 | 14,89 | 14,39 | 14,01 | 14,81 | 16,47 | 16,66 | 16,94 | 16,52 | 16,91 | 15,80 | 16,36 |
| | | A2 | 16,17 | 14,56 | 14,75 | 15,43 | 15,15 | 16,67 | 14,09 | 17,77 | 18,22 | 17,70 | 16,57 | 16,44 | 16,54 | 16,42 |
| Mieloperossidasi | U/l | CTR | 360,5 | 357,9 | 344,7 | 368,0 | 341,4 | 324,5 | 508,2 | 428,5 | 444,3 | 491,6 | 456,3 | 447,3 | 475,3 | 485,7 |
| | | A1 | 301,8 | 330,4 | 300,6 | 308,6 | 304,7 | 304,3 | 328,3 | 319,3 | 362,4 | 356,3 | 351,8 | 336,2 | 342,6 | 351,4 |
| | | A2 | 318,6 | 341,7 | 280,8 | 296,6 | 290,0 | 291,0 | 276,2 | 346,9 | 376,7 | 364,7 | 353,7 | 358,6 | 344,0 | 378,9 |
| Retinolo | µg/100 ml | CTR | 56,90 | 59,40 | 54,55 | 49,68 | 40,88 | 30,16 | 24,56 | 28,01 | 34,97 | 39,37 | 43,96 | 47,38 | 49,35 | 53,03 |
| | | A1 | 48,70 | 52,26 | 45,91 | 40,77 | 40,10 | 38,12 | 32,19 | 32,81 | 37,97 | 45,42 | 50,69 | 50,64 | 58,70 | 57,66 |
| | | A2 | 52,97 | 53,46 | 46,00 | 44,90 | 36,78 | 41,47 | 35,25 | 38,28 | 42,23 | 49,76 | 55,92 | 61,78 | 61,18 | 60,99 |
| Tocoferolo | µg/ml | CTR | 4,23 | 4,15 | 3,41 | 3,07 | 3,17 | 2,52 | 2,01 | 1,52 | 1,93 | 2,06 | 2,17 | 2,76 | 3,10 | 3,49 |
| | | A1 | 3,39 | 3,34 | 3,03 | 2,60 | 2,39 | 2,45 | 1,86 | 1,79 | 1,46 | 1,96 | 2,44 | 2,86 | 3,29 | 3,31 |
| | | A2 | 2,86 | 2,78 | 2,44 | 2,28 | 2,02 | 2,35 | 1,87 | 1,80 | 1,93 | 2,32 | 2,44 | 2,82 | 2,78 | 3,16 |
| β-Carotene | mg/100ml | CTR | 0,302 | 0,343 | 0,337 | 0,321 | 0,308 | 0,251 | 0,231 | 0,162 | 0,173 | 0,129 | 0,161 | 0,176 | 0,198 | 0,233 |
| | | A1 | 0,272 | 0,274 | 0,293 | 0,262 | 0,223 | 0,264 | 0,204 | 0,204 | 0,153 | 0,134 | 0,161 | 0,187 | 0,196 | 0,212 |
| | | A2 | 0,258 | 0,250 | 0,233 | 0,209 | 0,166 | 0,212 | 0,187 | 0,167 | 0,159 | 0,175 | 0,172 | 0,210 | 0,226 | 0,260 |

✓ NEFA e BHB. Entrambi tali parametri hanno iniziato ad aumentare immediatamente prima del parto ed hanno raggiunto i valori più alti entro il 10° giorno di lattazione,

- quindi il loro livello si è ridotto più o meno marcatamente. Nel gruppo CTR i livelli sono stati più elevati dei gruppi aloe, in particolare rispetto ad A2 ($P < 0,05$ al 7° giorno di lattazione);
- ✓ creatinina. Nei gruppi CTR e A1, il livello della creatinina è progressivamente aumentato prima del parto ed è poi repentinamente diminuito appena dopo, ma il calo è proseguito per l'intero primo mese di lattazione. In A2 invece le variazioni sono state meno intense a cavallo del parto, per cui il livello medio è risultato inferiore agli altri due gruppi sino al parto ($P < 0,01$ nell'ultima settimana di gravidanza). Successivamente il calo della creatinina nel gruppo A2 è stato invece inferiore rispetto ai gruppi CTR ed A1, per cui al termine del 1° mese di lattazione i livelli sono risultati analoghi tra i 3 gruppi;
 - ✓ ROM. Tale parametro ha presentato andamenti simili tra i 3 gruppi, con un marcato aumento dopo il parto (circa il 20%). Inspiegabilmente, in CTR i livelli sono sempre risultati più bassi degli altri 2 gruppi, fin da prima dell'inizio della somministrazione di aloe;
 - ✓ retinolo, tocoferolo e beta-carotene. Questi 3 parametri hanno mostrato un calo nelle ultime 3 settimane di gestazione ed un graduale recupero dopo il parto nei 3 gruppi considerati. In A2 l'aumento dei livelli di tutti e 3 i parametri dopo il parto è stato più rapido e marcato rispetto a CTR. Dal 10° al 28° giorno di lattazione i livelli sono risultati statisticamente più elevati rispetto al CTR ($P < 0,05$). Il gruppo A1 ha mostrato un andamento intermedio a CTR ed A2, ma al 28° giorno di lattazione ha presentato livelli significativamente più elevati ($P < 0,05$);
 - ✓ mieloperossidasi. Tale parametro ha presentato un aumento dopo il parto in tutte le bovine, ma tale incremento è risultato più marcato e prolungato in CTR verso A1 e A2 (NS).

Da tali risultati si possono cogliere essenzialmente due aspetti positivi negli animali che hanno ricevuto aloe nel periparto.

- 1) Il primo riguarda i fenomeni infiammatori, che tipicamente si evidenziano nel post-parto della bovina da latte con un duplice fatto: aumento delle proteine positive di fase acuta (es. aptoglobina e ceruloplasmina) e calo o aumento più lento delle proteine negative di fase acuta (Bertoni et al., 2008⁴; Trevisi et al., 2011⁵). La

⁴ Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M. 2008. Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in the Puerperium and Consequences for Performance in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:3300-3310.

somministrazione di aloe ha determinato un calo delle proteine positive di fase acuta più rapido delle bovine di controllo dopo la prima settimana di lattazione. Inoltre alcune proteine di fase acuta negativa (es. colesterolo indice delle lipoproteine; la vitamina A, indice del suo carrier, la Retinol Binding Protein), la cui sintesi è ridotta in caso di severi fatti infiammatori, hanno mostrato livelli più elevati al termine del primo mese di lattazione nelle bovine riceventi aloe, confermando una migliore funzionalità epatica e una migliore capacità di risposta al fatto infiammatorio. Un significato analogo a quello delle proteine negative di fase acuta è quello della bilirubina, che si accumula nel sangue in mancanza di una adeguata sintesi epatica dei sistemi enzimatici preposti alla sua clearance. La bilirubina pertanto aumenta nel caso in cui le sintesi epatiche siano deviate a causa di severi fatti infiammatori. Il suo minore aumento ed il recupero più rapido di bassi valori con la somministrazione di aloe suggerisce dunque, una minor severità dei fatti infiammatori con l'impiego del nutraceutico. Anche l'andamento della mieloperossidasi pare confermare tale fatto. Infatti la mieloperossidasi è un enzima prodotto dai neutrofili e dai monociti con effetti citotossici nei confronti dei microrganismi attraverso la produzione di idroperossidi. I più bassi livelli osservati nelle bovine trattate con aloe rispetto a quelle di controllo suggeriscono la presenza di processi infiammatori meno severi nel postparto che potrebbero essere dovuti a minori infezioni del digerente (l'aloè esplica infatti una azione batteriostatica) e/o a livello sistemico (le bovine controllo hanno ad esempio mostrato una maggiore incidenza di endometriti, un più basso tenore di cellule somatiche nel latte ad indicare minori infezioni mammarie subcliniche, una riduzione delle affezioni complessive). In questo quadro semmai resta poco spiegabile il livello più basso di ROM del gruppo CTR, ma come già detto l'andamento nel periparto è del tutto simile a quello degli altri due gruppi, caratterizzato da un forte aumento nei primi giorni di lattazione, ed in aggiunta va detto che la variabilità di tale parametro è molto elevata.

- 2) Il secondo aspetto positivo del trattamento con aloe riguarda la minore lipomobilizzazione che si evidenzia tanto a livello ematico (livelli di acidi grassi non esterificati e di corpi chetonici più bassi rispetto alle bovine di controllo, ma anche

⁵ Trevisi E., Amadori M., Archetti I., Lacetera N., Bertoni G., 2011. Inflammatory response and acute phase proteins in the transition period of high-yielding dairy cows. In: "Acute Phase Protein / Book 2" Ed. F. Veas, InTech ISBN 979-953-307-033-8. Pp 355-380.

della minor riduzione di glucosio nell'immediato post-parto) quanto di condizione corporea (minore riduzione delle riserve valutate con il BCS). Tali risultati confermano che nelle bovine trattate vi è stato un bilancio energetico migliore e quindi nelle prime settimane le bovine hanno ridotto il rischio delle tipiche patologie post-parto (chetosi, dislocazione dell'abomaso). A livello clinico tale riduzione delle chetosi non è stato evidente, in quanto l'aumento di corpi chetonici (BHB) nel sangue non sempre dà luogo ad una manifesta sintomatologia.

E' interessante osservare che la riduzione di fatti infiammatori al parto ed il miglioramento del bilancio energetico non solo hanno ridotto il numero di eventi patologici e di trattamenti farmacologici, ma hanno determinato un aumento della produzione di latte (non statisticamente significativo) e della sua qualità (più proteine e caseine, migliore livello della acidità titolabile), ma soprattutto un netto miglioramento della fertilità.

VI. Effetto della dose di omogeneizzato di aloe sulle bovine nel periparto;

La prova sperimentale è stata condotta utilizzando due dosaggi: 100 e 200 g/capo/d di omogeneizzato di aloe per verificare l'eventuale effetto dose del nutraceutico. Come si evince dai risultati presentati nel precedente punto. Gli effetti sono stati simili a livello produttivo e della composizione del latte (tenore in grasso e in cellule somatiche), nonché di alcune variazioni ematiche (beta-idrossibutirrato in particolare).

Nella maggior parte dei casi tuttavia, si è evidenziato un effetto dose piuttosto marcato, con effetti positivi crescenti alla dose più elevata. In particolare la minor lipomobilizzazione valutata come variazioni dello stato di ingrassamento è apprezzabile solo al dosaggio maggiore di aloe ($P < 0,05$), così come la riduzione dell'incidenza delle patologie e del minor ricorso all'uso di farmaci nel primo mese di lattazione. Di grande interesse sono poi le differenze degli indici di fertilità, che sono superiori in A2 rispetto ad A1 (oltre che ovviamente a CTR), confermando un effetto dose crescente del nutraceutico.

Anche a livello metabolico le differenze osservate nelle bovine che hanno ricevuto il dosaggio più elevato di aloe rispetto al gruppo CTR sono ben più marcate di quelle osservate nel gruppo A1, che quasi sempre ha mostrato andamenti intermedi tra A2 e CTR. Infatti le differenze degli indici energetici (glucosio, NEFA e BHB) tra A2 e CTR sono state più evidenti di quelle tra A1 e CTR e spesso hanno raggiunto anche la significatività statistica. Allo stesso modo si sono comportati anche i parametri dello stato infiammatorio (proteine positive di fase acuta e parametri correlati: aptoglobina, ceruloplasmina,

bilirubina totale, ROM, mieloperossidasi; nonché proteine negative di fase acuta negativa e parametri correlati: albumine, colesterolo, retinolo, tocoferolo, PON) evidenziando nel gruppo A2 una situazione migliore (minor frequenza di fatti infiammatori, eventi meno severi e duraturi, miglior risposta delle bovine) rispetto alle bovine degli altri due gruppi. In alcuni casi solamente tuttavia le differenze tra A1 e A2 sono risultate statisticamente significative: i NEFA e la bilirubina al 3° giorno di lattazione si sono innalzati di più in A1 ($P < 0,05$); il retinolo al 21° di lattazione è risultato inferiore di A2 ($P < 0,10$).

La creatinina ha invece mostrato un andamento abbastanza diverso tra i due dosaggi, in quanto in A1 ha avuto lo stesso andamento crescente pre-parto, osservato in CTR, ma si è ridotta meno marcatamente nel primo mese di lattazione, mentre in A2 le variazioni prima del parto sono state modestissime ed il calo post-parto più contenuto. Le differenze tra i due gruppi A1 e A2 hanno pertanto sovente raggiunto la significatività statistica ($P < 0,05$). Nel complesso i dati suggeriscono una minore riduzione della massa muscolare nel periparto in A2, ovvero confermano che in tale gruppo vi è stata una minore mobilitazione anche di tessuto muscolare. Non è tuttavia facile comprendere se vi sia un effetto diretto di qualche componente assorbita dall'aloè a livello muscolare.

VII. Passaggio nel sangue e nel latte degli antrachinoni caratteristici di Aloè (aloina A e B, ed aloè-emodina)

Contenuto in aloina nel plasma. I risultati ottenuti hanno evidenziato una sostanziale differenza rispetto a quanto riportato da alcuni autori, che ipotizzano la presenza ematica, a seguito di trasformazione da parte della microflora intestinale, della sola aloè-emodina. Nel plasma delle bovine è stata rilevata la sola aloina, mentre l'aloè-emodina è risultata sempre assente.

Le prove di carico (somministrazione orale di 200 g di omogeneizzato su 6 animali, ed analisi in tempi successivi nelle 24 ore a seguire) hanno evidenziato una cinetica di assorbimento ben riproducibile. Gli individui presentavano un massimo di assorbimento dell'aloina (dell'ordine di grandezza di 5-10 $\mu\text{g/L}$) nelle 4-6 ore successive alla somministrazione, seguito da una progressiva scomparsa della molecola dal torrente ematico. Dopo 24 ore dalla somministrazione, l'aloina era presente ai livelli minimi di rilevazione dello strumento.

Nel sangue delle bovine utilizzate nella prova di periparto l'aloina era presente spesso solo in tracce, ovvero ad una concentrazione inferiore al limite di determinazione analitico. In

questo caso la determinazione avveniva su campioni di plasma raccolti 24 ore dopo la somministrazione giornaliera di 100 o 200 g/d di omogeneizzato. Pertanto i livelli sono compatibili con quelli osservati nel plasma delle bovine usate nella prova di carico. „ Analogamente, l’aloina non è mai stata rilevata nel plasma dei vitelli nati da bovine cui è stata somministrata Aloe. Nel complesso tali dati non evidenziano pertanto un accumulo di aloina a livello ematico, sebbene questa sia assorbita a seguito della somministrazione orale.

Contenuto di aloina nel latte. I risultati delle analisi sul contenuto in aloina nel latte, sono in accordo con quanto osservato per il plasma, in quanto anche nel latte l’antrachinone risulta assente.

VIII. Valutazione dell’effetto dell’omogeneizzato di aloe sui vitelli nati da madri che lo hanno ricevuto nelle fasi terminali di gravidanza e che sono stati alimentati con il colostro materno (WP4)

I vitelli delle bovine in sperimentazione dopo la nascita sono stati collocati in box individuali ed hanno ricevuto per i primi 3 pasti il colostro delle madri alimentate con aloe nella fase terminale della gestazione. La prima somministrazione, di 1,5 litri circa, è stata eseguita appena possibile dopo la nascita. L’obiettivo era di eseguirla entro 2 ore dalla stessa, ma in relazione dell’ora effettiva del parto ed al turno degli operatori ciò non è sempre stato possibile. I pasti successivi sono stati distribuiti ad intervalli regolari (circa le 4:00 e le 14:00), in ragione di due al giorno, per fornire circa 4 Kg/capo/giorno nei primi 4-5 giorni e successivamente 6-8 Kg/capo/giorno.

Valutazioni analitiche. Sul colostro prelevato dalle bovine al momento della prima mungitura è stata eseguita la determinazione del contenuto in immunoglobuline.

Su ciascun vitello si è invece provveduto ad eseguire i seguenti controlli:

- stato di salute, valutato giornalmente (WP 4.2)
- misurazione del peso vivo alla nascita, a 7, 14 e 21 giorni di vita (WP 4.2)
- prelievi ematici alla nascita (mattino seguente il giorno del parto) e poi a 3, 7, 14 e 21 giorni di vita. Poiché il primo pasto veniva effettuato alle 4 circa del mattino i prelievi (ad eccezione del primo) sono avvenuti mediamente circa 5 ore dopo il pasto. Sul sangue intero si è proceduto alla determinazione dell’ematocrito, mentre sul plasma ottenuto dopo centrifugazione (15 minuti, a 4°C, a 3500 g), frazionato in

più aliquote e conservato a -20°C sino al momento delle valutazioni analitiche, si è proceduto alla determinazione di: glucosio, colesterolo, urea, calcio, zinco, cerulo plasmina, proteine totali, globuline, GOT, GGT, bilirubina totale, fosfatasi alcalina, aptoglobina, ROM totali, mieloperossidasi, acidi grassi non esterificati, beta-idrossi-butirrato, creatinina, vitamina A ed E. Inoltre sono stati determinati gli antrachinoni caratteristici: aloina ed aloe-emodina (WP 4.2)

Risultati. Il colostro delle bovine che hanno ricevuto aloe non ha mostrato un differente livello di immunoglobuline rispetto al gruppo CTR. Quest'ultimo gruppo tuttavia, ha mostrato il livello medio più elevato. Infatti, il contenuto medio di immunoglobuline nel colostro della prima mungitura è risultato pari a: 60,2±22,6; 84,2±60,23 e 94,9±52,9 mg/ml in A1, A2, CTR rispettivamente. In tutti i gruppi il contenuto di immunoglobuline si è rivelato molto variabile. In un precedente lavoro condotto sulle bufale Infascelli et al. (2010)⁶⁶ era stato segnalato un aumento del livello di immunoglobuline nel colostro delle bufale riceventi l'aloè, ma in quel caso i valori di immunoglobuline avevano presentato una bassissima variabilità. Tale aspetto potrebbe dunque meritare ulteriori verifiche.

Nei vitelli nati dalle bovine che hanno ricevuto l'omogeneizzato di aloe è stato osservato un peso vivo alla nascita leggermente superiore: 46,4±7,5; 44,4±4,0 e 42,8±3,6 kg rispettivamente in A1, A2 e CTR. La maggiore differenza è stata osservata tra A1 e CTR (8,5%), ma a causa della elevata variabilità non è risultata statisticamente significativa.

Anche l'incremento ponderale nei primi 21 giorni di vita è risultato leggermente più elevato nei vitelli alle cui madri è stato somministrato l'omogeneizzato di aloe: +1,7; +1,7 e +1,0 kg/21 giorni in A1, A2 e CTR rispettivamente. Anche in questo caso, l'elevata variabilità tra i soggetti ha impedito che la differenza raggiungesse la significatività statistica.

Nella tabella 5 sono presentati i parametri ematici determinati nei vitelli. La maggior parte non evidenzia differenze legate ai trattamenti con aloe. Tuttavia si possono rilevare alcune variazioni di un certo interesse:

- ✓ l'aumento delle immunoglobuline è risultato analogo tra i vitelli dei gruppi A2 e CTR, mentre è stato leggermente più basso nel gruppo A1. Tali andamenti sembrano in buona correlazione con il livello di immunoglobuline misurato nel colostro della prima mungitura. In CTR i livelli sono rimasti più elevati degli altri due gruppi sino al 21° giorno di vita. Le differenze non sono mai state statisticamente significative a

⁶⁶ Infascelli et al., 2010; *Revista Veterinaria*, 2010, 21(1):151-154

Tabella 5. Andamento dei parametri ematici nelle prime 3 settimane di vita di vitelli nati da bovine che hanno ricevuto 0 (CTR), 100 (A1) o 200 (A2) g/d di omogeneizzato di aloe tra 14 giorni prima e 14 giorni dopo il parto.

| Parametro | unità di misura | Tesi | Giorni dal parto | | | | |
|-----------------------------|---|------|------------------|--------|--------|-------|--------|
| | | | 0 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| Ematocrito | l/l | CTR | 0,359 | 0,300 | 0,308 | 0,308 | 0,309 |
| | | A1 | 0,401 | 0,343 | 0,359 | 0,347 | 0,359 |
| | | A2 | 0,351 | 0,313 | 0,325 | 0,323 | 0,338 |
| Glucosio | mmol/l | CTR | 5,75 | 7,03 | 6,65 | 6,51 | 6,31 |
| | | A1 | 5,22 | 7,29 | 6,74 | 6,55 | 6,27 |
| | | A2 | 6,13 | 7,27 | 6,65 | 6,84 | 6,78 |
| Colesterolo | mmol/l | CTR | 0,70 | 1,68 | 1,83 | 1,93 | 2,44 |
| | | A1 | 0,85 | 1,69 | 1,81 | 1,90 | 2,70 |
| | | A2 | 0,77 | 1,76 | 1,75 | 2,03 | 2,56 |
| Urea | mmol/l | CTR | 3,72 | 4,37 | 5,49 | 2,91 | 2,70 |
| | | A1 | 3,71 | 4,76 | 3,69 | 3,51 | 3,77 |
| | | A2 | 3,95 | 4,62 | 4,63 | 3,48 | 4,00 |
| Calcio | mmol/l | CTR | 3,19 | 3,25 | 2,93 | 2,83 | 2,81 |
| | | A1 | 3,20 | 3,13 | 2,88 | 2,77 | 2,77 |
| | | A2 | 3,14 | 3,09 | 2,82 | 2,81 | 2,79 |
| Zinco | µmol/l | CTR | 8,23 | 13,39 | 10,08 | 11,47 | 12,16 |
| | | A1 | 11,78 | 15,38 | 11,86 | 13,71 | 13,64 |
| | | A2 | 9,65 | 13,31 | 10,56 | 11,73 | 12,99 |
| Ceruloplasmina | µmol/l | CTR | 0,55 | 2,30 | 3,50 | 3,49 | 3,51 |
| | | A1 | 0,49 | 2,21 | 3,05 | 2,96 | 2,96 |
| | | A2 | 0,69 | 2,49 | 3,42 | 3,37 | 3,37 |
| Proteine Totali | g/l | CTR | 49,98 | 64,50 | 63,90 | 59,13 | 58,91 |
| | | A1 | 51,76 | 66,00 | 63,36 | 58,78 | 60,89 |
| | | A2 | 54,68 | 65,94 | 63,16 | 59,89 | 61,52 |
| Albumine | g/l | CTR | 28,10 | 28,64 | 29,18 | 29,03 | 29,84 |
| | | A1 | 28,89 | 29,19 | 29,94 | 29,16 | 31,17 |
| | | A2 | 29,00 | 29,64 | 30,14 | 30,16 | 31,33 |
| Globuline | g/l | CTR | 21,87 | 35,86 | 34,73 | 30,10 | 29,07 |
| | | A1 | 22,87 | 36,81 | 33,42 | 29,62 | 29,71 |
| | | A2 | 25,68 | 36,30 | 33,02 | 29,74 | 30,19 |
| GOT | U/l | CTR | 56,23 | 53,08 | 55,66 | 42,19 | 41,42 |
| | | A1 | 51,41 | 47,93 | 38,58 | 46,30 | 45,35 |
| | | A2 | 88,85 | 61,87 | 41,82 | 44,28 | 42,51 |
| GGT | U/l | CTR | 559,8 | 327,8 | 178,6 | 79,0 | 58,9 |
| | | A1 | 495,4 | 454,2 | 234,5 | 104,7 | 72,7 |
| | | A2 | 780,2 | 428,5 | 225,4 | 116,0 | 85,3 |
| Bilirubina Totale | µmol/l | CTR | 16,88 | 8,95 | 3,83 | 2,95 | 3,38 |
| | | A1 | 15,07 | 7,37 | 4,17 | 2,84 | 3,18 |
| | | A2 | 20,13 | 9,85 | 2,95 | 2,51 | 3,33 |
| Aptoglobina | g/l | CTR | 0,26 | 0,23 | 0,47 | 0,26 | 0,28 |
| | | A1 | 0,26 | 0,29 | 0,38 | 0,24 | 0,22 |
| | | A2 | 0,25 | 0,30 | 0,50 | 0,34 | 0,29 |
| Fosfatasi Alcalina | U/l | CTR | 498,5 | 266,9 | 213,2 | 205,4 | 230,7 |
| | | A1 | 315,6 | 274,1 | 240,2 | 197,0 | 212,8 |
| | | A2 | 398,8 | 245,8 | 230,9 | 195,0 | 183,5 |
| NEFA | mmol/l | CTR | 0,686 | 0,429 | 0,303 | 0,166 | 0,150 |
| | | A1 | 0,903 | 0,378 | 0,205 | 0,179 | 0,169 |
| | | A2 | 0,864 | 0,348 | 0,190 | 0,178 | 0,166 |
| BOHB | mmol/l | CTR | 0,051 | 0,144 | 0,115 | 0,085 | 0,089 |
| | | A1 | 0,081 | 0,134 | 0,092 | 0,095 | 0,088 |
| | | A2 | 0,089 | 0,125 | 0,093 | 0,070 | 0,089 |
| Creatinina | µmol/l | CTR | 155,05 | 92,87 | 109,60 | 92,04 | 91,86 |
| | | A1 | 199,15 | 102,10 | 108,78 | 98,61 | 100,79 |
| | | A2 | 149,29 | 97,99 | 104,67 | 96,54 | 100,95 |
| ROM Totali | mg H ₂ O ₂ / 100 ml | CTR | 6,85 | 14,87 | 19,04 | 18,18 | 18,28 |
| | | A1 | 8,24 | 16,16 | 18,47 | 17,82 | 17,30 |
| | | A2 | 9,19 | 16,69 | 19,34 | 18,32 | 18,38 |
| Mieloperossidasi | U/l | CTR | 54,8 | 197,1 | 239,7 | 187,4 | 177,7 |
| | | A1 | 41,5 | 229,0 | 234,2 | 208,3 | 197,5 |
| | | A2 | 84,1 | 232,8 | 249,4 | 230,9 | 191,3 |
| Retinolo | µg/100 ml | CTR | 15,25 | 28,14 | 30,25 | 27,22 | 25,31 |
| | | A1 | 16,23 | 31,53 | 28,42 | 26,37 | 26,83 |
| | | A2 | 14,61 | 30,92 | 30,34 | 26,14 | 28,50 |
| Tocoferolo | µg/ml | CTR | 0,29 | 1,25 | 1,11 | 1,29 | 2,25 |
| | | A1 | 0,25 | 0,99 | 1,18 | 0,81 | 1,30 |
| | | A2 | 0,27 | 1,13 | 0,87 | 1,10 | 1,79 |
| β-Carotene | mg/100ml | CTR | 0,007 | 0,014 | 0,014 | 0,009 | 0,009 |
| | | A1 | 0,007 | 0,014 | 0,012 | 0,008 | 0,009 |
| | | A2 | 0,008 | 0,013 | 0,010 | 0,009 | 0,009 |
| Immunoglobuline Plasmatiche | mg/ml | CTR | 7,10 | 17,55 | 15,52 | 12,46 | 14,79 |
| | | A1 | 4,36 | 13,32 | 11,87 | 9,57 | 9,94 |
| | | A2 | 8,34 | 17,77 | 12,80 | 9,92 | 11,73 |

causa dell'elevata variabilità di tale parametro;

- ✓ l'ematocrito è risultato analogo alla nascita, ma in seguito ha mostrato una riduzione più marcata in CTR rispetto ai vitelli dei gruppi A1 e A2 e la differenza ha raggiunto il valore più elevato al 21° giorno di vita;
- ✓ l'urea ha presentato una più elevata variabilità in CTR, rispetto ad A1 e A2, suggerendo una ingestione più irregolare di alimenti. Appare di un certo interesse il valore più basso in CTR al 21° giorno di vita rispetto ad A1 e A2, fatto che potrebbe significare una minore ingestione di latte in tale fase;
- ✓ i livelli di proteine positive di fase acuta (aptoglobina e ceruloplasmina) sono risultati analoghi tra i 3 gruppi. Nel complesso sono apparsi piuttosto elevati confermando la presenza di fatti infiammatori di una certa gravità. E' tuttavia di interesse il fatto che il livello di albumine, proteina negativa di fase acuta, è risultata più elevata in A1 e soprattutto in A2 rispetto a CTR. La massima differenza si osserva al 21° giorno di vita e coincide con i valori più elevati di ematocrito e urea. Tale dato suggerisce una migliore risposta (e forse una minore suscettibilità) dei vitelli dei gruppi aloe alle infezioni che li hanno interessati nelle prime settimane di vita;
- ✓ i livelli di NEFA, indice della lipomobilizzazione che certamente è avvenuta nei primi giorni di vita considerando il calo peso dei soggetti, è risultata minore nei gruppi aloe rispetto a CTR nel corso della prima settimana di vita. Successivamente i valori sono stati analoghi tra i gruppi;
- ✓ non sono emerse differenze di rilievo per quanto riguarda il contenuto di vitamina A ed E.

Nel complesso le variazioni ematiche osservate nei vitelli le cui madri hanno ricevuto aloe al termine della gravidanza, unitamente alle migliori performance di crescita, suggeriscono un migliore adattamento nelle prime settimane di vita. Considerato che gli accrescimenti sono stati modesti, nonostante l'assenza di patologie clinicamente obiettabili, si può dedurre che le condizioni generali dei vitelli non erano ottimali. Tuttavia il fatto che i vitelli dei gruppi A1 e A2 siano cresciuti maggiormente depone per un effetto positivo del trattamento nutraceutico sulle madri.

A livello del colostro non è stato osservato un accresciuto tenore delle immunoglobuline, che pertanto non paiono modificate dal nutraceutico. Il maggior peso vivo alla nascita, riscontrato in entrambi i gruppi trattati, potrebbe invece essere giustificato dal nutraceutico. Tuttavia nel presente lavoro non sono state messe in luce

differenze metaboliche tra i gruppi nella fase terminale di gravidanza tali da giustificare un miglioramento metabolico nei feti e quindi una loro maggior crescita.

Certamente il nutraceutico, direttamente o indirettamente, pare aver avuto conseguenze positive sul metabolismo e sullo stato immunitario dei vitelli nelle prime 3 settimane di vita, che hanno comportato un maggior accrescimento, fatto che tuttavia richiede ulteriori indagini per chiarirne i meccanismi.

IX Valutare i possibili vantaggi economici dell'impiego di aloe nel periparto in allevamenti biologici.

Da quanto emerso dalla presente ricerca possiamo sinteticamente osservare che l'uso dell'omogeneizzato di aloe ha presentato numerosi vantaggi per una possibile applicazione nel settore zootecnico afferente all'agricoltura biologica. Sinteticamente questi vantaggi possono così essere elencati:

- ✓ riduzione dell'incidenza delle tipiche affezioni nel periparto, specialmente endometriti e affezioni mammarie. Quest'ultime in particolare sono dimostrate dal calo del tenore in cellule somatiche nel latte nel corso del primo mese di lattazione. In generale tuttavia il calo di affezioni cliniche si è ben espresso con la riduzione di trattamenti antibiotici ed anti-infiammatori nei gruppi riceventi il nutraceutico;
- ✓ minore lipomobilizzazione delle riserve corporee, che conferma il miglior stato di salute e la maggiore ingestione di alimenti. Il minor ricorso alle riserve corporee si traduce in bovine più efficienti, in quanto presentano una minor spesa energetica per produrre la stessa quantità di latte, in quanto l'uso di tali riserve è più costoso in termini energetici dell'uso dell'energia contenuta negli alimenti. In pratica le bovine trattate con aloe mobilizzano meno riserve, producono la stessa quantità di latte (o leggermente di più) con un titolo lipidico più basso nelle prime 2 settimane di lattazione. Tale situazione può essere giustificata solo dalla più elevata ingestione di alimenti nei giorni a cavallo del parto, anche se – purtroppo - tale misura non si è potuta eseguire lavorando in gruppi di bovine allevate a stabulazione libera;
- ✓ bovine con una condizione metabolica (specie del metabolismo energetico) migliore, che comporta una riduzione del rischio di chetosi, come già detto ben evidenziata dai livelli inferiori di NEFA (=indice delle riserve mobilizzate) e BHB (=indice subclinico di chetosi);

- ✓ bovine in migliori condizione di benessere, per la minor presenza di fatti infiammatori, per la presenza di stati infiammatori nel periparto meno severi, probabilmente per una attenuazione del tipico fenomeno di immunodeficienza che si verifica nel periparto;
- ✓ bovine che presentano un latte con caratteristiche qualitative leggermente migliori, in quanto hanno mostrato un titolo proteico (e caseinico) più elevato ed una acidità titolabile pure più elevata nel corso del 1° mese di lattazione. Da sottolineare che tali caratteristiche sono riconducibili ad una migliore condizione metabolica delle bovine, effetto di un bilancio energetico migliore, ovvero meno negativo, di quello delle bovine di controllo;
- ✓ bovine più fertili, che significa una diminuzione della quota di riforma ed animali più longevi.

Fare un bilancio di tutte queste voci appare complesso. Tuttavia, secondo stime prudenziali eseguite presso la struttura sperimentale in cui si è operato e che hanno incluso i costi del nutraceutico e della sua somministrazione, il vantaggio economico potrebbe raggiungere i 250-350 euro per bovina per lattazione. Si ritiene pertanto che questo intervento sia riproducibile in campo e che possa dare buoni benefici agli allevatori.

Considerazioni conclusive

Oltre alla valutazione economica che è indubbiamente lusinghiera, pur se necessita di verifiche presso allevamenti commerciali di zootecnia biologica, vanno fatte alcune ulteriori considerazioni relativamente al possibile inserimento nell'alimentazione animale di un qualsiasi nutraceutico. In particolare va tenuto conto che:

- la somministrazione di prodotti con effetti nutraceutici non è un trattamento che si può improvvisare. Richiede studi complessi ed articolati che vanno dalla scelta della specie vegetale, alla caratterizzazione chimica dei principali composti potenzialmente accreditati degli effetti fisiologici (talora con la messa a punto di specifiche analisi chimiche), allo studio delle condizioni agronomiche per la standardizzazione della qualità del prodotto vegetale, allo studio delle condizioni di trattamento e stoccaggio dei vegetali, alla definizione di protocolli zootecnici per il loro impiego in campo e per la definizione degli effettivi vantaggi sulle performance e sulla qualità delle produzioni animali;
- lo studio delle molecole alle quali sono attribuiti effetti nutraceutici è essenziale e va condotto preliminarmente all'impiego di campo, per evitare di somministrare sostanze agli animali, che pur se naturali, possono avere effetti avversi sugli animali stessi e, qualora assorbite a livello del loro digerente, anche per l'uomo, attraverso il consumo di alimenti di origine animale. E' interessante al riguardo ricordare la recente ricerca olandese (van der Berg et al., 2011⁷) che ha evidenziato la presenza di sostanze tossiche in molte piante, già utilizzate nell'alimentazione animale ed umana, o potenzialmente utilizzabili. Questa ricerca precisa che non sempre la presenza di tali sostanze tossiche è tale da generare danni e che, in alcuni casi, la compresenza di altre molecole contenute nella stessa essenza vegetale attutisce o elimina gli effetti negativi. E' tuttavia innegabile che la caratterizzazione delle sostanze con potenziali effetti nocivi si rende indispensabile se si desidera salvaguardare la sicurezza alimentare e che, per contro, ogni potenziale sostanza dagli effetti benefici va studiata allo scopo di definirne le effettive proprietà. Quindi ogni potenziale pianta con effetti nutraceutici deve essere opportunamente studiata prima di essere inserita nella catena alimentare

⁷ van den Berg S.J.P.L., Restani P., Boersma M.G., Delmulle L., Rietjens I.M.C.M. 2011. Levels of Genotoxic and Carcinogenic Compounds in Plant Food Supplements and Associated Risk Assessment *Food and Nutrition Sciences*, 2011, 2, 989-1010

umana e questo studio offre gli elementi per ulteriori approfondimenti su essenze note o per l'impostazione di ricerche utili a valutare l'efficacia di nuovi potenziali nutraceutici.

- L'impiego di nutraceutici è oggi investigato in tutti i sistemi zootecnici, ma certamente esistono maggiori motivazioni al loro studio ed al loro impiego nelle filiere più sensibili alla riduzione dell'uso di farmaci convenzionali, come la zootecnica biologica. E' pertanto importante che questo ambito di ricerca e di sviluppo sia sostenuto e applicato nella filiera della zootecnica biologica, anche mediante la predisposizione di protocolli che attestino l'efficacia e la sicurezza delle essenze da impiegare. Esistono tutti gli elementi perché questa branca della nutrizione divenga un fattore distintivo e di reale competizione a favore del settore della zootecnica biologica.

Il Responsabile Scientifico

Dr Erminio Trevisi

Piacenza, 31 luglio 2012