

**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 del secondo semestre di attività il gruppo di ricerca che coordino ha proseguito il suo lavoro in conformità al protocollo sperimentale finanziato. Le due Unità Operative (UO) del progetto - Istituto di Zootecnica (UO1) ed Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale (UO2) dell'Università Cattolica del S. Cuore - hanno operato in modo coordinato ed 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. Nel dettaglio l'attività svolta nel 2° semestre di progetto ha riguardato i seguenti aspetti:

- i. Sperimentazione su bovine da latte con somministrazione di omogeneizzato di aloe nella fase del periparto.*
- ii. Controlli sui vitelli nati dalle bovine alimentate o meno con l'omogeneizzato di aloe*

i. Sperimentazione su bovine da latte con somministrazione di omogeneizzato di aloe nella fase di periparto (WP3)

La sperimentazione con somministrazione dell'omogeneizzato di *Aloe arborescens* alle bovine nel periparto è iniziata al termine del primo semestre ed è stata eseguita presso l'allevamento bovino del Centro di Saggio CERZOO di proprietà dell'Università Cattolica del S. Cuore, che si caratterizza per avere condizioni di allevamento, alimentazione e gestione rappresentative delle procedure operative tipiche italiane coniugate ad una elevata standardizzazione e controllo delle procedure. Nel 1° semestre si era proceduto a:

- definire il dosaggio di prodotto da somministrare alle bovine nel corso del parto e si era deciso di utilizzare 3 dosaggi: 0, 100 e 200 g/capo/d rispettivamente, corrispondenti alle tesi di controllo (CTR), dosaggio inferiore (A1) e dosaggio superiore (A2) di aloe (WP 3.1);
- definire il protocollo di preparazione e conservazione dell'omogeneizzato di foglie di Aloe arborescens, in modo da poter disporre di un preparato stabile, di rapida preparazione e di facile somministrazione alle bovine;
- selezionare dei soggetti (30 capi) da impiegare nella prova, divisi in 3 gruppi omogenei per età, numero lattazioni, peso vivo, stato di ingrassamento, merito genetico, epoca di parto.

La somministrazione di aloe è avvenuta a partire da 2 settimane prima della data presunta del parto ed è continuata sino a 14 giorni dopo il parto. L'omogeneizzato di aloe è stato somministrato per os individualmente a ciascuna bovina, al mattino in occasione della distribuzione della foraggiata. Le bovine di controllo hanno invece ricevuto la sola dieta unifeed utilizzata presso l'allevamento.

Controlli sulle bovine – L'allevamento sperimentale in cui è in corso di svolgimento la prova è provvisto di sistemi automatizzati di rilevazione delle performance e di talune condizioni sanitarie delle bovine. In particolare le bovine sono dotate di un podometro, posizionato sull'arto posteriore destro, e di un collare. Questi dispositivi permettono l'acquisizione, in appositi e distinti softwares, 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).

Oltre a tali rilevazioni on-line, le bovine sono state singolarmente monitorate nell'ultimo mese di gravidanza e nel primo mese di lattazione, per i seguenti aspetti:

- stato di salute: oltre alle 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 (WP3.2);

- 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 (WP3.2);
- temperatura rettale: circa -14, -7, -3 giorni dal parto, il mattino seguente al parto e dopo 3 e 7 gg dallo stesso (WP3.2);
- almeno due visite ginecologiche tra 7-10 e 28-35 giorni di lattazione (WP3.2);
- raccolta di campioni di sangue dalla vena giugulare: immediatamente prima del pasto del mattino, a circa 21, 14 (prima della somministrazione dell'omogeneizzato), 7 e 3 giorni prima del parto presunto; al mattino seguente il parto, nonché a 3, 7, 14 (ultimo giorno della somministrazione del prodotto), 21, 28 giorni di lattazione. Tutti i prelievi ematici sono eseguiti in provette da 10 ml sottovuoto contenenti Li-eparina come anticoagulante e sono immediatamente collocati in acqua e ghiaccio sino al momento della centrifugazione (15 minuti, a 4°C, a 3500 g). Il plasma ottenuto, frazionato in più aliquote, è stoccato a -20°C sino al momento delle determinazioni analitiche (WP3.3);
- raccolta di campioni di latte rappresentativi del colostro e della mungitura del mattino a 7, 14, 21 e 28 giorni di lattazione. Tali campioni sono analizzati entro poche ore dal prelievo con uno strumento (MilkoScan™ FT120) che si avvale dell'analisi Infrarosso con trasformata di Fourier (FTIR) per la determinazione di grasso, proteine, caseine, urea, lattosio, acidità titolabile, attitudine alla coagulazione. Su una frazione è stato anche determinato il contenuto in cellule somatiche, mentre un'aliquota è stata stoccata a -20°C per la determinazione degli antrachinoni (WP3.3) tramite estrazione in solvente, purificazione e quindi cromatografia liquida con spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

Nel corso della prova sono state registrate anche le eventuali ulteriori visite ginecologiche e ogni intervento inseminativo sino alla diagnosi di gravidanza o alla riforma. Infine sono stati eseguiti prelievi degli alimenti utilizzati nelle razioni alimentari ad ogni loro variazione significativa (WP3.2).

Al termine del 12° mese di progetto sono stati completati i rilievi su 23 soggetti e sono in corso i controlli su altre 13 bovine.

Controlli sui vitelli: Sui vitelli nati dalle bovine che hanno ricevuto i diversi dosaggi di omogeneizzato di aloe nel periparto ed alimentati con il colostro materno sono stati valutati gli effetti a livello dello stato di salute (esame giornaliero), degli incrementi

ponderali, pesando i vitelli alla nascita, a 7 e 21 giorni di vita, e del profilo ematico, prelevando un campione di sangue a 3 e 21 giorni di vita.

Valutazione delle condizioni di preparazione e conservazione dell'omogeneizzato di Aloe: le modalità di preparazione dell'omogeneizzato fogliare (età e porzione della pianta, modalità di omogeneizzazione) e soprattutto le modalità di stabilizzazione dello stesso (protezione nei confronti della degradazione biotica ed abiotica) sono stati studiati dalla UO2 con lo scopo di garantire un apporto certo e controllato delle componenti ad attività nutraceutica. Nel dettaglio sono stati considerati sia agenti antimicrobici che preservanti dell'ossidazione, ed il loro effetto è stato studiato a differenti temperature.

Analisi degli alimenti e dell'omogeneizzato di Aloe: tutti gli alimenti somministrati alle bovine (incluso l'omogeneizzato di aloe) sono stati analizzati per la determinazione dei principi immediati (umidità, proteina grezza, sostanze grasse grezze, fibra grezza, NDF, ADF, amido, zuccheri totali, ceneri). Queste analisi saranno utilizzate per un controllo più approfondito delle razioni alimentari offerte alle bovine. Questa indagine sarà completata in fase di elaborazione dei dati (ultimo semestre della ricerca).

Relativamente all'omogeneizzato di Aloe, si è proceduto anche alla determinazione del contenuto in aloina A e aloina B, nonché in aloe-emodina, per ogni preparazione destinata alla somministrazione, a cura dell'UO2 tramite LC-MS/MS. Inoltre, su un campione rappresentativo di 3 piante dello stesso lotto di quelle utilizzate per la preparazione degli omogeneizzati, sono stati determinati quantitativamente i β -polisaccaridi rappresentativi (acemannani od aloe-mannani) tramite metodo colorimetrico.

ii. Risultati preliminari conseguiti

Analisi degli omogeneizzati e modalità di conservazione degli stessi.

Sulla base delle determinazioni analitiche eseguite, si è deciso di omogeneizzare tutte le foglie di piante di *Aloe arborescens* di 3 anni d'età. L'analisi degli omogeneizzati somministrati alle bovine ha evidenziato l'assenza di aloe-emodina ed una concentrazione

di aloina A+B pari a 1848 ± 122 mg/kg. La concentrazione di β -polisaccaridi nelle foglie di *Aloe arborescens* è risultata invece pari a 2242 ± 488 mg/kg β -glucano equivalenti.

Le prove relative alle modalità di conservazione dell'omogeneizzato fogliare hanno indicato come aloine e β -polisaccaridi subiscano una degradazione relativamente veloce, sulla quale sono inefficaci sia antiossidanti (ascorbato, BHA) che agenti antimicrobici (benzoato e sodio azide). La temperatura si è invece dimostrata efficace nel bloccare i processi degradativi, per cui gli omogeneizzati sono stati prontamente confezionati in porzioni da 100 g e conservati in freezer a -18 °C fino all'uso. Ulteriori prove di stabilità sono attualmente in corso con agenti di controllo dell'attività enzimatica (sodio metabisolfito e blanda pastorizzazione a 65 °C per 5 minuti).

Contenuto in aloina nel plasma.

A differenza di quanto ipotizzato da alcuni autori, che ne suppongono la presenza ematica a seguito di trasformazione da parte della microflora intestinale, l'aloie-emodina non è mai stata riscontrata nei campioni di plasma analizzati.

L'aloina (come somma dei due diastereoisomeri A e B) è stata invece riscontrata, come ipotizzabile sulla base della prova preliminare sulla cinetica di assorbimento ematico. I dati preliminari non evidenziano un accumulo di aloina a livello ematico, in quanto tale idrossiantrachinone è stato misurato a livelli molto bassi (prossimi ai limiti di quantificazione) e solo occasionalmente, in alcune bovine a 24 ore dalla somministrazione precedente. Attualmente sono in corso le analisi di ulteriori campioni di plasma ed è in definizione la metodica analitica relativa ad aloina nel latte bovino.

Stato di salute, performance produttive e metabolismo (WP3.5).

Allo stato attuale sono state completate le analisi ematiche su 18 bovine, 6 per gruppo, ovvero poco più della metà di quelle da protocollo, per tale ragione non verranno presentate tabelle e grafici. Sebbene non si possa ancora esprimere un giudizio definitivo circa i risultati ottenuti, e sebbene non sia ancora stata effettuata l'analisi statistica, si possono trarre alcune considerazioni preliminari di un certo interesse. Innanzitutto si è osservato che la somministrazione di aloie, nelle quantità e con le modalità utilizzate nel protocollo, non ha determinato problemi di appetibilità e non ha manifestato effetti negativi sulle bovine a livello sanitario e produttivo. Pur non significativamente diversa, la temperatura corporea ha mostrato livelli leggermente più elevati in Aloe 1 nelle prime 2

settimane di lattazione (39.1vs 38.9 °C di CTR). Invece, a livello dello stato di ingrassamento, Aloe 2 ha mostrato il calo più modesto nelle prime 4 settimane di lattazione, sia rispetto a CTR che Aloe 1. Le tesi Aloe (1 e 2) hanno evidenziato un livello produttivo lievemente inferiore al controllo in avvio di lattazione (prime due settimane), ma in seguito Aloe 1 ha mostrato una progressione più marcata. Al termine del 1° mese di lattazione le bovine di Aloe 1 hanno prodotto mediamente 4 litri di latte in più (49 kg/d) di quelle di controllo (45 kg/d), mentre quelle di Aloe 2 sono risultate le meno produttive (43 kg/d).

A livello della composizione del latte si osserva che le tesi aloe hanno mostrato un livello di grasso inferiore a CTR limitatamente al 7° giorno di lattazione ed un contenuto in cellule somatiche inferiore, specie in aloe 2, per l'intero primo mese di lattazione.

A livello metabolico si osservano invece poche differenze che riguardano soprattutto il metabolismo energetico. Le tesi aloe (specie Aloe 2) presentano nell'immediato post-parto livelli di glicemia più elevati e di corpi chetonici più bassi rispetto alle bovine di controllo. Questo fatto farebbe ipotizzare un bilancio energetico migliore in tali soggetti e sarebbe confermato dalla minore lipomobilizzazione, ovvero dal minor calo di BCS (evidenziato peraltro solo in Aloe 2) e acidi grassi non esterificati (cioè NEFA). Tuttavia anche il minore calo di creatinina nel primo mese di lattazione osservato nelle tesi aloe rispetto a CTR suggerisce una più ridotta perdita di massa muscolare rispetto alle bovine di controllo.

Per quanto concerne i parametri che monitorano i fatti infiammatori non è facile l'interpretazione in quanto tutti i soggetti mostrano la usuale risposta di fase acuta nel postparto. Tuttavia le bovine che hanno ricevuto l'aloè hanno evidenziato un calo dell'aptoglobina (la principale proteina di fase acuta) dopo la prima settimana di lattazione più rapido delle bovine di controllo. Inoltre, alcune proteine negative di fase acuta, la cui sintesi è ridotta in caso di severi fatti infiammatori, ha mostrato un aumento più marcato nel primo mese di lattazione nelle bovine riceventi aloè. Tra queste, vale la pena di sottolineare il colesterolo, indice delle apolipoproteine che sono sintetizzate a livello epatico, e la vitamina A, indice del suo carrier ematico - la Retinol Binding Protein - pure di sintesi epatica.

Pertanto, sebbene non si possano ancora trarre indicazioni conclusive, si può affermare che la somministrazione di un omogeneizzato di aloè nel periparto migliora il quadro metabolico e le performance delle bovine. Con il completamento della ricerca si potrà

valutare l'entità, la convenienza e il dosaggio del fitoprodotto più efficace da utilizzare in campo.

Valutazione della vitalità alla nascita e nei primi giorni di vita dei vitelli (WP4).

Tutti i vitelli hanno ricevuto una somministrazione di colostro di 2 litri prodotto dalla madre entro 2 ore dalla nascita. Eventuali differenze tra i vitelli possono così essere giustificate dalla qualità del colostro somministrato oltre che dal trattamento ricevuto dalla madre nelle ultime due settimane di gravidanza. Dai primi risultati assolutamente preliminari provenienti su poco più della metà dei vitelli oggetto dell'indagine, emerge che i figli delle bovine alimentate con omogeneizzato di aloe non hanno presentato particolari problemi di salute nel corso delle prime 3 settimane di vita. Nello stesso periodo tali vitelli hanno presentato incrementi ponderali più elevati di quelli delle bovine di controllo ed indicatori ematici che lasciano intendere l'assunzione di colostro di migliore qualità. Allo scopo di verificare tale ipotesi si intende valutare nel corso dell'ultima fase del progetto il contenuto in immunoglobuline nel colostro e nel sangue (3° giorno di vita) dei vitelli.

Piacenza, 30.01.2012

Il Responsabile Scientifico
Dr Erminio Trevisi