

1^a Relazione Semestrale 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

Nel corso dei primi 6 mesi di attività il gruppo di ricerca che coordino ha iniziato a sviluppare il progetto secondo quanto stabilito nel protocollo sperimentale finanziato. Le due Unità Operative (UO) del progetto - Istituto di Zootecnica ed Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale dell'Università Cattolica del S. Cuore - hanno operato in stretto collegamento tra loro nell'ottica di valutare l'efficacia del trattamento nutraceutico, costituito da un omogeneizzato di *Aloe arborescens*, in bovine da latte nel periodo di transizione. Nei primi 6 mesi di progetto, l'attività delle UO ha indagato sui seguenti aspetti:

- i. Definizione delle condizioni più opportune per la preparazione e la conservazione dell'omogeneizzato di *Aloe arborescens*;*
- ii. Valutazione dell'effetto di tale omogeneizzato sul biochimismo ruminale, allestendo una specifica prova sperimentale in vitro;*
- iii. Ottimizzazione della metodica di analisi di alcune componenti dell'aloè (antrachinoni) nel plasma e nel latte, utili a valutare la degradazione nel digerente e l'eventuale assorbimento dell'essenza quando somministrata alla bovina;*
- iv. Valutazione dell'assorbimento ematico di antrachinoni contenuti nell'omogeneizzato di aloè somministrato in dose unica a bovine da latte in fase medio-avanzata;*
- v. Impostazione della sperimentazione su bovine da latte nella fase di periparto.*

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

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 florovivaistica 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'aloè). 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 non statisticamente 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 ($+22^\circ\text{C}$), frigorifero ($+4^\circ\text{C}$) 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 aveva lo scopo di valutare gli eventuali effetti dell'aloè sui processi digestivi a livello ruminale. A tal fine, 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 aloe 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'aloe 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 aloe 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 di fermentazione in vitro.

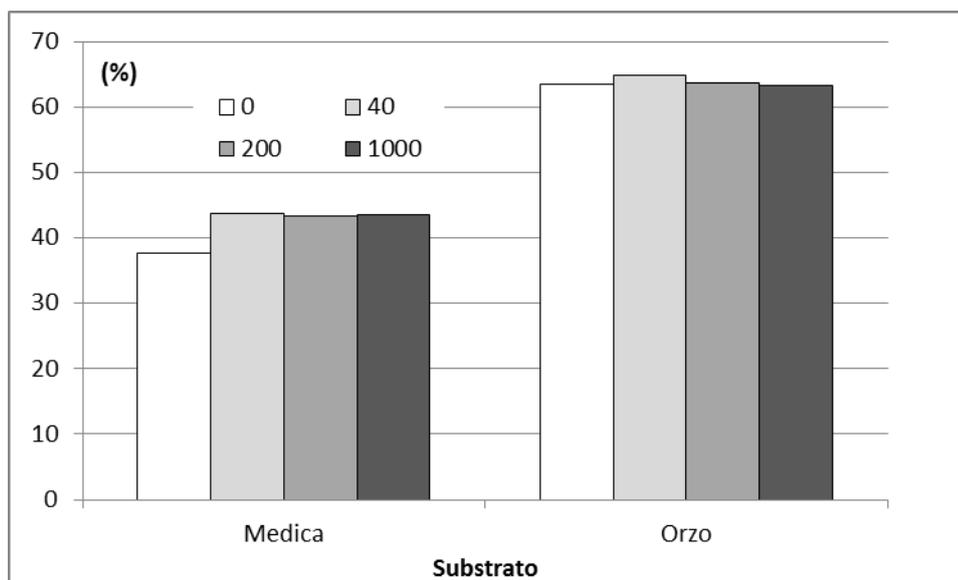


Grafico 1: Effetto dell'aggiunta di un omogeneizzato fresco di Aloe arborescens (le dosi sono espresse come g/100 l di contenuto ruminale) sulla digeribilità in vitro della sostanza secca (IVDMD) di un fieno di medica e di una farina di orzo dopo 8 ore di incubazione.

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 organica digerita.

Pur non essendo ancora i dati definitivi e per quanto non sia stata effettuata una verifica statistica dei risultati acquisiti si può tuttavia 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). 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'aloë non interferisce negativamente con il metabolismo ruminale ma, al contrario, tende a migliorarne la capacità digestiva.

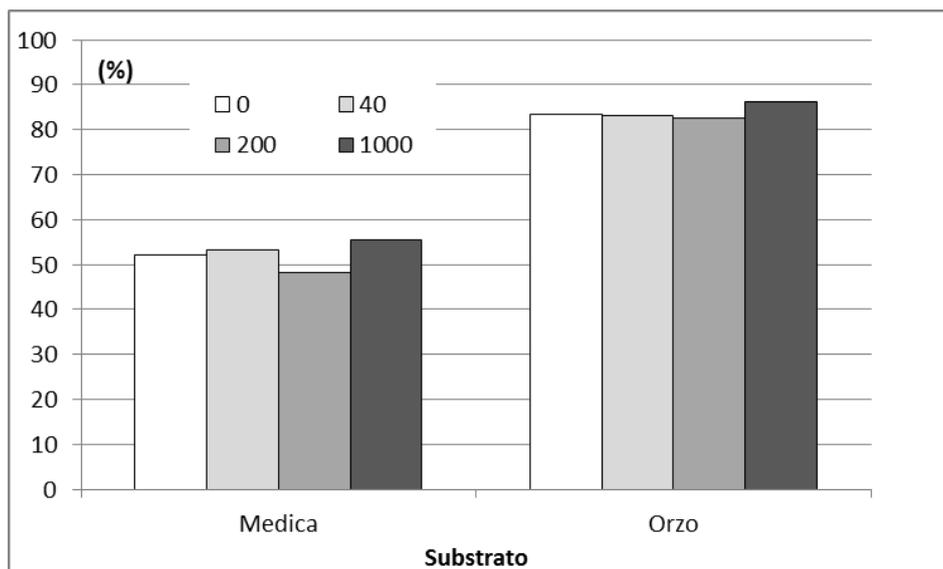


Grafico 2: Effetto dell'aggiunta di un omogeneizzato fresco di Aloe arborescens (le dosi sono espresse come g/100 l di contenuto ruminale) sulla digeribilità in vitro della sostanza secca (IVDMD) di un fieno di medica e di una farina di orzo dopo 24 ore di incubazione.

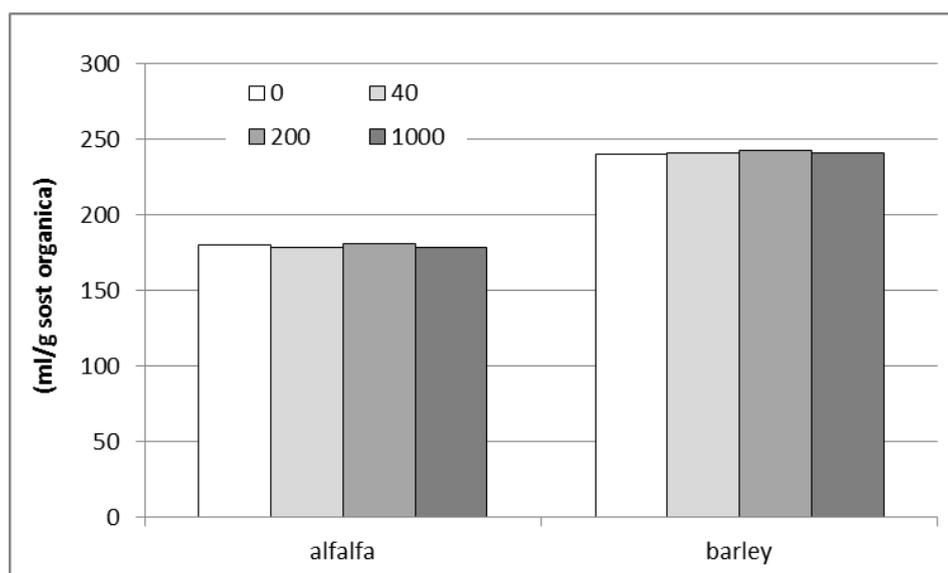


Grafico 3: Effetto dell'aggiunta di un omogeneizzato fresco di Aloe arborescens (le dosi sono espresse come g/100 l di contenuto ruminale) sulla produzione di gas in vitro, dopo 24 ore di incubazione, impiegando come substrato un fieno di medica oppure una farina di orzo.

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 rapida denaturazione di tali prodotti da parte dei batteri ruminali oppure una loro rapida trasformazione o coniugazione con altre sostanze. Sono in corsa indagini per verificare il destino delle aloine nel ruminale.

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 ruminanti

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. Il campione è stato pertanto sottoposto a due estrazioni sequenziali al fine di massimizzare l'efficienza di estrazione. 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 min. 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 aloè-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 precipitazione delle proteine, la stabilità dell'aloina e dell'aloë-emodina in differenti solventi, la stabilità nell'estratto, l'effetto matrice (soppressione ionica) ed il recupero da plasma dell'intero metodo analitico. 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 aloë-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 due livelli di fortificazione (2 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ per aloina, 2 e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ per aloë-emodina), con 3 replicati per livello. Il recupero medio è risultato pari a 86% (RSD=18%) per aloina e 87% (RSD=21%) per aloë-emodina.

La determinazione del contenuto di aloina ed aloë 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 aloë-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 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

Questa metodica è ancora in corso di set up, considerato che i primi campioni sono appena stati resi disponibili.

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 (23-25°C nei periodi con elevate temperature esterne e 18-20 °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 4 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. 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 4 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 limine minimo di rilevazione. Il picco di assorbimento

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.

dell'aloina 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 ruminale 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 dopo 24 ore dalla sua somministrazione, pur in modeste quantità ed al limite della rilevazione;

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

Tabella 1 – Andamento della vitamina A palmitato e dell'aloina nel plasma di 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	129,8 \pm 51,6	0,37 \pm 0,75
4	243,1 \pm 96,9	6,53 \pm 6,122
6	330,1 \pm 178,2	1,50 \pm 0,84
8	406,2 \pm 221,3	1,36 \pm 1,10
11	460,4 \pm 159,8	1,21 \pm 1,47
24	248,9 \pm 46,6	1,18 \pm 0,41

ND = al di sotto del limite di rilevamento

Nel complesso l'assorbimento di aloina appare rapido, ben più elevato della vitamina A almeno in 2 soggetti su 4, 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.

**v. impostare la sperimentazione su bovine da latte nella fase di periparto.
(WP3.1)**

Questa attività rappresenta la fase più rilevante della ricerca perché ha lo scopo di monitorare gli effetti della somministrazione di aloe 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, in quanto a tale quantità non è corrisposta alcuna conseguenza negativa a livello di fermentazioni ruminali e l'apporto di aloina, se riferito al peso vivo, è inferiore a quello assunto da una persona che segue una cura prolungata a base di aloe. Conseguentemente il dosaggio superiore (A2) è stato fissato a 200 g/capo/d, ovvero il doppio di A1, così come stabilito nel protocollo (WP 3.1). In secondo luogo è stato stabilito il protocollo per la standardizzazione del prodotto ottenuto dall'omogeneizzazione di foglie di *Aloe arborescens* sulla base delle precedenti fasi che hanno consentito di caratterizzare l'essenza vegetale, in modo da poter disporre di un preparato stabile all'ossidazione, molto rapida dopo la procedura di omogeneizzazione, e di facile somministrazione alle bovine.

Stalla sperimentale. La prova è attualmente in corso di svolgimento 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 software, dei seguenti dati:

- attività motoria (numero passi), produzione di latte, conducibilità elettrica e peso vivo (sistema AFIMILK, SAE Afikim, Israele);
- attività motoria (movimenti del collo) e attività ruminativa (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) una volta al giorno (al mattino), contenente principalmente insilato di mais, fieno di erba medica e concentrati, che sarà mantenuta costante nella sua composizione 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. Le bovine destinate alla prova sono state selezionate sulla base di alcune caratteristiche (età, numero lattazioni, peso vivo, stato di ingrassamento, merito genetico, epoca di parto) e sono state suddivise in 3 gruppi omogenei: controllo (senza alcun trattamento), A1 (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 (200 g/d di aloe per lo stesso periodo del trattamento A1). L'omogeneizzato di aloe è 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 avviene 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.

Attualmente sono in prova una decina di soggetti ripartiti nei 3 trattamenti e sono in corso i controlli previsti dal protocollo.

Il Responsabile Scientifico
Dr Erminio Trevisi