

# DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA – UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA (VITERBO)

## MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE

### **Programma di Azione Nazionale per l'Agricoltura Biologica e i Prodotti Biologici per gli anni 2008 e 2009 – Azione 2.2.**

**PROGRAMMA DI RICERCA:** Studio della valenza nutrizionale ed ottimizzazione di pratiche d'impiego di derivati vegetali nell'alimentazione di ruminanti in produzione biologica (ACRONIMO DI PROGETTO NUTRI.FITO.BIO)

## RELAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA DI SINTESI SULLO STATO DI

## AVANZAMENTO DEL PROGETTO

Giugno 2011

### 1. Premesse

Il Programma di Ricerca in svolgimento, coinvolge due Unità Operative (U.O.): il Dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia di Viterbo (DAFNE-UNITUS, Coordinatore Prof. B- Ronchi) e l'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del S. Cuore di Piacenza (IZ-UCSC, ref. sci. Dott. P. Bani). Il Programma è teso ad individuare in condizioni controllate (e.g. mediante saggi *in vitro* e successivamente *ex vivo*) e quindi testare in campo principi e composti d'origine vegetale, compatibili con il metodo d'allevamento biologico, in grado di risolvere o comunque mitigare alcune criticità nutrizionali (carenza in oligo-elementi e vitamine) intrinsecamente connesse con la conduzione biologica degli allevamenti da latte, in particolare per i piccoli ruminanti.

### 2. Quadro di riferimento progettuale

Il Programma s'inquadra all'interno del Reg. CE 889/2008 che prescrive le condizioni per sopperire alle esigenze nutrizionali di base degli animali, prevenendo malattie e dismetabolie, ricorrendo ad interventi alimentari d'origine vegetale conformi al Reg. citato. Il Programma si articola in due fasi di cui la prima, Fase 1 della durata di 6 mesi ha riguardato prevalentemente le fasi di avvio, di raccolta informazioni su principi e formulati da testare e la sperimentazione in condizioni controllate. La Fase 2, della durata di mesi 12 fino alla chiusura del Programma di Ricerca, sarà prevalentemente incentrata su attività di sperimentazione "on farm" con relative azioni di dimostrazione e divulgazione dei risultati. La gestione delle attività rappresentative della FASE 1, per questioni pratiche, è stata organizzata in 2 Work Packages comprendenti ciascuno diversi Task (T) di cui, nel seguito, si relaziona in merito al relativo stato d'avanzamento.

### 3. Stato d'avanzamento dei WPs della Fase 1 e risultati conseguiti

#### **Work Package 1 (WP 1)**

Conformemente all'obiettivo d'identificare alcune possibili fonti d'origine vegetale (estratti vegetali e fitoderivati) di oligoelementi e composti bio-attivi con valenza nutrizionale (Vitamina E) o pro-nutrizionale (tannini) e valutarne le potenzialità d'impiego per l'integrazione alimentare dei piccoli ruminanti in regime biologico, il WP è stato articolato in due gruppi di attività ascritte (Task):

T.1.1 Individuazione, scelta e caratterizzazione di sostanze ascrivibili alla categoria degli estratti vegetali e dei fito-derivati con valenza nutrizionale.

T.1.2 Individuazione, sulla base delle peculiarità delle aziende agro-zootecniche che saranno coinvolte nelle fasi d'implementazione "on farm" del progetto, delle modalità operative d'impiego e prima stesura dei protocolli d'uso di estratti vegetali e fitoderivati.

Nell'ambito del mercato nazionale dei prodotti "BIO", sono state ricercate aziende in grado di fornire prodotti e sottoprodotti d'origine vegetale che possono essere utilizzati nella fase della sperimentazione on-farm con riferimento all'approvvigionamento per i ruminanti primariamente degli oligoelementi Iodio e Selenio, della Vitamina E, di tannini condensati per la modulazione della degradazione ruminale della proteina e, in seconda istanza, di acidi grassi polinsaturi ed eventuali altri composti bio-attivi.

Per quanto riguarda Selenio, Vitamina E ed eventualmente acidi grassi polinsaturi (e.g. a.  $\omega$ -3 quale il  $\omega$ -linolenico), tra le diverse opzioni disponibili sul mercato nazionale, è stata individuata un'Azienda con sede in Umbria in grado di fornire sottoprodotti della lavorazione degli oli di semi dotati di certificazione biologica rilasciata da BioAgriCert, Organismo Tecnico Indipendente di Controllo e Certificazione Riconosciuto dal Ministero dell'Agricoltura. Tali prodotti sono tutti certificati con presenza di contaminanti fitosanitari inferiore a 0,01 ppm ed assenza di OGM. L'Azienda in questione, è stata selezionata quale potenziale fornitrice di fitoderivati anche in base all'esperienza pregressa della stessa maturata in rapporti commerciali con imprese mangimistiche produttrici di mangimi biologici che talora impiegano sottoprodotti dell'industria agro-alimentare per la formulazione di mangimi completi, nuclei ed altre tipologie commerciali di alimento zootecnico.

Una prima serie di prodotti trattati dall'Azienda ai fini di una valutazione di screening in vista dell'impiego "on-farm" con i relativi valori analitici essenziali per la formulazione dei protocolli applicativi che scaturiranno, validati, dalla sperimentazione on-farm, sono riepilogati in Tab. 1.

**Tabella 1 – Tipologie di sottoprodotti dell'industria olearia e relativi valori analitici di riferimento per l'uso zootecnico.**

Prodotto/Sottoprodotto	Elemento o composto d'interesse	Valori centesimali sul t.q. di riferimento per l'interazione dei piani alimentari**			
		U %	PG %	EE %	FG %
Panella di mandorla*	Vitamina E, aa. gg. polinsaturi (PUFA)	4-9	18-22	6-12	8-12
Panella di Canola (a basso contenuto di acido erucico e glucosinolati)	Selenio (forma inorganica/organica)	6-13	34	4-15	-

U= umidità, PG= proteina grezza, EE= estratto etereo, FG=fibra grezza. \*Sottoprodotti ottenuti da processi di estrazione meccanica a freddo senza utilizzo di solventi. \*\* Dati indicativi forniti dall'Azienda produttrice.

Altre tipologie di sottoprodotti dell'estrazione meccanica dell'olio, quali il pannello di noce come fonte di acidi grassi polinsaturi (in particolare di  $\omega$ -3 linolenico), pannello di cartamo, di lino e di zucca, sono allo studio per valutarne eventuali impieghi per la nutrizione in zootecnia biologica.

Per quanto riguarda l'approvvigionamento di fonti ricche in tannini condensati per la sperimentazione *in vitro* ed *in vivo* relativa all'impiego di modulatori della degradabilità ruminale della proteina vegetale, è stata individuata un'azienda italiana che produce formulati tannici di castagno vergine mediante processi di pretrattamento meccanico del legno, d'estrazione, pre-concentrazione ed essiccazione (fino ad un contenuto di tannini >75% in peso) totalmente esenti dall'impiego di solventi e additivi chimici. Tale prodotto è in attesa di un riconoscimento ministeriale per l'impiego in agricoltura biologica ed è interesse dell'azienda eventualmente estendere la certificazione a formulati basati su tannini da impiegare in zootecnia biologica (ad oggi commercializzati solo per l'industria mangimistica rivolta al convenzionale).

Un'altra tipologia di tannini interessanti è stata individuata negli estratti tannici dei sottoprodotti della lavorazione dell'uva, principalmente dopo la vinificazione della stessa. Si tratta, in questa forma di estratti, di prodotti ad alto titolo in tannini condensati ampiamente impiegati in enologia.

Accanto ai sotto-prodotti enologici assumono un buon interesse anche i sottoprodotti alla coltivazione del castagno (foglie, ricci) e della successiva lavorazione dei frutti (buccia e pellicola interna). Altri prodotti potenzialmente interessanti sono stati considerate le foglie di agrumi, per il loro contenuto in oli essenziali che pure potrebbero modulare la microflora ruminale. Infine, risulta pure interessante un'alga atlantica, *Aschophyllum nodosum*, già impiegata in agricoltura biologica e non solo. La sua significativa componente polifenolica rende il prodotto di indubbio potenziale interesse, anche in vista di un possibile abbinamento ad altre fonti di tannino.

Per quanto riguarda i possibili fito-estratti e fitoderivati particolarmente ricchi in Iodio disponibili sul mercato nazionale, ci si è orientati verso le aziende che commercializzano estratti d'alga (e.g. *Fucus vesiculosus* L.) (Fig. 1) che presentano un titolo dell'elemento particolarmente alto, sia in forma libera che legata alle proteine vegetali (>200 µg I/g TQ), tale da consentirne l'impiego in quantità limitate nell'ambito dei piani di razionamento.



**Figura 1 – immagine dell'alga bruna *Fucus vesiculosus* che viene comunemente commercializzata per l'integrazione alimentare umana di Iodio con il nome di "kelp".**

Sono attualmente in corso verifiche con aziende nazionali del settore alimentare e erboristico per individuarne una o più in grado di fornire sia nella fase di sperimentazione che, eventualmente in quella applicativa, prodotti certificati "BIO", o tali da poter essere certificabili nel breve-medio periodo.

La formulazione di protocolli d'impiego per i fitoderivati individuati, non potrà prescindere dalle caratteristiche anche gestionali delle aziende presso cui sarà effettuata la sperimentazione "on farm" e, auspicabilmente, l'applicazione su più vasta scala. In coerenza con ciò, le aziende che saranno coinvolte nella seconda fase e già individuate, sono state oggetto di una prima caratterizzazione per definire in dettaglio alcuni aspetti quali, tra gli altri, i piani alimentari in uso, la composizione ed il valore nutrizionale delle razioni, le eventuali integrazioni e alcuni descrittori dello stato nutrizionale degli animali (e.g. contenuto ematico di Iodio, Selenio, Vitamina E).

Per le procedure d'impiego sono allo studio alcuni scenari di dosaggio per fitoderivati ad alto tenore di Selenio, Iodio e Vitamina E, nonché di formulati ad alto contenuto in sostanze tanniche in considerazione delle indicazioni rinvenute nella letteratura scientifica di settore e delle risultanze delle sperimentazioni *in vitro* di cui al successivo **WP 2** nonché di ulteriori studi *ex vivo* in corso e da programmare prima delle verifiche sperimentali "on farm".

La predisposizione dei protocolli, la cui stesura definitiva sarà validata nel corso dell'implementazione della Fase 2 in base ai risultati che si otterranno con la sperimentazione "on farm", terrà conto del valore energetico della razione totale (inclusa l'integrazione con i fitoderivati), del tenore proteico complessivo con particolare riguardo al rapporto tra proteina degradabile nel rumine (RDP) e quella by-pass (RUP) (in particolar nel caso dell'impiego di tannini per modulare l'attività ruminale), apporto di sostanze eventualmente interferenti (e.g. glucosinolati per i pannelli di semi di crucifere) e intake minimo e/o ottimale per i principi d'interesse (Se, I, Vit E) atti a consentire di raggiungere il pieno soddisfacimento dei requisiti nutrizionali per la/le specie in studio (capra da latte o pecora da latte).

## **Work Package 2 (WP 2)**

L'obiettivo specifico di questo WP è consistito nello screening sperimentale delle diverse tipologie d'integrazione della dieta per ruminanti rispetto alla funzionalità ruminale *in vitro*, alla degradabilità della proteina ed agli effetti sul sistema immunitario di piccoli ruminanti da latte. I due task sviluppati nel presente WP sono stati:

**T.2.1** Predisposizione di un piano sperimentale per lo screening degli estratti vegetali e dei fitoderivati relativamente a prove *in vitro* di degradabilità ruminale, prove *in vitro* ed *ex vivo* per la risposta immunitaria cellulo-mediata e prove in ambiente controllato di alimentazione con estratti vegetali e fitoderivati.

**T.2.2** Implementazione del piano sperimentale e verifiche mediante saggi *in vitro*

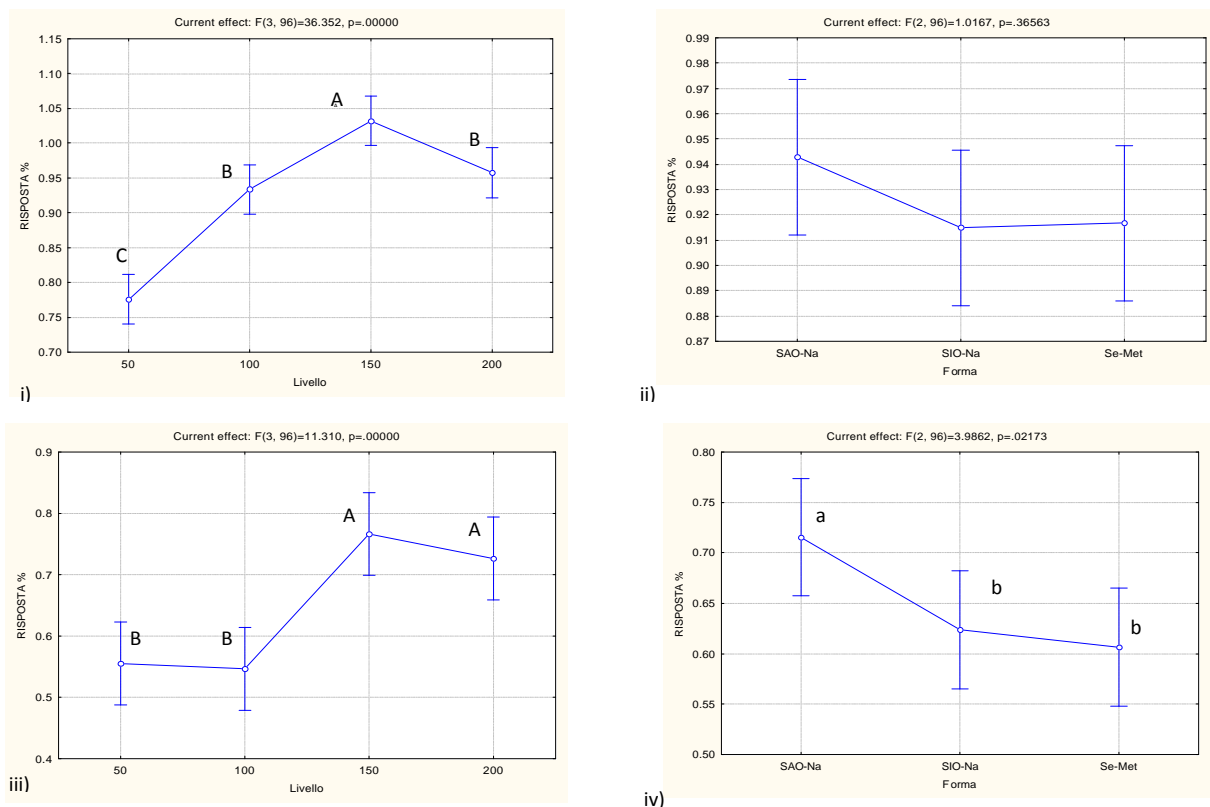
Per la valutazione degli effetti di Selenio, Vitamina E e Iodio sulla risposta del sistema immunitario, sono stati condotti test *in vitro* su cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) della capra da latte verificando i livelli di esposizione in grado di consentire la massima espressione della capacità proliferativa di tali cellule sottoposte a stimolazione mediante sostanze mitogene: Conavalina A (ConA, lectina isolata da *Canavalia ensiformis*) per i linfociti T ed il Pokeweed Mitogen (PWM - lectina estratta da radice di *Phytolacca americana*) per linfociti B. Tale sperimentazione è stata condotta dall'U.O. DAFNE-UNITUS secondo protocolli già messi a punto dal gruppo di lavoro.

Il sangue utilizzato per isolare le PBMC da sottoporre a saggio è stato ottenuto da otto capre di razza Saanen in lattazione, omogenee per peso, data e ordine di parto, allevate presso un'azienda a conduzione biologica situata in provincia di Viterbo.

Al fine d'individuare i livelli d'esposizione ottimali, sono stati utilizzati per i saggi principi attivi puri: Selenio inorganico (selenito e selenato di sodio), Selenio organico (seleno-metionina, seleno-cisteina e seleno-cistina), a-tocoferolo (Vit. E), Iodio inorganico (ioduro di sodio) e organico (tetraiodo-L-tironina, T4), quest'ultimo solo a scopo di verificare un eventuale effetto indiretto della somministrazione *in vivo* di Iodio attraverso la metabolizzazione tiroidea. E' stato scelto di testare i singoli principi puri piuttosto che estratti o alto tipo di preparato vegetale, per evitare sovrapposizione di effetti interferenti dovuti ad altre sostanze eventualmente presenti assieme ai principi da testare. Ci si riserva comunque la possibilità, nel prosieguo del Programma, di verificare i dati ottenuti e qui nel seguito sintetizzati confrontandoli con quelli ottenuti con impiego diretto dei fitoestratti nei saggi di proliferazione cellulare *in vitro*.

### Selenio

L'esposizione a diverse forme di Selenio di PBMC ottenute da 4 capre in lattazione (Fig. 2), ha consentito di evidenziare come nella norma i valori massimi di proliferazione cellulare dopo stimolazione con ConA (Fig. 2 i-ii) e PWM (Fig. 2 iii-iv) si ottenga con livelli attorno a 150  $\mu\text{gSe/l}$  con minime variazioni tra le diverse forme. Verifiche effettuate su un secondo gruppo di 4 capre (dati non mostrati) ha consentito di validare il livello d'esposizione a 150  $\mu\text{gSe/l}$  come quello favorente la proliferazione cellulare senza tuttavia rinvenire differenze tra le diverse forme di del Selenio (organiche Vs inorganiche). In ultimo, è stato verificato l'effetto *in vitro* dell'esposizione delle PBMC ad altre due forme organiche di Selenio: seleno-cisteina e seleno-cistina. Anche questo secondo set di esperimenti, ha confermato che il livello di 150  $\mu\text{gSe/l}$  rappresenta una condizione ottimale per la proliferazione cellulare mentre non sono riscontrabili differenze significative della risposta cellulare riferibili alla diversa forma di Selenio testata.



**Fig. 2 – Risultati di saggi di proliferazione cellulare *in vitro* condotti esponendo PBMC caprine a differenti forme chimiche del Selenio (SAO-Na= selenato di sodio; SIO-Na = selenito di sodio; Se-Met= seleno-metionina) a quattro livelli d'esposizione (50, 100, 150 e 200  $\mu\text{gSe/l}$  nel terreno di coltura). Le cellule sono state sottoposte a stimolazione con ConA (in alto) e con PWM (in basso) per 48h. Dati (media $\pm$ ES) espressi come risposta percentuale rispetto al controllo. <sup>A,B,C</sup>p<0,01; <sup>a,b,c</sup>p<0,05.**

## Vitamina E

Un set di esperimenti di proliferazione cellulare *in vitro* su PBMC di capra, è stato allestito con lo scopo d'individuare eventuali dosaggi di Vitamina E (solubilizzata nel terreno di coltura con l'ausilio di etanolo allo 0,05%, presente anche nei controlli) in grado di massimizzare la risposta cellulare alla stimolazione con mitogeni. I risultati ottenuti su 8 capre, sono illustrati in Fig. 3. I risultati ottenuti dalla sperimentazione consentono di affermare che la migliore risposta cellulare alla stimolazione con i mitogeni è stata ottenuta con concentrazioni di 1,8 µg/ml e 1,2-1,8 µg/ml rispettivamente per la stimolazione delle cellule con ConA (Fig. 3i) e con PWM (Fig. 3ii). Nel caso della stimolazione con ConA, è stata osservata una chiara relazione dose-effetto per i livelli di Vitamina E 0,6, 1,2 e 1,8 µg/ml stante a denotare una risposta progressivamente crescente in prevalenza dei linfociti T a dosi crescenti della Vitamina.

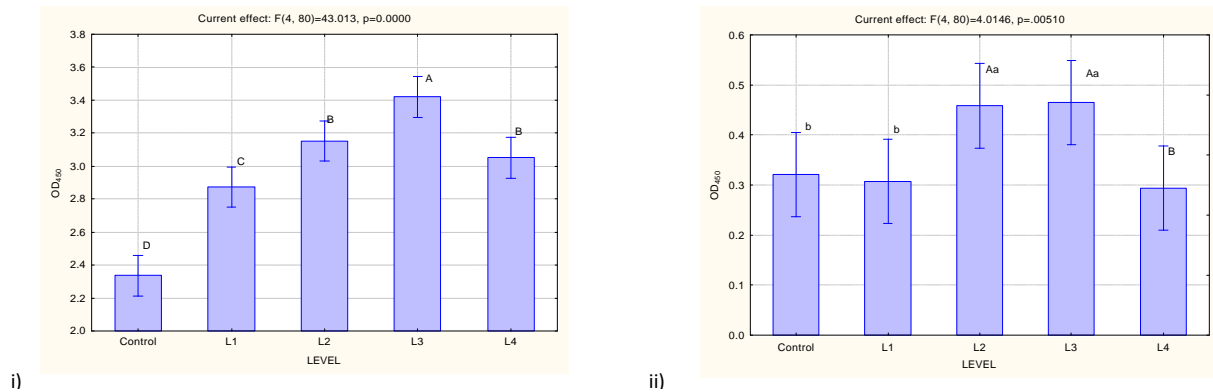


Figura 3 – Risultati dei test di proliferazione cellulare *in vitro* effettuati su PBMC ottenute da 8 capre da latte donatrici. Le cellule sono state sottoposte a stimolazione con i) ConA e ii) PWM per 48h. Dati (media±ES) espressi come densità ottica a 450 nm. L1= 0,6 µg/ml; L2= 1,2 µg/ml; L3= 1,8 µg/ml e L4= 2,4 µg/ml. <sup>A,B,C,D</sup> p<0,01; <sup>a,b</sup> p<0,05.

## Iodio

Adottando un simile approccio sperimentale di dosaggio *in vitro* a quelli sviluppati per il Selenio e la Vitamina E, sono stati allestiti alcuni esperimenti per verificare se e a che livello due differenti forme di Iodio (ioduro di sodio vs tetraiodo-L-tironina) possono avere effetto sulla capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC caprine con stimolazione da ConA e PWM. I risultati ottenuti dalla sperimentazione *in vitro*, consentono di evidenziare che con entrambe le forme chimiche dell'elemento, la stimolazione di differenti categorie di linfociti (T vs B) mostra una certa sovrapposibilità (Figg. 5-6).

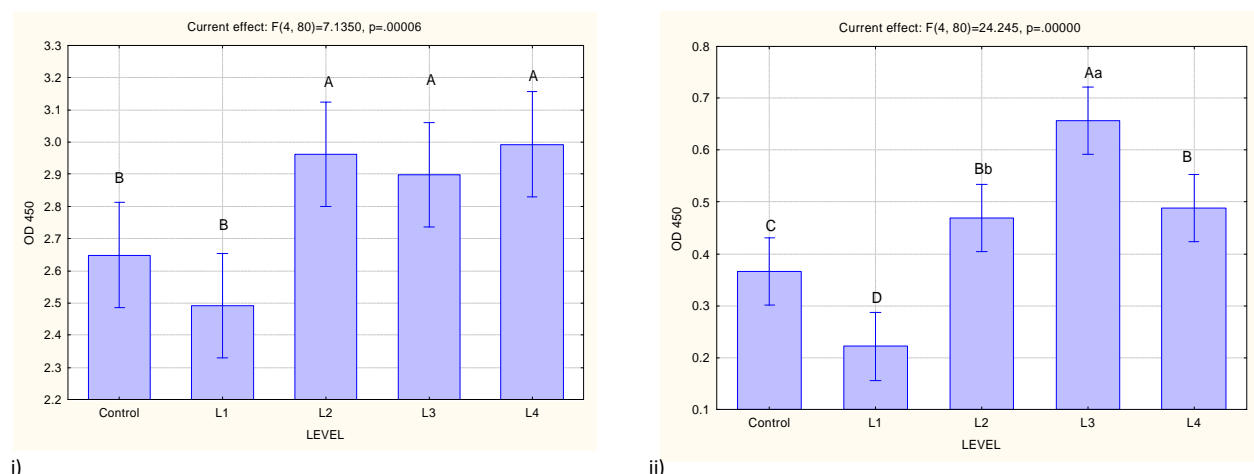
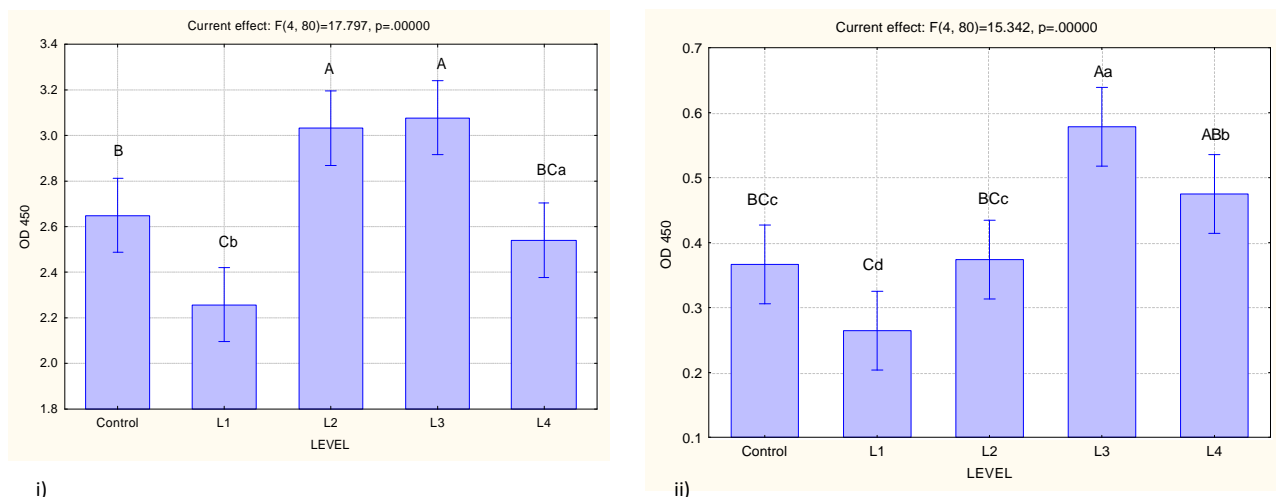


Figura 4 – Risultati dei test di proliferazione cellulare *in vitro* effettuati su PBMC ottenute da 8 capre da latte donatrici a diverse concentrazioni di Iodio (come ioduro di sodio). Le cellule sono state stimolate con i) ConA e ii) PWM per 48 h. Dati (media±ES) espressi come densità ottica a 450 nm. L1= 1 µg/ml; L2= 2 µg/ml; L3= 4 µg/ml e L4= 8 µg/ml. <sup>A,B,C,D</sup> p<0,01; <sup>Aa,Bb</sup> p<0,05.

La stimolazione preferenziale dei linfociti B con ConA, ha consentito di ottenere un significativo incremento della proliferazione cellulare con concentrazioni di 2,4 e 8 µg/ml (Fig. 4i) e 25, 35 µgT4/ml (Fig. 5i) mentre la presenza di 4

µg/ml (Fig. 4ii) e 35 µg/ml di T4 (Fig. 5ii), appaiono essere le condizioni ottimali per la stimolazione delle PBMC con il PWM, che agisce preferenzialmente sui linfociti B.



**Figura 5 – Risultati dei test di proliferazione cellulare in vitro effettuati su PBMC ottenute da 8 capre da latte donatrici a diverse concentrazioni di tetraiodo-L-tironina (T4). Le cellule sono state stimolate con i) ConA e ii) PWM per 48h. Dati (media±ES) espressi come densità ottica a 450 nm. L1= 15 µg/ml; L2= 25 µg/ml; L3= 35 µg/ml e L4= 45 µg/ml. <sup>A,B,C,D</sup> p<0,01; <sup>a,b</sup> p<0,05.**

### Sostanze tanniche

Al fine di valutare l'effetto del tannino estratto da castagno sulla cinetica di degradazione ruminale della proteina, le prove di degradabilità e produzione di gas *in vitro* sono stati condotti presso i laboratori dell'U.O. IZ-UCSC. Obiettivo di questa azione è la individuazione di estratti polifenolici o di (sotto)prodotti vegetali ricchi in tali componenti capaci di ridurre la degradazione proteica ruminale evitando tuttavia effetti marcatamente negativi in termini di digestione della sostanza organica complessiva della razione. Le prove sono state concepite tenendo conto dei seguenti aspetti:

i) L'opportunità di verificare l'effettiva efficacia di diverse tipologie di tannini che in precedenti nostre esperienze avevano già fornito indicazioni circa il fatto che, pur riducendo entrambi la degradazione proteica ruminale, agirebbero tuttavia attraverso meccanismi differenti, aprendo quindi la prospettiva di una loro possibile azione sinergica;

ii) L'opportunità di quantificare l'effetto dei polifenoli "per sé", senza l'effetto potenzialmente distorsivo di altri costituenti ad essi associati come accade nel caso di prodotti con un più basso titolo polifenolico, prima di passare a materiali di questo tipo, in genere economicamente più convenienti e più facilmente utilizzabili in zootecnia biologica.

Il lavoro sperimentale relativo alle prove *in vitro* fino ad oggi svolto e per il quale siano già disponibili i risultati ha riguardato i tannini di castagno (due prodotti ottenuti con differenti tecniche estrattive), di buccia di uva e di vinaccioli.

Le prove *in vitro* sono state effettuate 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 ruminali. 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. Come substrato per le fermentazioni è stata impiegata dell'erba medica raccolta in campo in stadio di prefioritura, subito essiccata in stufa a 50 °C e quindi macinata con mulino a coltelli utilizzando una griglia da mm. Tale substrato è stato impiegato in misura di 0.5 g di materiale tal quale / unità di fermentazione. Immediatamente prima dell'aggiunta dell'inoculo ruminale, nelle unità di fermentazione delle tesi sperimentali sono stati aggiunti i tannini, sotto forma di soluzione acquosa e in dosi pari a 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 e 4.0 % del substrato. I calcoli delle dosi effettive i prodotto da aggiungere è stata

effettuata in base al contenuto in tannini totali degli stessi. Le tesi di controllo negativo sono state allestite con solo inoculo ruminale, quindi senza alcun substrato, e con l'aggiunta dei tannini alle medesime dosi. Per ogni tesi, di controllo (senza substrato incubato) e non (con medica come substrato) ne è stata allestita una analoga, quindi con le medesima quantità di substrato e tannini) con l'ulteriore aggiunta di PEG (polietilenglicole) 6000. Il PEG viene suggerito per la sua capacità di bloccare i tannini inattivandoli e quindi isolare, per differenza tra le tesi con o senza PEG, l'effetto dovuto ai tannini da quelli attribuibili ad altri componenti degli additivi. Questo approccio, valido soprattutto per lo studio di foraggi e alimenti in genere contenenti tannini è stato comunque ritenuto interessante anche per estratti "puri" quali quelli utilizzati fino a questo momento in vista dell'impiego di prodotti e sottoprodotti che li contengano in dosi ovviamente inferiori. I controlli hanno riguardato l'evoluzione del contenuto in ammoniaca, controllato dopo 6, 12 e 24 ore di incubazione. Al termine delle fermentazioni tutto il contenuto i minifermentatori è stato filtrato: il filtro con il residuo è stato essiccato per il calcolo della digeribilità della sostanza secca ed è stato recuperato anche un campione di liquido per la eventuale valutazione del contenuto in proteine solubili. Il materiale solido residuo è stato conservato in quanto si ritiene possibile effettuare sullo stesso anche la determinazione del contenuto in protidi grezzi, non prevista nel protocollo iniziale, almeno per le tesi che risulteranno di maggiore interesse in base ai dati di ammoniaca. Per ciascuna tesi sono state predisposte tre repliche. Altre tre repliche sono state allestite, con identici criteri, per la valutazione gli effetti sui processi di fermentazione dei carboidrati mediante la misurazione della produzione di gas – indicatore indiretto delle cinetiche di fermentazione ruminali – e della digeribilità della fibra (NDF). Per ogni tesi sono quindi stati allestiti 6 mini-fermentatori.

La produzione di gas è stata misurata a 2, 4, 6, 8, 12 e 24 ore dall'avvio della fermentazione. La fermentazione è stata interrotta dopo 24 ore 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 elaborati utilizzando la procedura NLIN del SAS, secondo il seguente modello:

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

dove:  $\text{Vol}_t$  = volume misurato al tempo t (ore); b = massima produzione potenziale di gas; c = velocità di produzione di gas; t = tempo (ore).

Gli estratti di castagno (Fig. 6 e 7) hanno comportato un marcato calo dei livelli di ammoniaca rispetto alle tesi di controllo a tutti i tempi. La dose massima impiegata (4%) del primo prodotto (Fig. 6) ha ridotto i livelli netti di ammoniaca di circa il 90% a 6 or, del 70% a 12 e del 50% ancora a 24 ore. L'effetto è stato inoltre pressochè linearmente correlato alla quantità di modulatore utilizzato. Il secondo tipo di tannini di castagno (Fig. 7) ha avuto effetti analoghi ma più marcati in fase iniziale di fermentazione e leggermente più sfumati al termine della stessa. Ancora con riferimento alla massima dose di impiego, la produzione di ammoniaca è stata sostanzialmente annullata a 6 e 12 ore e ridotta di 60% circa a 24 ore. In entrambi i casi il PEG non è stato in grado di contrastare efficacemente l'effetto dei polifenoli sulla degradazione proteica.

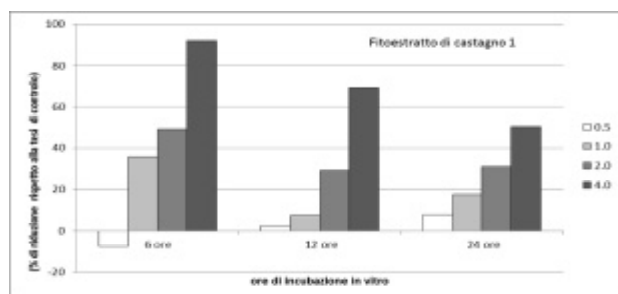


Figura 6 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 1) sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

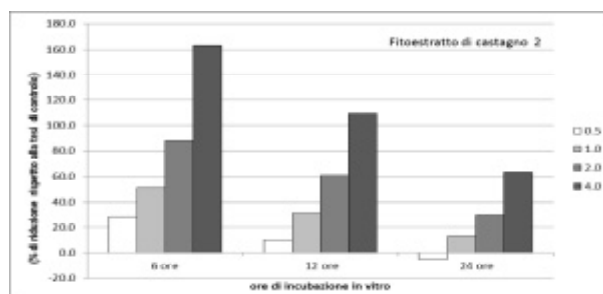


Figura 7 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 2) sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

Anche i tannini tratti dai residui della vinificazione sono risultati efficaci nel modulare la degradazione proteica, ma l'effetto è stato differente in funzione della materia prima di partenza. Quelli derivanti dalla sola buccia d'uva (Fig. 8) sono infatti risultati meno efficaci al tempo più breve (6 ore, calo del 40% circa dell'ammoniaca) ma hanno mantenuto un marcato effetto di contenimento dei livelli di ammoniaca fino al termine della fermentazione (calo del 20 – 25% fino alle 24 ore), mentre quelli da vinaccioli (Fig. 9) hanno avuto un effetto inizialmente molto marcato, con un calo di ammoniaca del 90% circa rispetto al controllo, che si è mantenuto consistente anche a 12 ore (-60 %) ma si è notevolmente attenuato alle 24 ore (-10% circa).

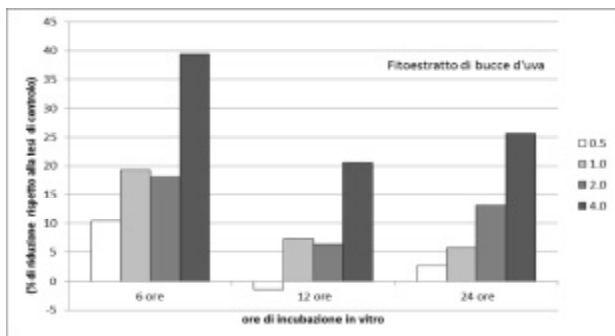


Figura 8 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di bucce d'uva sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

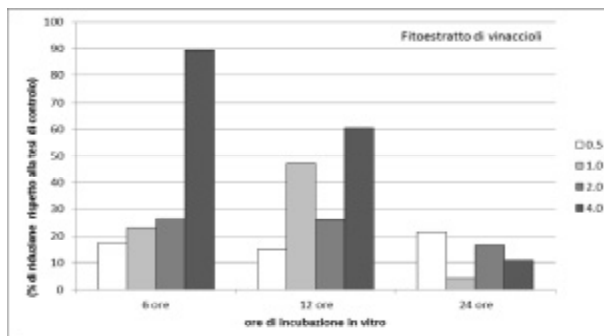


Figura 9 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di vinaccioli sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

In entrambi i materiali (bucce d'uva e vinaccioli) i tannini sono costituiti da forme condensate quindi con caratteristiche differenti rispetto a quelli di castagno. Quelli di vinaccioli paiono tuttavia più efficaci nel complessare le sostanze proteiche più facilmente degradabili, e forse solubili, rispetto a quelli ottenuti dalla buccia. In questi casi il PEG ha efficacemente contrastato l'azione complessante dei tannini contenendone molto gli effetti o addirittura aumentando i livelli di ammoniaca, verosimilmente in quanto può avere complessato anche i tannini naturalmente presenti nella medica impiegata come substrato.

Nelle successive Figg. 10-13 sono invece illustrati i risultati relativi alla produzione di gas *in vitro*. Si può osservare come i tannini di castagno e dei sottoprodotti della vinificazione abbiano solo marginalmente ridotto la produzione di gas, con percentuali di riduzione non superiori al 5-6% e senza una stretta relazione con le dosi di tannino impiegate. Sotto questo profilo le differenze tra i diversi tannini sono risultate essere molto contenute.



Figura 10 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 1) sulla produzione di gas *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.



Figura 11 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 2) sulla produzione di gas *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.



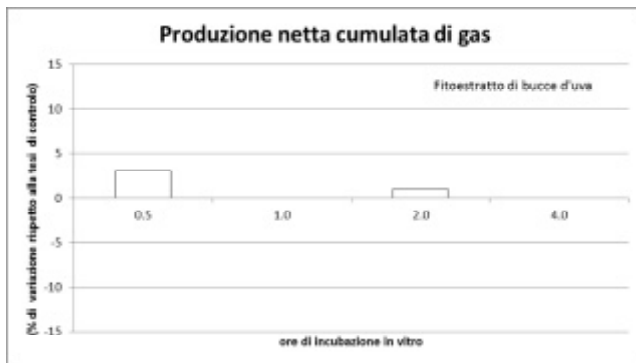


Figura 12 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di bucce d'uva sulla produzione di gas *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

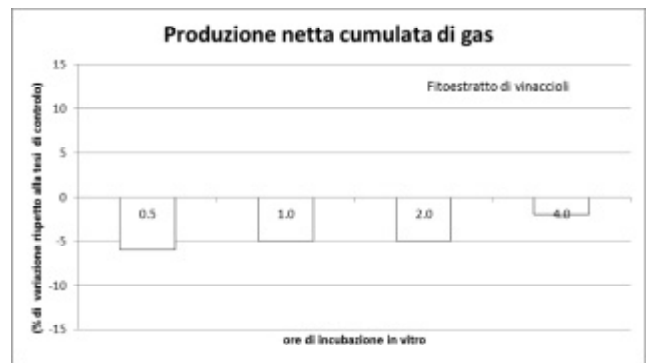


Figura 13 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di vinaccioli sulla produzione di gas *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

### Sintesi dei risultati e considerazioni conclusive

Sulla base dei risultati disponibili che saranno utilizzati per formulare diete per piccoli ruminanti da latte arricchite di Selenio, Vitamina E, iodo e composti tannici partendo da fitoderivati individuati nel corso di questa prima fase, si può affermare che:

- un livello di Selenio nel mezzo di coltura di 150  $\mu\text{gSe/l}$  rappresenta un valore che garantisce la piena potenzialità di risposta *in vitro* del sistema cellulare testato (PBMC di capra), apparentemente senza differenze significative ascrivibili alla forma chimica in cui l'elemento è stato impiegato (selenato, selenito, seleno-metionina, seleno-cisteina e seleno-cistina); sulla scorta dei dati rinvenuti nella letteratura di settore, con particolare riferimento ai piccoli ruminanti, il livello ematico di 150  $\mu\text{gSe/l}$  sembra un obiettivo raggiungibile mediante opportuni interventi alimentari;
- le verifiche effettuate *in vitro* hanno consentito d'individuare un livello di Vitamina E nel mezzo di coltura delle PBMC di capra pari a 1,8  $\mu\text{g/ml}$  come ottimale per la stimolazione dei preferenzialmente dei linfociti T e 1,2-1,8  $\mu\text{g/ml}$  per quella dei linfociti B mediate rispettivamente dai mitogeni ConA e PWM; anche in questo caso la letteratura disponibile consente di prevedere l'ottenimento di interessanti risultati nell'applicazione *ex vivo* ed "on farm" di idonei interventi alimentari volti ad integrare, laddove necessario, la razione con fitoderivati ad elevato titolo di Vitamina E;
- la presenza di Iodio sottoforma di ione ioduro (f. inorganica) e sottoforma di ormone tiroideo T4 alle concentrazioni nel mezzo di coltura delle PBMC di capra di 2-4  $\mu\text{g/ml}$  e 35  $\text{pg/ml}$  rispettivamente, incrementa significativamente la capacità proliferativa di diverse popolazioni linfocitarie (Linfociti T e B) indicando che interventi alimentari tesi a migliorare la disponibilità di Iodio per la capra da latte possono produrre benefici in termini di risposta immunitaria cellulo-mediata; in vista dell'applicazione *ex vivo* e poi "on farm", tali risultati appaiono riproducibili mediante idonea integrazione alimentare con fitoderivati ricchi in Iodio;
- gli estratti tannici testati hanno marcatamente ridotto la produzione di ammoniaca *in vitro*, in misura largamente dose-dipendente sebbene le modalità di azione dei tannini ottenuti da fonti diverse non sono apparse esattamente sovrapponibili, per cui si intravede la possibilità impiego combinato di tipi diversi di tannino al fine di sfruttare utili sinergie tra le differenti forme chimiche;
- l'effetto deprimente sull'attività ruminale nel suo complesso, che spesso si attribuisce ai tannini, è risultato contenuto entro limiti più che accettabili, almeno in base ai risultati delle prove di gas production. E' tuttavia necessario attenderne la conferma dai risultati relativi alla digeribilità della sostanza secca e della fibra, attualmente in corso e che saranno disponibili in tempi molto brevi.