



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO



DIPARTIMENTO DI SCIENZE
VETERINARIE PER LA SALUTE LA
PRODUZIONE ANIMALE E LA
SICUREZZA ALIMENTARE

DOTTORATO DI RICERCA
“SCIENZE DELLA NUTRIZIONE”

**Curriculum: Alimentazione animale, sicurezza alimentare e
ricaduta sulla salute umana**

**Benessere animale e qualità dei
prodotti: ruolo di strategie
nutrizionali innovative**

Davide GOTTARDO

Matricola n° R11075 - R27

Tutor: Professor Vittorio Dell’Orto

Coordinatore: Professor Luciano Pinotti

Anno Accademico 2016-2017

Believe to achieve

Riassunto

Una corretta nutrizione degli animali d'allevamento permette di ottenere un adeguato livello produttivo e di benessere delle specie allevate, assicurando nel contempo il raggiungimento di ottimali caratteristiche qualitative dei prodotti derivati, in modo da garantire al consumatore alimenti che soddisfino i requisiti richiesti di sicurezza e salubrità e presentino un adeguato valore nutrizionale. In questo contesto, l'applicazione di strategie nutrizionali, inclusa l'aggiunta di additivi, utilizzati per migliorare le caratteristiche nutrizionali dei mangimi, può svolgere un ruolo determinante nella moderna zootecnia e costituisce uno dei temi principali del quadro normativo dell'Unione Europea.

Nel presente elaborato sono presentati quattro studi *in vivo* che valutano gli effetti della dieta sulle performance quantitative di polli da carne e suini; in particolare si sono considerati alcuni interventi quali l'impiego di emulsionanti, di un estratto polpe di oliva ad elevato tenore di polifenoli e di un probiotico nell'intero ciclo produttivo del pollo da carne, mentre per quanto riguarda la specie suina, l'integrazione dell'estratto polpe di oliva ad elevato tenore di polifenoli ha riguardato il periodo compreso tra la fine della gestazione e lo svezzamento dei suinetti, considerati due dei momenti più delicati dell'allevamento di questa specie.

La prima prova sperimentale prevedeva l'integrazione di un emulsionante sintetico a 1200 pulcini ROSS 308, equamente suddivisi in maschi e femmine e suddivisi in 4 gruppi costituiti da 12 recinti e 25 animali ciascuno. È stato utilizzato un disegno sperimentale multifattoriale 2x2 che permette di confrontare il trattamento alimentare (C vs T) e il sesso. L'additivo è stato somministrato in dosi di 1g/kg dal giorno 0 al giorno 12, 0,75g/kg dal giorno 12 al giorno 22 e di 0,5g/kg dal giorno 22 al termine della prova (37 giorni per le femmine e 44 per i maschi). Durante lo svolgimento della prova sono stati valutati i principali parametri produttivi (PV, IMPG, FI e ICA), mentre in fase di macellazione sono stati prelevati campioni di sangue, di tessuto epatico e del contenuto cecale per le successive analisi; è stato inoltre prelevato il petto per la determinazione della resa della carcassa e della qualità della carne. I risultati hanno mostrato che la supplementazione con emulsionante ha aumentato il peso vivo al giorno 12 ($P=0.02$), l'incremento ponderale nel primo periodo (0-12 giorni; $P=0.06$) e la resa alla macellazione ($P=0.02$). Relativamente alla qualità della carne, il gruppo trattato ha mostrato un significativo incremento dell'indice b^* ($P<0.01$) e una riduzione delle perdite in cottura ($P=0.03$). Il trattamento con l'emulsionante ha aumentato il contenuto plasmatico di colesterolo, HDL e LDL rispetto al gruppo controllo ($P<0.01$; $P=0.02$; $P<0.01$, rispettivamente), mentre non sono state osservate differenze significative sulla flora microbica intestinale. A partire da campioni epatici, è stata valutata l'espressione dei geni Apo A-I e Apo B, direttamente coinvolti con il metabolismo lipidico ed è stata riscontrata una significativa up regolazione ($P=0.0056$) del gene Apo B nelle femmine trattate. In conclusione, sebbene il sesso e l'età degli animali rappresentino importanti variabili da considerare, l'integrazione dell'emulsionante nell'alimentazione di polli da carne è in grado di apportare interessanti modifiche sui parametri di crescita, sul metabolismo lipidico, nonché sull'espressione di alcuni geni coinvolti.

La seconda prova sperimentale ha valutato gli effetti della somministrazione di un estratto polpe di oliva ad elevato tenore di polifenoli sulle performance di 720 pulcini ROSS 308 di sesso femmina. Gli animali sono stati suddivisi in quattro gruppi sperimentali, costituiti da 12 recinti e 20 soggetti ciascuno, e alimentati con 200 I.U./kg di vitamina E (T1), 1 e 5gr/kg di Ethifenol (T2 e T3,

rispettivamente), titolato a 25mg/g di polifenoli totali. Durante lo svolgimento della prova sono stati valutati i principali parametri produttivi (PV, IMPG, FI e ICA), in fase di macellazione sono stati prelevati campioni di sangue, di tessuto epatico e del contenuto cecale per le successive analisi, inoltre è stato prelevato il petto per la determinazione della resa della carcassa e della qualità della carne. I risultati relativi ai parametri produttivi e alle analisi microbiologiche del cieco non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi sperimentali. Al contrario, l'integrazione dell'additivo ha modificato il parametro b*(giallo) della pelle degli animali ($P=0.003$). A partire da campioni di tessuto epatico prelevati è stata effettuata l'estrazione e la quantificazione dei polifenoli totali e la valutazione di alcuni geni coinvolti nel metabolismo lipidico (PPAR α , ATGL, ACACA, CPT-1, ACOX e FASN). Sebbene in assenza di significatività statistica ($P>0.05$), la concentrazione di composti fenolici presenti nel fegato rispecchia il livello crescente di integrazione; in aggiunta, è stata osservata una modificazione non significativa dell'espressione dei geni sopra riportati. In conclusione, la somministrazione dell'additivo oggetto della prova ha apportato dei lievi benefici, che tuttavia appaiono interessanti considerando il breve ciclo produttivo dei polli da carne.

La terza prova sperimentale ha previsto l'integrazione dell'estratto di polpe di oliva, oggetto della precedente prova, a 18 scrofe pluripare (fase 1), omogenee per età e ordine di parto, suddivise in due gruppi sperimentali di 9 soggetti ciascuno (controllo = C e trattato = T), per un periodo di circa 40 giorni (da circa due settimane prima della data prevista del parto al termine della lattazione). Il gruppo T ha ricevuto una dieta basale (C) addizionata con l'estratto di oliva in quantità di 1,25kg/ton. Al termine della lattazione (25d), tutti i suinetti nati ($n=180$) sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali costituiti da 45 soggetti e 9 repliche ciascuno (fase 2), per una durata di 42 giorni. I suinetti appartenenti al gruppo Ctr-Ctr, provenivano da madri C e non hanno ricevuto l'estratto, il gruppo Ctr-T, proveniva da scrofe controllo, ma ha ricevuto l'additivo; il gruppo T-Ctr nato da madri T non ha ricevuto l'integrazione, infine i soggetti appartenenti al gruppo T-T, nati da scrofe trattate, hanno ricevuto l'estratto di oliva. La fase 2 è stata suddivisa in due periodi (prestarter 0-14d e starter 15-42d) e le diete degli animali T sono state integrate con 5,0 e 2,5kg/ton di estratto di oliva, rispettivamente nel primo e nel secondo periodo. Durante la fase 1, sono stati raccolti dati relativi alla condizione corporea e ai parametri riproduttivi delle scrofe, nonché campioni di colostro, per determinare la concentrazione totale di polifenoli e la capacità antiossidante dello stesso. Durante lo svolgimento della fase 2 sono stati invece valutati i principali parametri produttivi dei suinetti (PV, IMPG, FI e ICA). I risultati relativi alla fase 1 non hanno mostrato differenze significative in seguito all'integrazione dell'estratto; tuttavia i parametri produttivi e riproduttivi del gruppo T sono risultati superiori. Per quanto riguarda le analisi del colostro, il potere antiossidante delle scrofe trattate era statisticamente più elevato ($P=0.05$) rispetto al gruppo C, sebbene la concentrazione di polifenoli totali non ha riportato variazioni significative tra i due gruppi ($P>0.05$). La fase 2 ha presentato dei risultati più interessanti; il gruppo T-Ctr ha mostrato un maggiore peso vivo al giorno 42 ($P=0.03$) e un maggior IMPG nel secondo periodo (14-42d) e come media complessiva (0-42d) ($P=0.03$ e $P=0.05$, rispettivamente) rispetto al gruppo Ctr-T. Inoltre, l'indice di conversione alimentare (ICA), la resa alimentare e la resa alla trasformazione del gruppo T-Ctr hanno riportato valori statisticamente significativi ($P\leq 0.01$) rispetto agli altri gruppi sperimentali. In conclusione, l'integrazione dell'estratto oggetto della prova ha mostrato i migliori risultati sulle performance dei suinetti, sottolineando l'importanza del latte materno come veicolo di sostanze funzionali e suggerendo possibili effetti benefici del composto d'interesse sulle condizioni generali di salute degli animali;

tuttavia l'impiego di estratti vegetali in alimentazione animale presenta un quadro molto complesso, caratterizzato dalla presenza e dall'interazione di molti fattori differenti.

La quarta prova sperimentale ha valutato gli effetti della somministrazione di un probiotico costituito da *Lactobacillus farmaciminis* e *L. rhamnosus* sulle performance produttive di 960 pulcini ROSS 308 di sesso maschile per una durata di 48 giorni. Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali, costituiti da 12 recinti e 20 soggetti ciascuno; i 3 gruppi trattati (T1, T2 e T3) erano alimentati con una dieta base (CTR) integrata con 600, 400 e 200g/ton di probiotico, rispettivamente. Durante lo svolgimento della prova sono stati valutati i principali parametri produttivi (PV, IMPG, FI e ICA); mentre in fase di macellazione è stato prelevato il petto per la determinazione della resa della carcassa. I risultati relativi alle performance di crescita non hanno evidenziato differenze significative per i parametri analizzati, inoltre, non è stata osservata alcuna differenza statistica per quanto riguarda i rilievi alla macellazione, resa e peso del petto ($P>0.05$). Per concludere, la somministrazione del probiotico oggetto della prova non ha modificato i parametri considerati, tuttavia non sono da escludere possibili effetti dell'additivo sulla modulazione della flora microbica intestinale e sulle proprietà qualitative delle carni. In tal senso, saranno necessari ulteriori e più approfonditi studi per analizzare le conseguenze sul metabolismo generale di animali a rapida crescita.

Analizzando i risultati ottenuti nelle prove sperimentali, è possibile affermare che l'integrazione di sostanze ad azione benefica nell'alimentazione degli animali da reddito è in grado non solo di modificare in maniera significativa i principali parametri di crescita degli stessi e la qualità dei prodotti destinati al consumatore, ma anche di migliorare le condizioni generali di benessere e influenzare positivamente l'equilibrio intestinale degli stessi.

Abstract

Optimal animal nutrition allows adequate productive performance and correct welfare conditions of livestock species; moreover, it ensures animal's products with high-quality characteristics that meet safety and security requirements for the consumers and guarantees a suitable nutritional value.

In this context, the application of nutritional strategies, including the supplementation of additives, used to improve feed nutrition, may play a significant role in livestock production; it also represents an important issue in the regulatory framework of the European Union.

In this paper, four *in vivo* trials are presented to evaluate the dietary effects on the quali-quantitative performance of broiler chickens and pigs. In particular, the use of synthetic emulsifiers, a polyphenols-enriched olive pulp extract and a probiotic was considered in the whole production cycle of broiler chicken. Whereas, the polyphenol-enriched olive pulp extract was added in the diet of sows and piglets to investigate the positive effects of this supplementation in two critical moments of the productive system of this species: the peripartum of the sows and the weaning of piglets.

In the first experimental trial, a total of 1200 one-day-old ROSS 308 broiler chicks were assigned to four experimental groups consisting of 15 pens with 25 birds per pen. A 2×2 factorial design was applied to compare the different dietary treatments [control diet (CTR) or diet supplemented with AVI-MUL TOP (AMT) at 1g/kg from d 0 to 12, 0.75g/kg from d 12 to 22 and 0.5g/kg from d 22 to 44] and gender. Growth performance (BW, ADG, FI and FCR) were determined on days 0, 12, 22, 37 and 44 for males. One female chick (day 37) and one male chick (day 44) from each pen were chosen on BW basis and slaughtered to collect blood, liver samples and caecum content and to determine the dressing and breast muscle percentages. AMT supplementation increased BW on day 12 ($P=0.02$), ADG from day 0 to 12 ($P<0.05$), ADFI from day 12 to 22 ($P=0.06$). Moreover AMT supplementation reduced FCR from days 0 to 44 ($P<0.05$) in males. Dietary AMT significantly increased the b^* index (yellowness) ($P<0.01$) and reduced cooking loss ($P=0.03$). The emulsifier also increased plasma cholesterol, HDL and LDL content compared to the control ($P<0.01$, $P=0.02$, $P<0.01$, respectively), while no significant differences were observed on intestinal microbial flora among treatments. The expression of Apo A-I and Apo B lipid metabolism related genes was evaluated from the liver samples and a significant up regulation ($P=0.0056$) of the Apo B gene was found in AMT females chicks. In conclusion, the supplementation of AMT may have a beneficial effect on the growth performance, lipid metabolism and meat quality of broiler chicks.

The second experimental trial evaluated the dietary effects of a polyphenol-enriched olive pulp extract on 720 one-day old ROSS 308 female chicks, equally assigned to four experimental groups consisting of 12 pens and 20 animals each. The dietary treatments were control diets (CTR) or diet supplemented with 200 IU/kg of vitamin E (T1), 1 and 5 g/kg of Ethifenol (T2 and T3, respectively). The substance in exam had a total polyphenols concentration of 25mg/g. Growth performance (BW, ADG, FI and FCR) were determined on days 0, 10, 20 and 35. At the end of the trial, one female chick was chosen from each pen on BW basis and slaughtered to collect blood, liver samples and caecum content and to determine the dressing and breast muscle percentages. The supplementation of the olive pulp extract did not show any significant differences ($P>0.05$) on the growth parameters and caecum microbiological analysis among the groups; while the dietary supplementation significantly improved the b^* index (yellowness) of animal skin ($P=0.003$). The extraction and quantification of total

polyphenols and the expression of some lipid metabolism related genes (PPAR α , ATGL, ACACA, CPT-1, ACOX and FASN) were performed from hepatic samples. The hepatic concentration of phenolic compounds did not show any statistical differences ($P>0.05$) among the groups, although it reflects the supplementation level. No statistical differences were also found in the gene expression. In conclusion, the olive pulp extract showed minor benefits on the growth performances, which however appear interesting considering the short production cycle of these animals.

The third experimental trial was divided into two phases to investigate the effects of the polyphenols-enriched olive pulp extract supplementation on the performance of sows and piglets. During phase 1, 18 multiparous sows, homogeneous by age and birth order, were assigned to two experimental groups of 9 animals each. The dietary treatments were control diet (C) or diet supplemented with 1.25kg/ton of olive pulp extract (T). The compound of interest was added to the diet for a period of about 40 days (from two weeks before the expected date of birth to the end of lactation). Body condition and reproductive parameters were analyzed and colostrum samples were collected to determine the total polyphenols concentration and the antioxidant activity. In phase 2, 180 newborn piglets, homogeneous by body weight, were assigned to four experimental groups consisting of 45 animals and 9 replicates each. The Ctr-Ctr piglets were born from control sows and did not receive the extract, the Ctr-T group was composed by control sow's piglets who received the compound; the T-Ctr piglets group was born from treated sows and they did not receive the olive pulp extract and the T-T group was composed by treated sow's piglets who received the extract. Phase 2 was divided into two periods (prestarter from d 0 to 14 and starter from d 15 to 42) and dietary treatments were control diet (Ctr) and diet supplemented with 5.0 and 2.5kg/ton of olive pulp extract (T) in the first and second period, respectively. Growth performance (BW, ADG, FI and FCR) were determined on days 0, 14 and 42. The supplementation did not show any significant differences ($P>0.05$) in phase 1; however, it was observed that the body condition and reproductive parameters of the treated animals were higher than the control group. The antioxidant activity of T sows was statistically higher ($P=0.05$), although the total polyphenol concentrations did not show significant variations ($P>0.05$) between the two groups. In phase 2, the T-Ctr group showed higher body weight at day 42 ($P=0.03$) and higher ADG during the second period (14-42d) and overall (0-42d) ($P=0.03$ and $P=0.05$, respectively) compared to the other groups. Moreover, FCR, carcass yield and transformation yield of the T-Ctr group were statistically significant ($P\leq 0.01$) compared to the other experimental groups. In conclusion, the supplementation of the compound of interest showed the best results on the piglets' performance, underlining the importance of milk as a vehicle of functional substances and suggesting possible beneficial effects on the general health conditions.

In the fourth experimental trial, a total of 960 one-day-old ROSS 308 male broiler chicks were assigned to four experimental groups consisting of 12 pens with 20 animals per pen. The dietary treatments were control diet (CTR) and diet supplemented with 600, 400 and 200g/t of METALACT (T1, T2 and T3, respectively). The probiotic additive was composed by a mixture of *Lactobacillus pharacimidis* and *L. rhamnosus* and supplemented for a period of 48 days. Growth performance (BW, ADG, FI and FCR) were determined on days 0, 11, 22 and 48. At the end of the trial, one chick from each pen was chosen on BW basis and slaughtered to determine the dressing and breast muscle percentages. The METALACT supplementation did not show any significant differences ($P>0.05$) on the growth parameters investigated. In conclusion, the probiotic did not modify the growth

performance, but it is not possible to exclude possible beneficial effects on modulation of the microbial intestinal flora and on the qualitative properties of the meat.

The overall results showed that the dietary supplementation of beneficial substances is not only able to significantly modify the animal's growth performance and the quality of the products, but it is also able to improve the general welfare conditions and the intestinal balance of the livestock species.

Sommario

Riassunto	3
Abstract	6
1. Introduzione.....	14
1.1. Patrimonio animale.....	15
1.1.1. Il panorama europeo	15
1.1.2. La situazione italiana	16
1.2. Lo scenario economico	20
1.2.1. L'economia dell'Area Euro	20
1.2.2. La situazione italiana	20
1.3. Produzioni animali e risvolti etico-ambientali.....	23
1.3.1. Impatto ambientale	23
1.3.2. Benessere animale	24
2. Allevamento del pollo da carne	26
2.1. Introduzione.....	26
2.1.1. Il mercato del broiler	26
2.1.2. Lo scenario italiano	27
2.1.3. Sistema produttivo circolare.....	27
2.2. Allevamento intensivo: tecniche e problematiche correlate	28
2.2.1. L'utilizzo dell'ibrido: vantaggi e svantaggi	28
2.2.2. Strutture di allevamento.....	29
2.2.3. Normativa sul Benessere	30
2.2.4. Alimentazione.....	30
2.2.5. Impatto ambientale	32
3. Allevamento del suino	33
3.1. Introduzione.....	33
3.1.1. Lo scenario italiano	34
3.2. Allevamento intensivo: tecniche e problematiche correlate	37
3.2.1. Settori di allevamento	37
3.2.2. Strutture di allevamento.....	38
3.2.3. Normativa sul Benessere	39
3.2.4. Alimentazione.....	39
3.2.5. Impatto ambientale	40
4. Prodotti di Origine Animale	42
4.1. Qualità e caratteristiche nutrizionali della carne	42
4.1.1. Acqua.....	42

4.1.2.	Proteine.....	42
4.1.3.	Lipidi	46
4.1.4.	Micronutrienti.....	48
4.1.5.	Vitamine	48
4.1.6.	Peptidi bioattivi.....	49
4.2.	Controlli ufficiali/sicurezza	53
4.3.	Ruolo della nutrizione sulla qualità dei prodotti di origine animale.....	54
5.	Nutrizione umana	56
5.1.	Consumi POA.....	56
5.2.	Dieta mediterranea.....	57
5.2.1.	Effetti benefici	59
5.3.	Studio EPIC e classificazione IARC	61
5.4.	Modalità di cottura	64
5.5.	Il concetto di dose.....	64
5.6.	Raccomandazioni	70
6.	Nutrizione animale	71
6.1.	Volumi prodotti	72
6.2.	Materie prime	73
6.3.	Trattamenti	76
6.4.	Controlli e analisi ufficiali.....	76
7.	Additivi.....	78
7.1.	Definizione	79
7.2.	Classificazione.....	79
8.	Gli emulsionanti	82
8.1.	La lecitina	82
8.1.1.	Produzione della lecitina	82
8.1.2.	Benefici sull'organismo	83
8.2.	La lisofosfatidilcolina.....	83
8.3.	Il glicerolo polietilenglicole ricinoleato.....	83
9.	I polifenoli	85
9.1.	Flavonoidi.....	87
9.2.	Lignani.....	88
9.3.	Acidi fenolici	88
9.4.	Stilbeni.....	89
9.5.	I polifenoli nel frutto di <i>Olea Europaea L.</i>	89
9.6.	Effetti benefici dei polifenoli sull'organismo.....	92

9.6.1.	Effetti neuroprotettivi	93
9.6.2.	Attività antiossidante	93
9.6.3.	Protezione sul sistema cardiovascolare	95
9.6.4.	Attività anti-cancerogena.....	95
9.6.5.	Attività anti-infiammatoria	96
9.6.6.	Attività anti-microbica e anti-virale.....	96
9.6.7.	Attività sulle ossa.....	97
9.7.	Prodotti di scarto dell'estrazione dell'olio d'oliva	97
9.7.1.	Valorizzazione dei rifiuti del frantoio e possibile utilizzo in alimentazione animale.....	99
10.	I probiotici	101
10.1.	Benefici.....	101
10.2.	Tecnologia e utilizzazione	103
10.3.	Utilizzo in zootecnia.....	104
11.	Scopo dell'elaborato.....	106
Parte sperimentale		108
12.	I prova sperimentale: Valutazione dell'integrazione di un emulsionante sintetico nell'allevamento del pollo da carne	108
12.1.	Introduzione.....	108
12.2.	Materiali e metodi.....	111
12.2.1.	Animali e stabulazione	111
12.2.2.	Controlli e prelievi.....	114
12.3.	Analisi statistica.....	120
12.4.	Risultati.....	121
12.4.1.	Performance di crescita e resa alla macellazione.....	121
12.4.2.	Qualità della carne e analisi microbiologiche del cieco	123
12.4.3.	Profilo metabolico plasmatico	124
12.4.5.	Contenuto lipidi totali, rapporto lipidi totali/DNA nel fegato ed espressione dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico	126
12.5.	Discussione.....	129
12.6.	Conclusioni.....	131
13.	II prova sperimentale: Effetto dell'integrazione di un estratto di <i>Olea Europaea</i> nell'allevamento del pollo da carne	132
13.1.	Introduzione.....	132
13.2.	Materiali e metodi.....	132
13.2.1.	Animali e stabulazione	132
13.2.2.	Controlli e prelievi.....	134
13.3.	Analisi statistica.....	140

13.4.	Risultati.....	141
13.4.1.	Performance di crescita e resa alla macellazione.....	141
13.4.2.	Analisi microbiologica del cieco	143
13.4.3.	Qualità della carne	144
13.4.4.	Quantificazione dei polifenoli e livello epatico.....	145
13.4.5.	Estrazione dell'RNA e valutazione dell'espressione dei principali geni coinvolti nel metabolismo lipidico	147
13.5.	Discussione.....	149
13.6.	Conclusioni.....	154
14.	III prova sperimentale: Effetto dell'integrazione di un estratto di <i>Olea Europaea</i> nell'allevamento del suino	155
14.1.	Introduzione.....	155
14.2.	Materiali e metodi.....	155
14.2.1.	Animali e stabulazione	156
14.2.2.	Controlli e prelievi.....	162
14.3.	Analisi statistica.....	166
14.4.	Risultati.....	167
14.4.1.	Performance produttive	167
14.4.2.	Quantificazione del contenuto di polifenoli totali e valutazione della capacità antiossidante del colostro	168
14.4.3.	Peso vivo	170
14.4.4.	Consumo di alimento.....	171
14.4.5.	Incremento Ponderale Medio Giornaliero	171
14.4.6.	Indice di Conversione Alimentare	172
14.4.7.	Resa Alimentare	173
14.4.8.	Resa alla trasformazione.....	173
14.5.	Discussione.....	175
14.6.	Conclusioni.....	179
15.	IV prova sperimentale: Effetto dell'integrazione di un additivo probiotico nell'allevamento del pollo da carne.....	180
15.1.	Introduzione.....	180
15.2.	Materiali e metodi.....	180
15.2.1.	Animali e stabulazione	180
15.2.2.	Controlli e prelievi.....	183
15.3.	Analisi statistica.....	184
15.4.	Risultati.....	185
15.4.1.	Performance di crescita e resa alla macellazione.....	185

15.5.	Discussione	188
15.6.	Conclusioni	189
16.	Conclusioni generali	190
17.	Riferimenti bibliografici	193

1. Introduzione

La FAO, l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura, ha stimato che la popolazione mondiale subirà un importante incremento entro il 2050, passando dagli attuali sette milioni a più di nove milioni di abitanti. I paesi sviluppati presenteranno una crescita moderata, mentre il maggiore tasso di aumento sarà previsto nei paesi emergenti (Tabella 1).

Tabella 1. Stima dell'incremento demografico globale calcolata a partire da dati del 2008 (valori espressi in miliardi di abitanti) (modificato da Report FAO, 2011).

	Anno				Crescita 2010/2050
	2010	2020	2030	2050	
Popolazione mondiale	6.91	7.67	8.31	9.15	132%

Parallelamente alla crescita demografica è previsto un aumento delle richieste alimentari in generale e di prodotti di origine animale nel loro complesso, tra il 50 ed il 70% rispetto all'attuale produzione; tale aumento non risulta però omogeneo in tutte le regioni del mondo.

Nei paesi sviluppati dopo il forte incremento dei consumi alimentari nel dopoguerra, si è osservato un rallentamento del consumo di alimenti di origine animale, con particolare riferimento al consumo di carne rossa ed attualmente il mercato ha raggiunto uno stato di maturità e saturazione (EU Agricultural Markets Briefs, 2015). Il quadro dei paesi sviluppati contrasta però con quello dei paesi in via di sviluppo, dove i consumi di alimenti sono cambiati rispetto al passato; la crescita della popolazione, del reddito e dell'urbanizzazione hanno indotto un progressivo aumento del consumo pro-capite dei prodotti di origine animale, per il quale si stima uno stabile incremento nei prossimi anni (Baldi *et al.*, 2016).

In dettaglio, si prevedono trend differenti per i diversi alimenti, con un aumento generale dei consumi nei paesi in rapida crescita pari o superiore al 10% su base annua nel prossimo decennio per i prodotti carnei (FAO, 2011 e 2012) ed ancora più marcato per il latte e derivati (Figura 1).

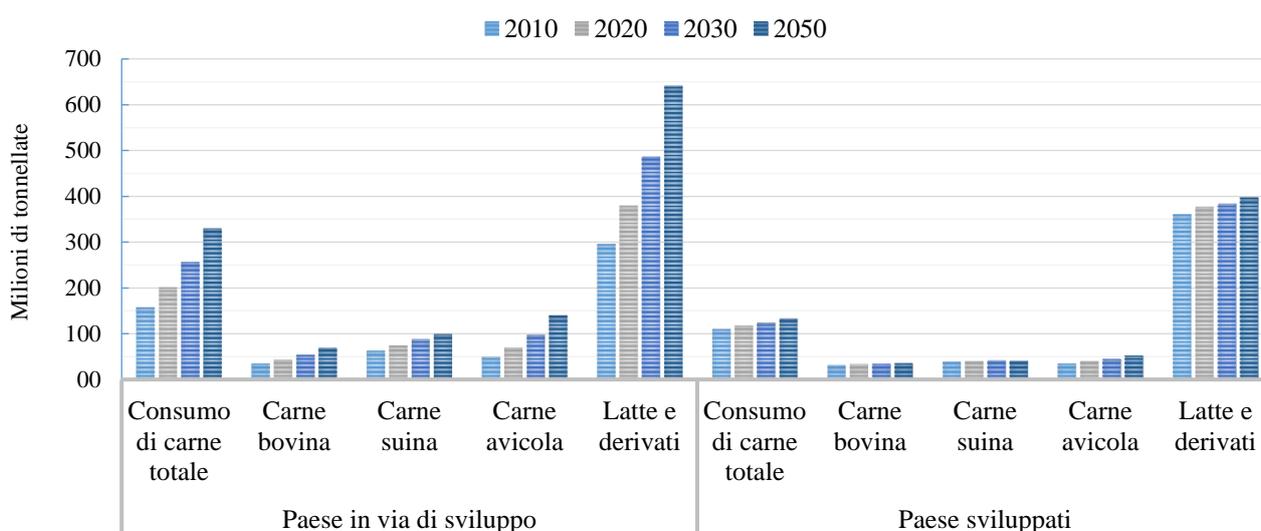


Figura 1. Previsione del consumo di prodotti di origine animale (modificato da Report FAO, 2011).

Come mostra la Figura 1, i settori zootecnici relativi alla produzione di carne che subiranno le maggiori espansioni nei prossimi quarant'anni saranno quello avicolo e quello suinicolo. Entrambe queste specie sono caratterizzate da un'elevata efficienza produttiva, rispetto al ruminante, che si traduce in cicli di allevamento più brevi e minor consumo di alimento, minori richieste di spazi, non necessitano infatti di prati o pascoli per la produzione di foraggi e possono essere allevati in strutture chiuse, e presentano infine un minor impatto ambientale rispetto all'allevamento dei ruminanti.

Va sottolineato che molti Paesi del mondo sono ancora malnutriti (925 milioni di persone) e la loro dieta non arriva a soddisfare i fabbisogni alimentari (FAO, 2011). Le raccomandazioni nutrizionali relative agli apporti proteici suggeriscono che almeno un terzo del fabbisogno proteico giornaliero, che corrisponde a 0,66 – 1g per kg di peso in funzione di età, sesso ed attività fisica, provenga da proteine di origine animale. Di conseguenza, circa 20g dei 60g di proteine totali, dovrebbe provenire dal carne, pesce, latte o uova; tuttavia questo dato è inferiore all'attuale livello globale di assunzione che si attesta intorno a un valore medio di corrispondente a 24g capo/die, dove il valore minimo è rappresentato dal Burundi con 1,7g capo/die, mentre il valore massimo corrisponde a 69,0g capo/die negli Stati Uniti.

1.1. Patrimonio animale

1.1.1. Il panorama europeo

La zootecnia europea presenta una situazione molto diversificata; esistono infatti Stati maggiormente vocati all'allevamento di determinate specie, come ad esempio i suini in Danimarca o i bovini in Francia e, al contrario, regioni in cui talune specie sono del tutto assenti, date le condizioni pedoclimatiche o motivi di origine culturale.

La Tabella 2 riporta nel dettaglio il patrimonio zootecnico europeo suddiviso nelle principali specie allevate.

Tabella 2. Patrimonio zootecnico delle principali regioni europee, valori espressi in 1000 capi, riferiti all'anno 2015 (Eurostat).

Stati Membri	Bovini	di cui			Bufali	Suini	Ovini	Caprini
		Vacche	Vacche da latte	Altre vacche				
<i>Austria</i>	1.957,6	758,5	539,0	219,5	0,0	2.845,5	353,7	76,6
<i>Belgio</i>	2.503,3	973,8	528,8	445,0	0,0	6.364,2	0,0	0,0
<i>Bulgaria</i>	561,0	359,4	283,0	76,4	10,8	600,1	1.331,9	276,9
<i>Cipro</i>	58,9	26,2	26,2	0,1	0,0	327,8	331,6	236,9
<i>Rep. Ceca</i>	1.366,3	566,3	369,1	197,3	0,0	1.555,4	0,0	0,0
<i>Germania</i>	12.635,5	4.966,0	4.284,6	681,3	7,1	27.535,4	1.571,9	110,0
<i>Danimarca</i>	1.566,0	664,0	570,0	94,0	0,0	12.702,0	0,0	0,0
<i>Estonia</i>	256,2	115,7	90,6	25,1	0,0	304,5	0,0	0,0

<i>Spagna</i>	6.182,9	2.762,8	844,1	1.918,7	0,6	28.367,3	16.523,0	3.009,6
<i>Finlandia</i>	903,4	339,4	282,2	57,1	0,0	1.239,0	0,0	0,0
<i>Francia</i>	19.386,0	7.867,0	3.660,0	4.208,0	0,0	13.307,0	7.057,0	1.230,0
<i>Grecia</i>	582,2	274,2	111,0	163,1	0,0	876,9	8.852,4	4.017,2
<i>Croazia</i>	454,3	170,5	151,5	19,0	0,0	1.166,8	607,7	62,0
<i>Ungheria</i>	821,0	368,0	251,0	117,0	4,8	3.124,0	1.190,0	72,0
<i>Irlanda</i>	6.422,2	2.293,1	1.239,9	1.053,2	0,0	1.474,5	3.324,8	0,0
<i>Italia</i>	6.155,8	2.386,1	2.056,8	329,3	374,5	8.683,2	7.148,5	961,7
<i>Lituania</i>	722,6	343,1	300,5	42,6	0,0	687,8	147,1	13,5
<i>Lussemburgo</i>	200,6	77,3	49,1	28,2	0,0	88,5	0,0	0,0
<i>Lettonia</i>	419,1	201,3	162,4	38,9	0,0	334,2	102,3	12,7
<i>Malta</i>	15,0	6,5	6,4	0,1	0,0	43,6	11,1	4,9
<i>Paesi Bassi</i>	4.315,0	1.802,0	1.717,0	85,0	0,0	12.453,0	1.032,0	468,0
<i>Polonia</i>	5.762,5	2.302,8	2.134,1	168,7	0,0	10.590,2	0,0	0,0
<i>Portogallo</i>	1.605,9	719,1	243,3	475,8	0,0	2.247,3	2.042,6	372,8
<i>Romania</i>	2.092,4	1.207,4	1.190,7	16,7	18,4	4.926,9	9.809,5	1.440,2
<i>Svezia</i>	1.428,4	512,6	336,8	175,8	0,0	1.356,0	594,7	0,0
<i>Slovenia</i>	484,1	169,9	112,8	57,0	0,0	271,4	0,0	0,0
<i>Slovacchia</i>	457,6	199,5	139,2	60,3	0,0	633,1	381,7	36,3
<i>Regno Unito</i>	9.816,0	3.469,0	1.918,0	1.551,0	0,0	4.422,0	23.103,0	101,0

1.1.2. La situazione italiana

La realtà produttiva delle aziende agricole italiane è estremamente eterogenea, caratterizzata da molteplici tipologie produttive, molto legate alle caratteristiche del territorio. Questa forte frammentazione rende più difficile la sostenibilità economica delle aziende, con il rischio di abbandono del territorio da parte degli agricoltori e delle loro famiglie. La Tabella 3, la Tabella 4, la Tabella 5 e la Tabella 6 riportano in dettaglio il patrimonio zootecnico italiano, suddiviso per bovini, suini, ovicaprini ed equini.

Tabella 3. Consistenza del bestiame bovino di età compresa tra 0 e 2 anni (numero di capi) suddivisi per ripartizione geografica. Dato aggiornato al 1° dicembre 2016 (Agri Istat).

Ripartizioni geografiche	Bovini di meno di 1 anno				Bovini da 1 anno a meno di 2 anni			
	Macellati come vitelli	Altri		Totale	Maschi	Femmine		Totale
		Maschi	Femmine			Da macello	Da allevamento	
<i>Nord</i>	394.191	283.633	565.312	1.243.136	411.102	180.764	503.836	1.095.702
<i>Centro</i>	16.644	36.954	50.822	104.420	23.622	10.984	42.092	76.698
<i>Mezzogiorno</i>	81.626	103.427	160.257	345.310	70.566	20.457	134.499	225.522
<i>Totale</i>	492.461	424.014	776.391	1.692.866	505.290	212.205	680.427	1.397.922

Tabella 4. Consistenza del bestiame bovino (> 2 anni) e bufalino (numero di capi) suddivisi per ripartizione geografica. Dato aggiornato al 1° dicembre 2016 (Agri Istat).

Ripartizioni geografiche	Bovini di 2 anni e più					Totale bovini	Bufali		Totale bufali	Totale bovini e bufalini	
	Maschi	Femmine			Totale		Bufale	Altri bufali			
		Manze da macello	Manze da allevamento	Vacche a latte							Altre vacche
<i>Nord</i>	48.850	29.592	345.682	1.246.291	145.369	1.815.784	4.154.622	5.171	8.276	13.447	4.168.069
<i>Centro</i>	10.432	10.073	45.742	109.481	46.789	222.517	403.635	38.104	33.817	71.921	475.556
<i>Mezzogiorno</i>	24.261	27.399	174.853	465.992	108.173	800.678	1.371.510	195.427	104.326	299.753	1.671.263
<i>Totale</i>	83.543	67.064	566.277	1.821.764	300.331	2.838.979	5.929.767	238.702	146.419	385.121	6.314.888

Tabella 5. Consistenza del bestiame suino (numero di capi) suddivisi per ripartizione geografica. Dato aggiornato al 1° dicembre 2016 (Agri Istat).

Ripartizioni geografiche	Suini fino a 49 Kg		Suini oltre i 50 Kg						Totale
	Lattonzoli < 20 Kg	Suini 20 - 50 Kg	Suini da ingrasso			Suini da riproduzione			
			50 - 80 Kg	80 - 110 Kg	>110 Kg	Verri	Scrofe montate	Altre scrofe	
<i>Nord</i>	1.196.971	1.414.808	1.073.774	1.251.215	1.948.514	8.610	377.364	79.406	7.350.662
<i>Centro</i>	104.862	99.169	70.387	98.444	154.517	2.977	29.056	4.485	563.897
<i>Mezzogiorno</i>	73.201	88.358	67.026	101.906	148.038	17.088	57.564	10.190	563.371
Totale	1.375.034	1.602.335	1.211.187	1.451.565	2.251.069	28.675	463.984	94.081	8.477.930

Tabella 6. Consistenza del bestiame ovino, caprino ed equino (numero di capi) suddivisi per ripartizione geografica. Dato aggiornato al 1° dicembre 2016 (Agri Istat).

Ripartizioni geografiche	Ovini		Caprini		Equini		
	Totale	Di cui pecore	Totale	Di cui capre	Cavalli	Asini, muli e bardotti	Totale
<i>Nord</i>	471.813	338.164	263.217	210.956	157.888	36.146	194.034
<i>Centro</i>	1.462.836	1.276.064	68.388	56.516	102.354	15.597	117.951
<i>Mezzogiorno</i>	5.350.225	4.700.944	694.658	527.107	128.082	22.472	150.554
Totale	7.284.874	6.315.172	1.026.263	794.579	388.324	74.215	462.539

In dettaglio, in Tabella 7 il patrimonio suinicolo nazionale, riferito a dicembre 2016 è costituito da 8,478 milioni di capi, in calo (-2,3%) rispetto a dicembre 2015 (8,683 milioni di capi). Sono infatti diminuiti i lattonzoli di peso inferiore a 20 kg scesi a 1,375 milioni di capi (-2,3%) da 1,408 milioni di capi, i suini di peso compreso tra 20 e 50kg (-1,9%) e anche i suini da ingrasso di peso superiore a 50kg (4,914 milioni di capi,-2,2%).

Per quanto riguarda il dato dei riproduttori, si è registrato un calo delle scrofe (- 4,2%), particolarmente accentuata la flessione delle “scrofe montate” scese a 463.984 unità dalle 481.400 del 2015 (-3,6%).

Tabella 7. Patrimonio suinicolo italiano per categorie di suini (dati espressi in migliaia di capi) (Eurostat).

Categorie di suini	Variaz. % 2016/2015	Dicembre 2016	Dicembre 2015	Dicembre 2014	Dicembre 2013
<i>Lattonzoli <20 kg</i>	-2.3	1.375	1.408	1.407	1.450
<i>Suini 20 – 50 kg</i>	-1.9	1.602	1.633	1.629	1.546
<i>Suini da ingrasso > 50 kg</i>	-2.2	4.914	5.023	5.028	4.942
<i>Scrofe</i>	-4.2	558	591	586	590
<i>di cui montate</i>	-3.6	464	481	488	463
<i>Verri</i>	1.1	29	28	26	33
<i>Totale</i>	-2.3	8.478	8.683	8.676	8.561

In crescita invece il settore avicolo italiano (+ 1,54% nel biennio 2014/2015; Tabella 8), caratterizzato da un sistema di allevamento circolare, unico nel suo genere, che si ispira all'approccio europeo del “*From farm to fork*”. Ogni singolo gruppo alimentare, infatti, riunisce in sé tutte le differenti fasi della produzione (mangimifici, allevamenti, trasformazione e vendita del prodotto finale), aumentando la sicurezza e l'efficienza delle produzioni. Tra le specie allevate, il pollo da carne, che rappresenta più dell'85% del totale degli avicoli allevati, ha mostrato un incremento pari al 1,78%, passando da 523.000 di capi del 2014 a 532.500 nel 2015 (UNITALIA, 2017).

Tabella 8. Patrimonio avicolo italiano (elaborazioni da Assalzo su dai UNITALIA).

Avicoli	Anno				Variazione % 2015/2014
	2012	2013	2014	2015	
<i>Polli da carne</i>	525.300	527.000	523.000	532.500	+ 1,78%
<i>TOTALE</i>	613.400	612.100	614.700	624.300	+ 1,54%

1.2. Lo scenario economico

1.2.1. L'economia dell'Area Euro

Nel 2016 l'Area Euro ha registrato una crescita del prodotto interno lordo del 1,8%, in linea con il PIL della UE (1,9%); la situazione italiana è purtroppo molto differente, nel 2016 il PIL ha registrato un aumento del + 0,9%, dato ancora lontano da quello medio dell'Area Euro.

1.2.2. La situazione italiana

In generale, l'export del "food and beverage" nazionale ha prodotto un introito di 30 miliardi e 11 milioni, che corrisponde a + 3,6% rispetto al 2015 (Figura 2).

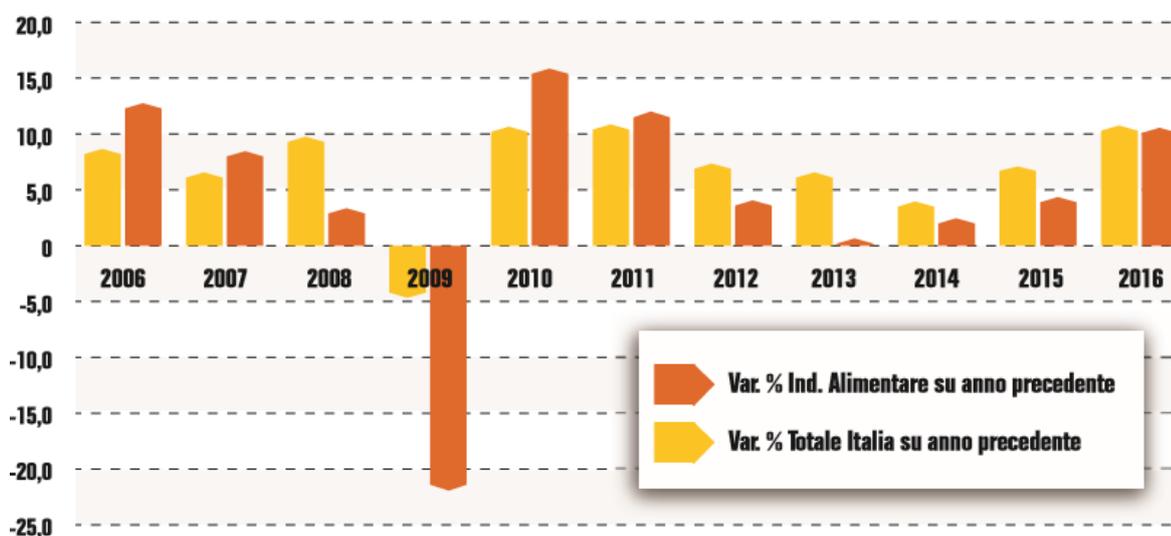


Figura 2. Export dell'industria alimentare ed export totale italiano (dati espressi in percentuale) (elaborazione Federalimentare su dati ISTAT).

Il settore economico delle carni genera mediamente in Italia un valore economico di circa 30 miliardi di euro all'anno, corrispondente al 17% dell'intero settore alimentare (180 miliardi di euro) ed al 2% del PIL nazionale (1.500 miliardi di euro) (Figura 2).

Le tre filiere principali (avicolo, bovino e suino) generano un valore all'incirca equivalente. Le differenze si trovano tuttavia nell'analisi della bilancia commerciale: la filiera bovina importa il 42% circa del fabbisogno complessivo, la filiera avicola è pressoché autosufficiente, mentre la filiera suinicola è caratterizzata soprattutto da esportazioni di salumi, ma da forte importazione di carne suina fresca (Carnisostenibili.it, 2017).

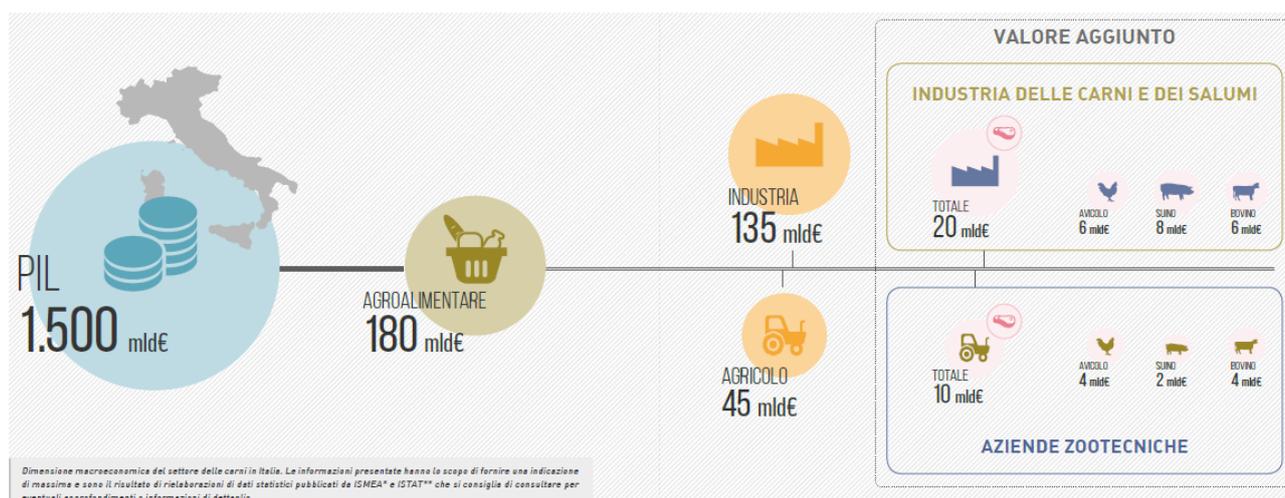


Figura 3. Analisi del valore economico del settore agroalimentare italiano (Agri-Istat).

1.2.2.1. Carne suina

Il 2016 è stato un anno complesso per il comparto delle carni suine, dovuto al trascinarsi negativo in seguito alla crisi europea del mercato della carne suina del biennio 2014/2015 e soprattutto all'annuncio dello IARC (International Agency on the Research of Cancer) relativo alla cancerogenicità di carni e prodotti trasformati (vedi capitolo 5.3.).

La produzione italiana di carne suina nel 2016 ha evidenziato un incremento del 2,9% (1,224 milioni di ton da 1,190 milioni di ton dell'anno precedente). La maggiore produzione ha rispecchiato da un lato il leggero incremento di domanda per prodotti a maggiore valore aggiunto (in particolare prosciutti a DOP) e dall'altro la maggiore richiesta estera di carni suine. Per effetto di queste dinamiche, il prezzo della carne suina ha registrato un incremento, in particolar modo, il prezzo dei suini di peso compreso tra 152 e 160 kg si è attestato su 1,391€/kg (+ 10,1%), mentre quello dei suini di peso superiore ai 160kg 1,451€/kg (+ 9,6%).

La produzione di salumi nel 2016 si è mantenuta stabile rispetto ai dodici mesi precedenti (1,174 milioni di tonnellate rispetto a 1,176, - 0,2%) con un valore di 7.875 milioni di euro.

Nel 2016 le importazioni di carni fresche e congelate hanno evidenziato una flessione, - 4,7%, 961.500 tonnellate nel 2016 da oltre 1 milione di tonnellate del precedente anno, per un valore di 1,76 miliardi di euro (- 1,9%). Di queste, 564mila ton hanno interessato cosce da lavorare (- 3,9%), 142mila ton (- 6,7%) carcasse o mezzene, 180mila ton (- 2,1%) le carni suine disossate, 39.400 ton (-6,5%) le pancette fresche, 16.500 ton le spalle (- 4,5%), 14.600 ton le lombate (- 16,8%) e oltre 5mila ton le parti anteriori (- 42,4%). In aumento sono risultati, infine, gli arrivi di salumi di origine suina (al netto della bresaola) che hanno superato il traguardo delle 53.650 tonnellate (+ 6,4%).

Secondo le elaborazioni ASSICA relative a dati ISTAT, riportate in Tabella 9, l'export di carne e prodotti nel corso del 2016 è aumentato del 16,9%, raggiungendo le 256mila ton (219 mila nel 2015) per un valore di 1.541 milioni di euro (+ 7,3%). A trainare le esportazioni sono state soprattutto le spedizioni di salumi salite a circa 169.600 ton (+ 6,1%) per un valore di 1.355 milioni di euro (+ 4,7%); un contributo positivo è arrivato anche da animali vivi e carni fresche e congelate 86mila ton (+ 46%) per un fatturato di 186,3 milioni di euro (+ 31,7%).

Tabella 9. Impatto economico di alcuni prodotti carne suddivisi in export e import (espressi come tonnellate totali, percentuale rispetto all'anno 2015 e tradotto in valore monetario) (modificato da Assica).

Prodotto	Export	% rispetto al 2015	Valore (mln €)	Import	% rispetto al 2015	Valore (mln €)
Prosciutto crudo	68.627	+ 1,9 %	717,5	15.570	+ 7,5 %	64,7
Salami	29.701	+ 9,5 %	285	4.240	+ 26,9 %	17,3
Mortadelle e wurstel	36.075	+ 3,8 %	126,3	13.320	- 1,7 %	30,6
Bresaola	3.650	+ 14,9 %	60,5	568	+ 97,4m%	3,1

Il consumo apparente interno di carne suina (carne fresca e salumi a base di carne suina), nel corso dell'anno è sceso rispetto all'anno precedente, attestandosi a 1,760 milioni di ton (- 2,1%). Il consumo pro-capite si è attestato sui 29,2kg.

Nel 2016 hanno registrato ancora un trend negativo i consumi apparenti dei prosciutti crudi stagionati, scesi a 232.100 ton (-1,8%). In flessione sono risultati anche i consumi interni di prosciutto cotto, che si sono portati sulle 277.000 ton (-0,8%). Segno meno anche per i consumi di mortadella e wurstel (- 5,1% per 199.900 ton) e per quelli di salame scesi a 82.100 ton (-2,5%) dalle 84.300 ton dell'anno precedente. In aumento sono apparsi, infine, i consumi di bresaola saliti a 13.400 ton (+1,8%) e quelli degli "altri salumi" attestatisi a 250.100 ton (+3,6%).

1.2.2.2. Carne avicola

Nel 2016 la produzione di carni avicole in Italia è stata pari a 1.389.000 tonnellate, con un aumento del 5,1% rispetto al 2015, sia per la carne di pollo (981.000 ton, + 5,6%) che di tacchino (331.000 ton, + 5,8%); per le altre specie avicole continua invece il trend in leggero calo mostrato anche negli anni precedenti. Gli incoraggianti dati relativi della produzione si riflettono sui consumi; il bilancio del 2016 è infatti caratterizzato da un aumento del 2,6% dei consumi interni. Entrando nel dettaglio la carne di pollo e di tacchino hanno registrato un incremento pari al 3,0 e 3,2% rispettivamente (Grafico 1).

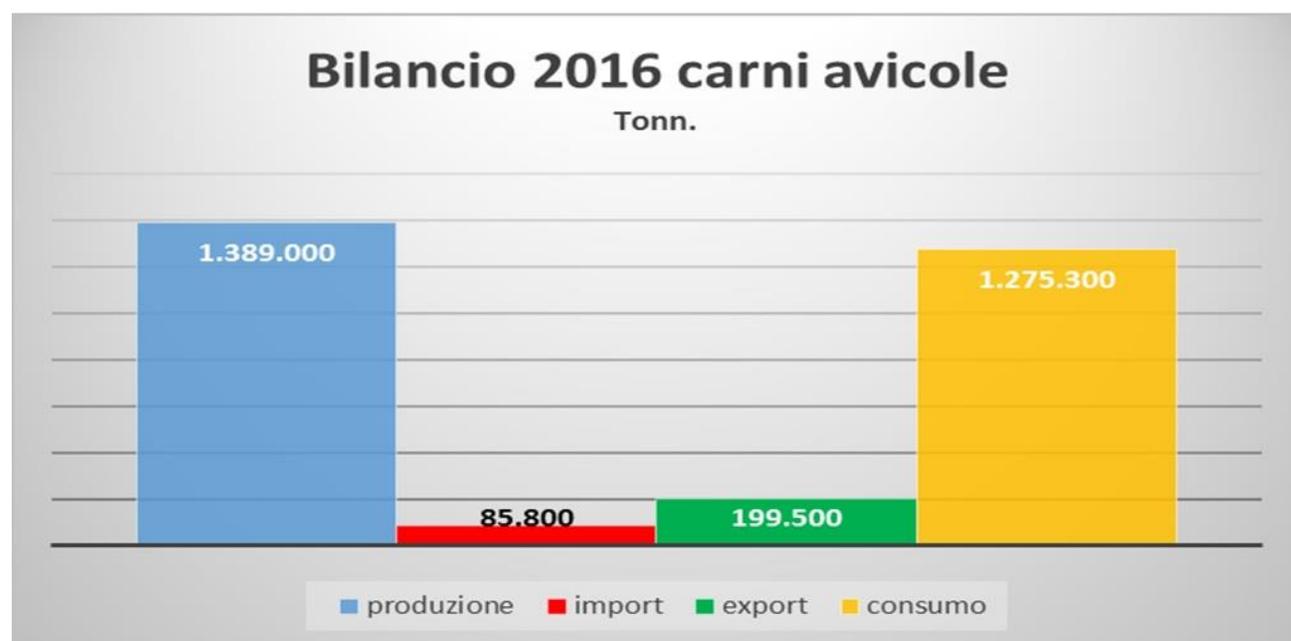


Grafico 1. Bilancio delle carni avicole relativo all'anno 2016 (dati espressi in tonnellate totali) (UNITALIA).

Gli italiani consumano mediamente 15,33kg di carne di pollo e 4,44kg di carne di tacchino (elaborazione UNITALIA su dati Istat). Nel complesso il consumo pro-capite di carne di pollame 2016 è risultato pari a 21,01kg (+ 2,7%) considerando anche il consumo di carne di gallina e altre specie avicole.

Il settore avicolo, rispetto agli altri comparti zootecnici, mostra un completo livello di approvvigionamento; infatti in Italia viene prodotto il 105,5% delle carni di pollo e il 122,9% delle carni di tacchino (Tabella 10).

Tabella 10. Bilancio italiano delle carni di pollame (valori espressi in migliaia di tonnellate) (elaborazione UNITALIA su dati Istat).

Item	2015				2016			
	Pollo	Tacchino	tot carni avicole	Diff % '15/'14	Pollo	Tacchino	tot carni avicole	Diff % '16/'15
<i>Produzione</i>	929,0	313,0	1.321,0	+ 4,7	981,0	331,0	1.389,0	+ 5,1
<i>Import</i>	75,0	18,6	97,2	+ 2,9	66,3	16,3	85,8	- 11,7
<i>Export</i>	100,8	70,5	175,5	+ 3,2	117,3	77,9	199,5	+ 13,7
<i>Autoconsumo</i>	903,2	261,1	1.242,7	+3,6	930,0	269,4	1.275,3	+ 2,6
<i>Consumo (kg)</i>	14,86	4,29	20,44	+ 5,0	15,33	4,44	21,01	+ 2,7
<i>% approvv.</i>	102,9	119,9	106,4	/	105,5	122,9	108,9	/

Per quanto riguarda il fatturato del settore avicolo 2016, si stima intorno a 5.450 milioni di euro, in leggera diminuzione rispetto ai 5.600 milioni del 2015, dovuto alla diminuzione dei prezzi, alla produzione indotta dall'andamento produttivo e dal prezzo delle materie prime cerealicole.

1.3. Produzioni animali e risvolti etico-ambientali

Negli ultimi anni, l'attenzione del consumatore si sta focalizzando oltre alle caratteristiche qualitative dei prodotti di origine animale e del loro ruolo all'interno della Dieta Mediterranea, che verranno trattate nei capitoli successivi, anche su tematiche di carattere ambientale e di tutela del benessere animale.

1.3.1. Impatto ambientale

L'allevamento animale è un'attività che ha importanti ricadute sugli equilibri ambientali sia a livello globale che a livello locale incidendo su molti aspetti, che comprendono la qualità dell'aria e il clima, la qualità delle acque, il suolo, la biodiversità e la qualità del paesaggio. Il processo di intensificazione dei sistemi zootecnici in atto può consentire da un lato di conseguire una maggiore efficienza di utilizzazione delle risorse e minori emissioni di inquinanti per unità di prodotto finale, ma dall'altro rischia di aggravare l'impatto della zootecnia sull'ambiente soprattutto a livello locale con effetti negativi in particolare sulla qualità delle acque (Crovetto and Sandrucci, 2010).

Considerando lo scenario globale, il futuro incremento demografico, unito alla conseguente richiesta di alimenti, avrà diverse implicazioni di carattere ambientale relative all'utilizzo del suolo, delle risorse naturali non rinnovabili come acqua, combustibili fossili, minerali e terreni agricoli, ed alle emissioni di gas serra (GHG).

Come riportato nel report FAO del 2012, il trend delle emissioni globali di gas serra relative al comparto agricolo negli ultimi cinquant'anni è in costante aumento (2,7 miliardi di ton CO₂ eq nel 1961 vs 5,3 miliardi di ton CO₂ eq nel 2010) e il settore zootecnico è responsabile del 15% delle emissioni globali di CH₄, CO₂ e N₂O, anche se i diversi indirizzi produttivi sono responsabili di differenti livelli di emissioni.

Nello specifico, tra i principali comparti zootecnici, l'allevamento dei polli da carne presenta le minori emissioni in atmosfera (612 milioni di ton CO₂ eq); al contrario, il settore maggiormente impattante risulta essere quello bovino (2,5 miliardi di ton CO₂ eq). La presenza del ruminante e della microflora simbiotica in esso presente comporta un calo dell'efficienza alimentare ed un aumento delle emissioni di metano come prodotto delle fermentazioni ruminali.

Sebbene l'elevato numero di allevamenti intensivi che caratterizzano le realtà dei paesi sviluppati, le maggiori emissioni di GHG derivano dalle regioni in via di sviluppo, dove si riscontra una bassa efficienza produttiva. Quest'ultima porta infatti ad una maggiore difficoltà di contenimento delle emissioni; secondo il report FAO, nel 2010 i principali stati asiatici erano responsabili del 44% delle emissioni totali (FAO, 2014).

Per quanto riguarda la gestione della risorsa idrica, oltre ad un problema qualitativo, esiste una problematica di ordine quantitativo legato al fatto che la zootecnia attinge in misura significativa alle risorse idriche. Nel mondo si calcola che l'allevamento del bestiame assorba più dell'8% dei consumi idrici umani, soprattutto per le necessità di irrigazione delle colture destinate all'alimentazione degli animali (Steinfeld *et al.*, 2006). In Europa l'uso a fini agricoli dell'acqua costituisce in media il 30% circa dell'utilizzo complessivo, con variazioni in funzione della latitudine (Crovetto and Sandrucci, 2010).

Negli ultimi decenni, le politiche ambientali e agricole dell'Unione Europea e nazionali hanno riguardato in modo sempre più approfondito il perseguimento di un sistema di zootecnia sostenibile, fondato su un'intensa specializzazione produttiva, in grado di trasformare materie prime in derrate alimentari in maniera sempre più efficiente, ma nello stesso tempo attenta all'utilizzo delle risorse, alla gestione dell'utilizzo agronomico delle deiezioni e alla tutela delle acque (D.Lgs 152/99 art. 1). Il decreto legislativo 152/2006 (Testo Unico dell'Ambiente o Codice dell'ambiente) rappresenta l'attuale normativa di riferimento, in materia di valutazione dell'impatto ambientale, con la finalità di *“proteggere la salute umana, contribuire con un migliore ambiente alla qualità della vita, provvedere al mantenimento delle specie e conservare la capacità di riproduzione dell'ecosistema in quanto risorsa essenziale per la vita”* (art. 4).

1.3.2. Benessere animale

Il benessere animale è oggetto di una crescente attenzione non solo da parte dell'ambiente scientifico, ma anche dell'opinione pubblica. Il “welfare” è così diventato argomento di attualità, al centro di discussioni e di dibattiti tra allevatori, consumatori e tutti coloro che operano nel settore delle produzioni animali (Tosi *et al.*, 2003).

A conferma del grosso interesse nei confronti di questa tematica, è presente un grosso corpus legislativo sul benessere animale che riguarda ogni tipologia di allevamento in ogni aspetto della filiera, dalla routine aziendali fino alla macellazione; di seguito le più recenti.

- Direttiva 98/58/CE riguardante la protezione degli animali negli allevamenti, recepita con il D. lg. 26 marzo 2001, n. 146 e successive modifiche (Legge n. 306/2004 e Legge n. 17/2007);

- Decreto Legislativo 29 luglio 2003, n. 267 - "Attuazione delle direttive 1999/74/CE e 2002/4/CE, per la protezione delle galline ovaiole e la registrazione dei relativi stabilimenti di allevamento";
- Regolamento (CE) n. 1/2005 del Consiglio, del 22 dicembre 2004, sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate che modifica le direttive 64/432/CEE e 93/119/CE e il regolamento (CE) n. 1255/97;
- Decreto Legislativo 27 settembre 2010, n.181 - "Attuazione della direttiva 2007/43/CE che stabilisce norme minime per la protezione di polli allevati per la produzione di carne";
- Regolamento (CE) N. 1099/2009 DEL CONSIGLIO del 24 settembre 2009 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento;
- Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n. 122 - Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini;
- Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n. 126 - Attuazione della direttiva 2008/119/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei vitelli.

Non esiste una definizione univoca di benessere; infatti numerosi autori hanno proposto nel corso degli anni una definizione di "benessere animale" che risultasse accettabile sia dal punto di vista scientifico sia da quello etico.

Tra tutte le definizioni, quella data da Duncan (1988) può essere considerata sufficientemente esaustiva ed allo stesso tempo chiara e concisa: "Il benessere è uno stato generale di buon equilibrio fisico-mentale in cui l'animale si trova in armonia con l'ambiente circostante".

Nonostante l'assenza di una definizione unica e condivisa, è chiaro che il benessere animale:

- è una caratteristica intrinseca dell'animale e non qualcosa che gli viene fornito dall'esterno;
- può variare da ottimo a pessimo;
- si può misurare in modo scientifico e per tale misurazione risulta fondamentale la conoscenza dell'etogramma di specie;
- è fortemente correlato ai concetti di dolore e sofferenza;
- non può essere considerato indipendente dalle condizioni di allevamento;
- deve essere garantito a tutti i livelli della filiera (allevamento, trasporto e macellazione).

2. Allevamento del pollo da carne

2.1. Introduzione

2.1.1. Il mercato del broiler

Il pollo domestico (*Gallus gallus*) rappresenta un'importante fonte di carne sia per paesi industrializzati che per quelli emergenti; grazie al suo ciclo biologico breve e la sua estrema adattabilità a tutte le fasce climatiche, il pollo è considerata la specie più sfruttata ai fini alimentari (UNAVICOLTURA, 2015).

Stime FAO hanno calcolato che la carne di pollo sarà il prodotto di origine animale che subirà il maggiore incremento dei consumi nei prossimi 30 anni in relazione alla crescita demografica prevista; in tal senso, è stato stimato un aumento complessivo del 225% del consumo di carne avicola, che arriverà a sfiorare il + 280% nel caso si consideri solamente lo scenario relativo ai Paesi Emergenti (Tabella 11).

Tabella 11. Stime dei consumi di prodotti di origine animali (espressi in milioni di tonnellate) (modificato da FAO, 2006c).

	Anno				Variazione 2050/2010
	2010	2020	2030	2050	
<i>Mondo</i>					
carni totali	268.7	319.3	380.8	463.8	173%
carne bovina	67.3	77.3	88.9	106.3	158%
carne ovina	13.2	15.7	18.5	23.5	178%
carne suina	102.3	115.3	129.9	140.7	137%
carne avicola	85.9	111.0	143.5	193.3	225%
latte e derivati	657.3	755.4	868.1	1038.4	158%
<i>Paesi Emergenti</i>					
carni totali	158.3	200.8	256.1	330.4	209%
carne bovina	35.1	43.6	54.2	70.2	200%
carne ovina	10.1	12.5	15.6	20.6	204%
carne suina	62.8	74.3	88.0	99.2	158%
carne avicola	50.4	70.4	98.3	140.4	279%
latte e derivati	296.2	379.2	485.3	640.9	216%

Per quanto riguarda i consumi degli ultimi anni, la carne di pollo è cresciuta in modo lineare; con le sole eccezioni correlate agli "scandali alimentari" quali il "pollo alla diossina" (1999) e l'influenza aviaria tra il 2003 e il 2006 (Center for Disease Control and Prevention, 2015).

Tale trend in costante crescita potrebbe trovare spiegazione nei numerosi vantaggi offerti dall'allevamento di questa specie; tra i punti a favore possiamo trovare:

- prezzo accessibile, 2,17€/kg. Dato calcolato a Maggio 2017 come prezzo all'ingrosso (ISMEA mercati);
- assenza di ostacoli culturali o religiosi, a differenza per esempio delle carni suine o del bovino;
- elevata qualità dietetica e nutrizionale, adatto all'alimentazione di tutte le fasce d'età;

- varie possibilità di trasformazione, intero, porzionato o trasformato;
- sapore delicato e non troppo invadente;
- buona versatilità gastronomica.

Inoltre, il ciclo produttivo molto ridotto consente un rapido adattamento alle variazioni di mercato e l'ottimo indice di conversione permette di ridurre i costi di produzione (Valceschini, 2006).

Dal punto di vista nutrizionale, la carne di pollo costituisce un'importante fonte proteica con un buon tenore di acidi grassi polinsaturi, in particolare acido linoleico (C18:2) e arachidonico (C20:4), basso contenuto in colesterolo (mediamente < 60mg in 100g di prodotto), buon contenuto in ferro e vitamine del complesso B, tra cui la B12. Il contenuto lipidico è invece variabile a seconda della parte considerata (da 0,8 a 14%), ma è comunque inferiore rispetto ad altre tipologie carni e soprattutto facilmente separabile in quanto concentrato in maggior parte nella regione addominale e nel sottocute (CREA, 2015).

Secondo il report annuale dell'AVEC, la produzione mondiale di carne è in crescita e si prevede che il reparto avicolo diventerà entro il 2020 il principale settore produttivo (AVEC, 2015).

2.1.2. Lo scenario italiano

L'allevamento avicolo moderno, profondamente diverso da quello del passato, caratterizzato da dinamiche di tipo familiare, dall'utilizzo di razze e ceppi locali e considerato un'attività secondaria integrante l'allevamento di altre specie, è ormai un comparto zootecnico completamente autonomo e autosufficiente (con un tasso di approvvigionamento pari al 106%), altamente specializzato e di grande rilevanza nell'economia nazionale. Il settore avicolo viene infatti considerato il secondo comparto zootecnico nazionale per importanza produttiva ed economica dopo quello bovino.

Il fatturato totale del settore nel 2015 è stato pari a 5.600 milioni di Euro (IsmeaMercati). Nell'ultimo anno la produzione interna è stata pari a 1.308.960 tonnellate (+ 1% rispetto al 2015) e considerando il solo pollo da carne, la produzione è aumentata del + 3,9%, che corrisponde a 906.700 tonnellate nei confronti del precedente anno. Infine, i consumi medi di carne pro-capite sono stati di 90kg totali, 19,85kg dei quali dati da pollame (UNAITALIA, 2015 e Carnisostenibili.it).

Il patrimonio avicolo è concentrato soprattutto in Veneto, Lombardia ed Emilia Romagna e l'allevamento è per oltre il 90% di tipo intensivo, mentre il restante è di tipo rurale e finalizzato all'autoconsumo. Sul territorio italiano sono presenti più di 6.200 allevamenti, suddivisi in aziende da ingrasso, ovaiole, riproduttori e svezzatori. A completamento del quadro produttivo, sono presenti 400 mangimifici, 174 impianti di macellazione di grandi e piccole dimensioni e oltre 500 stabilimenti per il taglio e la trasformazione di prodotti e preparazioni a base carne (IsmeaMercati).

2.1.3. Sistema produttivo circolare

Dagli anni settanta il comparto avicolo ha adottato un sistema circolare o ad integrazione verticale tra le diverse fasi produttive (mangimifici, allevamenti, impianti di macellazione e canali di vendita) al fine di garantire una maggiore adattabilità alle esigenze di mercato e un maggiore rispetto degli standard organolettici e igienico-sanitari. Grazie a questo sistema inoltre, si è venuta a realizzare una linea di comunicazione diretta tra settore produttivo, trasformazione, distribuzione e il consumatore finale, sempre più attento alle caratteristiche, alla qualità e alla sicurezza dei prodotti e in grado di influenzare l'intera filiera produttiva (Cerolini *et al.*, 2008).

2.2. Allevamento intensivo: tecniche e problematiche correlate

2.2.1. L'utilizzo dell'ibrido: vantaggi e svantaggi

L'ingente richiesta di prodotti di origine animale a basso costo nell'immediato dopoguerra ha dato un forte impulso alla zootecnia ed in particolar modo alla selezione genetica, nella ricerca e nella selezione di animali e razze a rapido accrescimento in grado quindi di fornire la maggior quantità di prodotto nel minor tempo possibile.

In questo scenario si è così giunti agli ibridi commerciali, animali ottenuti attraverso incroci mirati partendo da linee pure ad elevato livello di omozigosi e selezionate per determinati caratteri come la velocità di crescita, la struttura scheletrica, la qualità della carcassa, il colore e il pH della carne. Questi soggetti presentano un'elevata voracità e ritmi di crescita estremamente elevati; a riprova dell'enorme differenza tra la genetica odierna e quella del passato, una ricerca di Havenstein *et al.*, (2003) ha riportato che nel 1945 erano necessari 98 giorni per ottenere un pollo da carne di 1,6kg, mentre oggi sono sufficienti 35 giorni. In aggiunta, l'ICA, uno dei parametri di maggiore rilevanza per l'allevatore, è passato da 3,75 a 1,88 in soli 70 anni.

In uno studio sperimentale (Zuidhof, 2014) sono state valutate le differenze nell'accrescimento, efficienza alimentare e resa finale di due linee di broiler, la cui selezione genetica è rimasta quella del 1957 e del 1978 con una linea di broiler commerciale Ross 308 odierna. Il piano alimentare utilizzato è stato *ad libitum*, identico per tutte e tre le linee genetiche oggetto della prova e in linea con le raccomandazioni della linea Ross 308. I risultati ottenuti sono stati a dir poco sconcertanti; il peso corporeo (BW) della genetica odierna era significativamente differente già alla schiusa, mentre il peso finale risultava aumentato di oltre il 400%, con una dimezzamento del tasso di conversione alimentare (Grafico 2 e Figura 4).

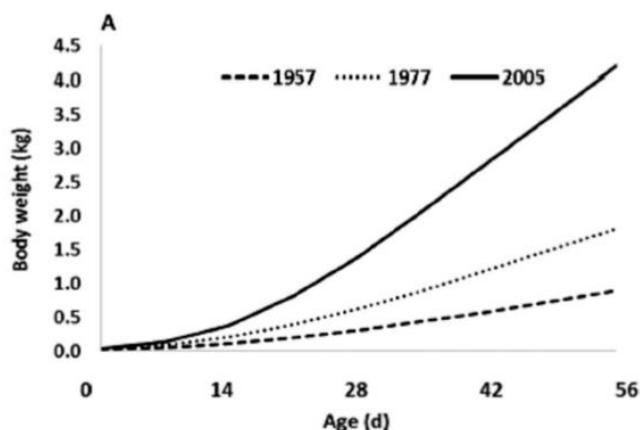


Grafico 2. Tasso di crescita di tre linee genetiche di polli da carne (Zuidhof, 2014).

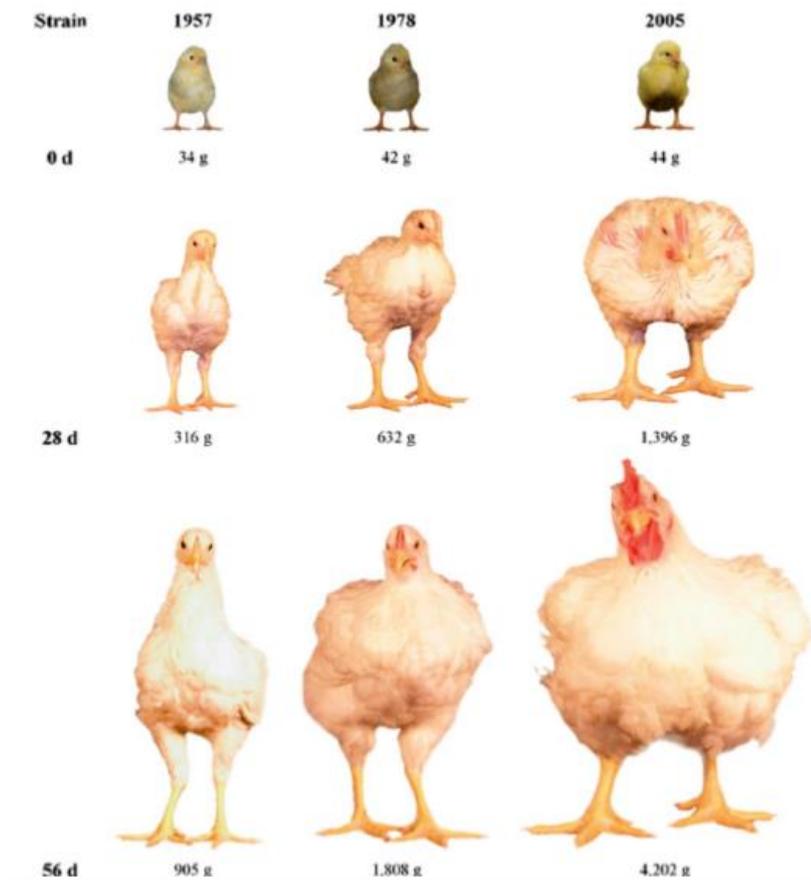


Figura 4. Differenze di peso e tasso di crescita di tre linee genetiche di polli da carne (Zuithof, 2014).

2.2.2. Strutture di allevamento

L'allevamento del pollo da carne, nel nostro Paese, si realizza esclusivamente con un sistema di allevamento a terra su lettiera permanente, ritenuto più idoneo al fine di ottenere una elevata qualità del prodotto finale. I broiler vengono allevati in strutture chiuse, dotate di rigidi sistemi di controllo artificiale delle condizioni interne (illuminazione, umidità e ventilazione) e un elevato grado di meccanizzazione (Figura 5).

I capannoni hanno generalmente pianta rettangolare e sono in grado di contenere da 80 a 250 mila capi ad una densità media variabile tra 30 e 42kg/m² in funzione del peso finale, del clima e del tipo di ricovero; inoltre, la durata del ciclo varia in funzione della richiesta del mercato, ma non supera mai le 10 settimane. Una caratteristica del comparto nazionale è la diversificazione del prodotto in funzione del sesso e della durata del ciclo di allevamento e, di conseguenza, del peso vivo degli animali al momento della macellazione (Cerolini, 2013).



Figura 5. Interno di un allevamento di polli da carne.

2.2.3. Normativa sul Benessere

Le principali problematiche relative all'allevamento del broiler derivano dall'intenso ritmo di crescita, causa di disordini metabolici e ridotta attività locomotoria (Bessei, 2006) e dalla elevata densità. Nel giugno 2007 il Consiglio dell'Unione Europea ha approvato la direttiva 2007/43/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei polli da carne, applicabili agli allevamenti intensivi con più di 500 capi. In particolare, l'articolo 3 stabilisce la densità massima di allevamento in funzione delle caratteristiche del ricovero utilizzato: da 33 a 42kg/m² in base al rispetto delle condizioni riportate negli allegati I, II o V rispettivamente.

2.2.4. Alimentazione

L'alimentazione del pollo da carne ha come obiettivi principali il raggiungimento del peso di macellazione in tempi rapidi, con ottimali performance di crescita. Deve garantire inoltre la corretta funzionalità dell'apparato digerente a cui è associato lo stato di salute e benessere dell'animale, nonché la sicurezza dei prodotti destinati al consumo umano (Cerolini *et al.*, 2008).

Il ciclo di allevamento del broiler può essere comunemente suddiviso in tre fasi (avviamento, accrescimento e finissaggio), caratterizzate dalla successione di mangimi differenti per presentazione fisica e caratteristiche nutritive, in relazione all'età, al peso e alle esigenze nutrizionali di animali in rapida crescita (Tabella 12).

Tabella 12. Fabbisogni nutrizionali di polli da carne (linea genetica COBB) suddivisi nei vari periodi di crescita.

Item	Starter	Ingrasso	Finissaggio 1	Finissaggio 2
Periodo (g)	0-10	11-22	23-42	> 43
Forma fisica	sbriciolato	pellet	pellet	pellet
Proteina grezza (%)	21-22	19-20	18-19	17-18
EM (MJ/kg)	12,59	12,92	13,26	13,36
Lisina (%)	1,32	1,19	1,05	1,00
Metionina (%)	0,50	0,48	0,43	0,41
Triptofano (%)	0,20	0,19	0,19	0,18
Calcio (%)	0,90	0,84	0,75	0,76
Fosforo (%)	0,45	0,42	0,28	0,38
Sodio (%)	0,16-0,23	0,16-0,23	0,15-0,23	0,15-0,23
Potassio (%)	0,60-0,95	0,60-0,85	0,60-0,80	0,60-0,80
Acido linoleico (%)	1,00	1,00	1,00	1,00

EM = energia metabolizzabile

L'alimento è rappresentato da un mangime composto integrato, bilanciato in termini di macro e micronutrienti secondo le raccomandazioni del National Research Council (NRC, 1994), e somministrato *ad libitum* in mangiatoie a tramoggia. Il mangime si presenta in forma di pellet al fine di garantire la corretta assunzione di tutti i componenti della dieta, evitando così fenomeni di selezione da parte degli animali, che a lungo andare possono portare a sindromi carenziali.

In dettaglio, la fase iniziale, che comprende i primi 10-12 giorni di vita, riveste un ruolo chiave all'intero del ciclo produttivo del pollo, in quanto eventuali problemi riscontrati a questo livello, come ad esempio cali di assunzione o errori nella formulazione, determinano deficit produttivi difficilmente recuperabili nei periodi successivi. Inoltre, è opportuno considerare che il corredo enzimatico nei primi giorni di vita non risulta pienamente sviluppato, in particolare i pulcini non sono in grado di digerire e utilizzare lipidi e alcune fonti di carboidrati come substrati energetici. Grande attenzione deve quindi essere posta nella formulazione dei mangimi di avviamento caratterizzati da un'elevata digeribilità, ottenuta grazie a trattamenti termici delle materie prime, come ad esempio la fiocatura, o grazie all'integrazione di additivi digestivi quali enzimi o emulsionanti.

L'accrescimento, di norma compreso tra i 10-12 giorni e i 22-25 giorni, costituisce il secondo step dell'allevamento del pollo da carne, qui assistiamo ai maggiori incrementi ponderali, specie nelle femmine. Lo scopo di questa fase è massimizzare l'uniformità di crescita; in tal senso il peso degli animali al momento della macellazione avrà un delta molto ridotto, garantendo un prodotto finale omogeneo che risponde ai requisiti richiesti dal mercato.

L'ultima fase produttiva prende il nome di finissaggio e ha lo scopo di portare gli animali al peso finale stabilito. Questa ha durata variabile in relazione alla tipologia di animali allevati (broiler leggeri vs roaster pesanti), operazione chiave del finissaggio è il rispetto dei tempi di sospensione (5-7 giorni), ovvero l'intervallo di tempo richiesto all'organismo per metabolizzare i farmaci eventualmente somministrati, al fine di evitare residui nelle carni (Cerolini *et al.*, 2008).

2.2.5. Impatto ambientale

Lo sviluppo dell'attività di allevamento e la sua concentrazione in zone relativamente ristrette ha generato un pesante impatto ambientale sia nei confronti delle acque superficiali sia dell'atmosfera.

Per questo motivo, il Decreto Legislativo 372 del 4 agosto 1999, anche noto come normativa IPPC (Integrated Pollution Prevention and Control", ossia "prevenzione e riduzione integrata dell'inquinamento"), individua le Migliori Tecniche Disponibili (MTD), quali vere soluzioni per rendere l'allevamento avicolo sempre più sostenibile. La riduzione dell'impatto ambientale si basa quindi su interventi di tipo gestionale e strutturale, in grado di abbattere la formazione di odori ed emissioni di gas ammoniacali in ambiente (Cerolini *et al.*, 2008).

3. Allevamento del suino

3.1. Introduzione

Il mercato globale della carne suina e dei prodotti trasformati si presenta molto vario e frammentato; in particolare la Cina rappresenta il primo Paese al mondo per produzione e consumi di carne, 55.402 e 55.902 mila tonnellate rispettivamente. E' chiaro quindi che questa nazione si inserisce a pieno titolo nell'elenco dei principali player mondiali nell'industria suinicola.

La situazione dell'UE-28 è invece caratterizzata da produzioni di elevata qualità e da forti esportazioni verso mercati esteri, in particolar modo Cina, Filippine e Giappone che in questi ultimi hanno mostrato i maggiori tassi di crescita.

Stime dell'ISMEA, a partire da dati OCSE-FAO, prevedono un aumento mondiale nei prossimi 15 anni della produzione di carne suina, accompagnato quasi parallelamente dall'incremento dei consumi (Figura 6). Nello specifico, la Cina, con 62,5 miliardi di tonnellate, l'Unione Europea (23,5 miliardi di tonnellate) e gli USA, 12,3 miliardi di tonnellate totali saranno i principali produttori (OECD/FAO, 2016).

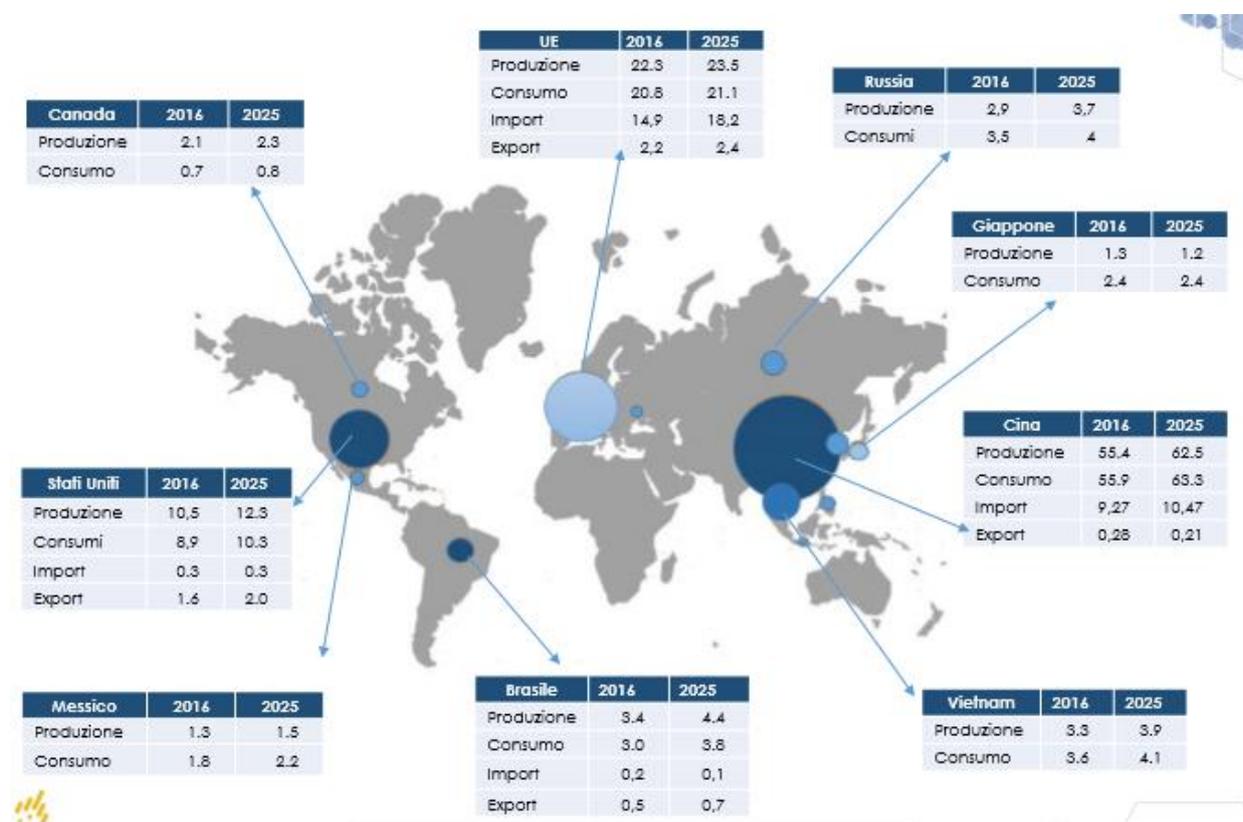


Figura 6. Previsioni dello scenario mondiale della carne suina (Ismea su elaborazione dati OCSE-FAO).

3.1.1. Lo scenario italiano

Il settore suinicolo italiano si caratterizza per un elevato grado di specializzazione, con particolare riferimento alla fase di ingrasso che consiste nell'accrescimento di suinetti del peso di 20-30kg fino al peso richiesto dal mercato. Secondo l'indagine ISTAT 2015, più del 25% del totale dei capi è rappresentato da suini di oltre 110kg di peso, mentre animali del peso compreso tra 80 e 110kg costituiscono un ulteriore 17% (Grafico 3).

Questi dati sono in totale accordo con il sistema tradizionale produttivo italiano, unico al mondo nel suo genere, che prevede l'allevamento di animali pesanti (160-180kg), destinati alla produzione di salumi e altri prodotti trasformati che rappresentano una bandiera del made in Italy nel mondo.

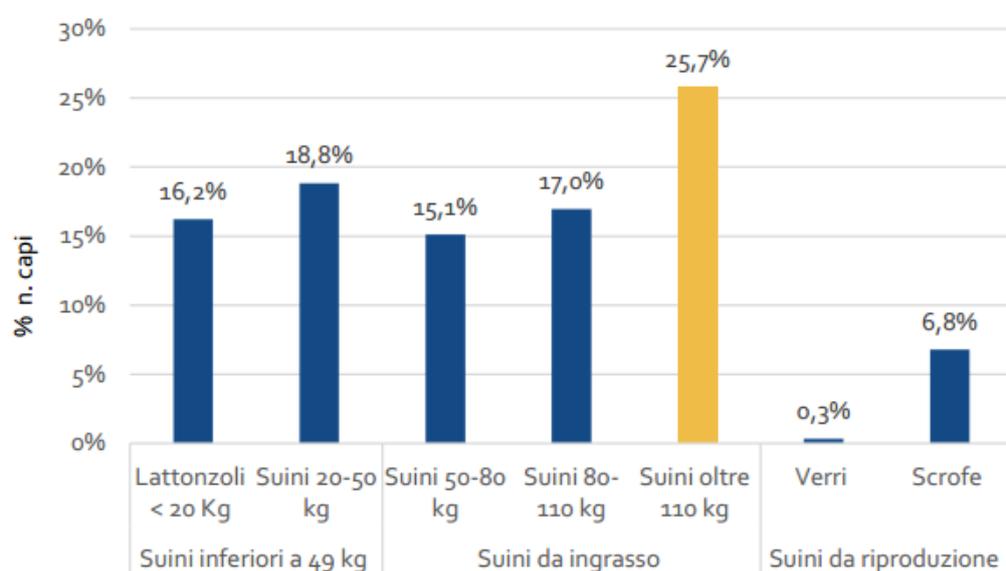


Grafico 3. Specializzazione produttiva delle aziende suinicole italiane (dati riferiti all'anno 2015) (ISMEA su dati Istat).

In Italia gli allevamenti sono 26.582 per un totale di 8,6 milioni di capi; le regioni del Nord sono caratterizzate da una forte concentrazione e specializzazione produttiva, mentre il Centro-Sud presenta una maggiore frammentazione (Grafico 4).

La dimensione media aziendale nazionale è di 324 capi per azienda, tuttavia le realtà di maggiori dimensioni sono localizzate in Lombardia, Piemonte, Emilia Romagna e Veneto (Tabella 13) (ISMEA su dati ISTAT).

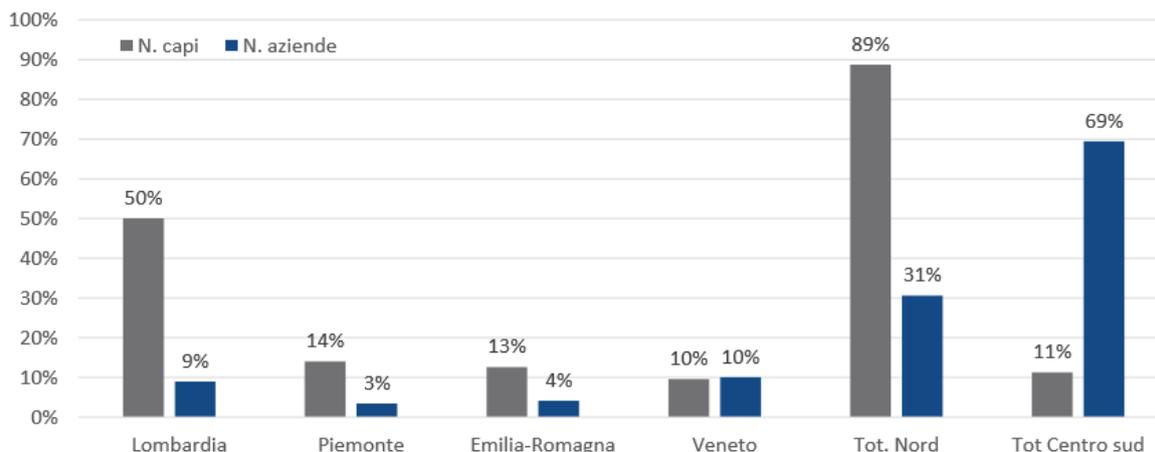


Grafico 4. Distribuzione territoriale del numero di capi e delle aziende (dati riferiti all'anno 2015) (ISMEA su dati Istat).

Tabella 13. Caratteristiche del settore suinicolo italiano (ISMEA su dati Istat).

Fase	Riproduzione		Ingrasso	
	Suinetti		Magroni	Grassi
<i>Categorie</i>				
<i>Zona di produzione</i>	Lombardia, Emilia R., Veneto, Piemonte		Lombardia, Emilia R., Piemonte, Veneto	Lombardia, Emilia R., Piemonte
<i>Caratteristiche</i>				
• <i>aziendali</i>				
dimensioni medie	800 capi/az	356 capi/az	226 capi/az	
forma giuridica	azienda individuale/società semplice			
autoprod. mangime	circa 1/3 delle aziende			
• <i>tecnico - produttive</i>				
razza	incroci (Duroc/Large White/Landrace/Pietrain)			
alimentazione	prestarter di alto valore nutritivo e biologico ad libitum	siero, cruscami, Sali minerali	cereali crudi, farine di soia razionata	
peso	< 30kg	60-90kg	leggero 90-120kg pesante 120-180kg	
età	< 4 mesi	6-7 mesi	9-10 mesi	
resa	/	77,6%	80,1%	
• <i>ricavi aziendali</i>				
da prodotti aziendali	97% delle aziende			
da attività connesse	34% delle aziende			
da pagamenti diretti	63% delle aziende			

Il patrimonio suinicolo nazionale nel corso degli ultimi anni si è fortemente ridotto; in particolare, tra il 2010 e il 2015, si è riscontrata una perdita media di capi del 7%, dove il maggiore calo riscontrato è avvenuto tra il 2012 e il 2013, in concomitanza con l'applicazione delle nuove norme per la tutela del benessere degli animali, che hanno portato alla chiusura di molte aziende di piccole-medie dimensioni (Grafico 5).

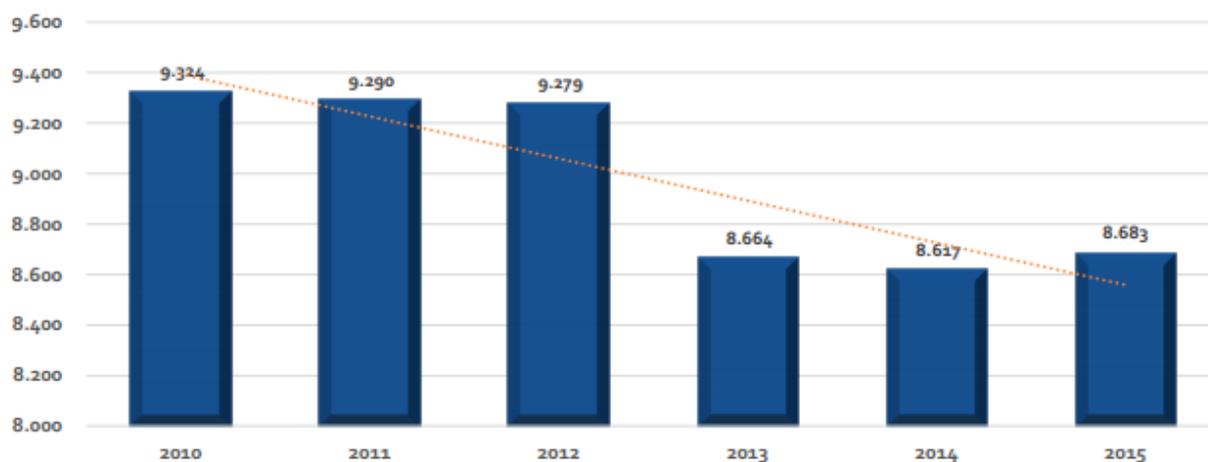


Grafico 5. Patrimonio suinicolo nazionale (dati espressi in migliaia di capi) (dati ISMEA).

La Tabella 14 riporta il patrimonio suinicolo italiano riferiti al 1° dicembre 2016.

Tabella 14. Patrimonio suinicolo nazionale (dati Istat aggiornati al 1° dicembre 2016).

Categoria	Valore
<i>Suini totali</i>	8.478.000
<i>Suinetti fino a 50kg</i>	2.977.000
<i>Suini da ingrasso (oltre 50kg)</i>	4.914.000
50-80kg	1.211.000
80-110kg	1.452.000
oltre 110kg	2.251.000
<i>Suini da allevamento (oltre 50 kg)</i>	587.000
verri	29.000
<i>Scrofe da riproduzione</i>	558.000

La riduzione del numero di capi totali sul nostro territorio è però compensata dal quadro relativo alle produzioni che presenta un trend nettamente favorevole.

Nonostante il settore suinicolo italiano si caratterizza per una forte dipendenza dall'estero (Germania) in relazione all'approvvigionamento di carni fresche, refrigerate e congelate e di suini vivi, tale tendenza è controbilanciata dalle esportazioni, trainate dalle produzioni tipiche (prosciutti e salumi) (ISMEA su dati IHS-GTA).

Nel 2016 infatti, l'export di carne suina dell'UE ha raggiunto il livello record di 2,8 milioni di tonnellate (+ 28% rispetto al 2015) grazie soprattutto alla forte richiesta da parte della Cina. All'interno del bilancio nazionale, la voce delle esportazioni ha consentito di sopperire alla contrazione dei consumi interni.

A riprova della scelta produttiva degli imprenditori italiani, il prodotto più esportato all'esterno sono proprio i salumi, frutto dell'allevamento del suino pesante unito alla professionalità dell'industria della trasformazione, che nel 2016 ha registrato un fatturato di 1,6 miliardi di euro

(56% del totale carni) (Tabella 15 e Tabella 16). Non solo i salumi italiani sono i più richiesti dai mercati stranieri, ma rispondono anche al miglior rapporto qualità/prezzo (8,1€/kg) se paragonati con i corrispettivi prodotti spagnoli (5,70 €/kg), tedeschi (4,2 €/kg) o statunitensi (3€/kg), sebbene i volumi siano inferiori (Rivista di Suinicoltura. 2017).

Tabella 15. Analisi delle imprese, dei volumi e del fatturato di salumi DOP e IGP (Ministero della Salute).

Item	Unità di misura	Anno		
		2013	2014	2015
SALUMI				
imprese di produzione elaborati	n°	3.468	3.472	3.359
volumi	.000 ton	1.180	1.165	1.176
fatturato industria salumi	milioni €	7.944	7.822	7.875
peso sul fatturato industria agroalimentare	%	6,0	5,9	6,0
SALUMI DOP E IGP				
volumi	.000 ton	186	185	n.d.
fatturato alla produzione	milioni €	1.515	1.555	n.d.
peso sulla produzione salumi	%	15,8	15,9	n.d.
peso sul fatturato alla produzione salumi	%	0,2	0,2	n.d.

Tabella 16. Flussi commerciali di capi vivi, carni suine e preparazioni/conserve (escluse frattaglie e grasso).

Voce	Unità di misura	Anno		
		2013	2014	2015
<i>import</i>	milioni €	2.247	2.295	2.104
<i>peso su import tot. agroalimentare</i>	%	8,5	5,5	4,9
<i>export</i>	milioni €	1.268	1.449	1.521
<i>peso su export tot. agroalimentare</i>	%	3,8	4,2	4,1
<i>saldo</i>	milioni €	-979	-846	-583
<i>peso su saldo tot. agroalimentare</i>	%	13,5	11,2	9,8

3.2. Allevamento intensivo: tecniche e problematiche correlate

3.2.1. Settori di allevamento

Quindi i maiali dei giorni nostri, salvo rare eccezioni, crescono in allevamenti ove tutti i cicli fisiologici della produzione suina vengono ottimizzati in strutture concepite ad hoc, dove viene posta particolare attenzione a garantire le condizioni sanitarie degli animali e quindi ad ottenere buone performance produttive e riproduttive. In questi allevamenti si possono individuare differenti settori per le varie fasi di vita degli animali: una zona di gestazione, una di maternità (con le sale parto), il settore di svezzamento e infine quello di accrescimento-ingrasso. Tutti i settori hanno in comune una particolare attenzione per l'alimentazione e la biosicurezza che sono le migliori garanzie di animali sani e di ridotti problemi sanitari (Corino *et al.*, 2008).

L'allevamento del suino è costituito dalla fase di riproduzione e da quella di ingrasso. Un'ulteriore suddivisione sulla base della fase produttiva degli animali permette di definire in maniera più dettagliata fasi dell'allevamento:

- Gestazione: per le scrofe/scrofette gravide;
- Maternità: anche chiamato sala parto, che ospita le scrofe alcuni giorni prima del parto fino allo svezzamento delle nidiate;
- Post-svezzamento: per i suinetti svezzati e fino al raggiungimento dei 20-30kg di peso vivo;
- Accrescimento: per suini da 20-30 a 50-65kg;
- Ingrasso: per suini da 50-65kg fino al peso finale (100-110kg per il suino leggero da macelleria, 160-170kg per il suino pesante da salumificio).

Nelle realtà zootecniche di tipo intensivo, viene applicata la tecnica del “tutto pieno tutto vuoto” (all-in all-out) che consiste nel riempire il più rapidamente possibile uno stesso locale, in modo da avere animali con uguali caratteristiche fisiologiche o di crescita, svuotandolo completamente a fine ciclo, per sottoporlo ad accurate operazioni di pulizia e disinfezione seguite da un congruo periodo di vuoto sanitario (3-7 giorni) prima di iniziare un nuovo ciclo produttivo.

Data la complessa suddivisione dei settori, l'allevamento del suino prevede locali progettati *ad hoc* per la singola categoria produttiva; tuttavia nei capitoli successivi verranno descritte le strutture di allevamento in maniera il più possibile concisa ed esaustiva senza entrare troppo nei dettagli costruttivi.

3.2.2. Strutture di allevamento

Pavimentazione: i pavimenti e le pareti dei locali destinati all'allevamento dei suini devono essere adeguati alle dimensioni ed al peso dei suini; inoltre devono essere resistenti, facilmente lavabili e disinfettabili. Esistono tre tipologie di pavimentazione: piena, fessurata o grigliata.

Densità: una corretta densità è indispensabile per evitare problemi di stress da calore, nonché garantire accettabili condizioni di benessere degli animali; la Direttiva 2001/88/CE del Consiglio riporta le superfici libere a disposizione di ciascun suinetto o suino all'ingrasso allevato in gruppo.

Microclima: l'allevamento intensivo prevede la stabulazione degli animali in capannoni chiusi al fine di regolare e monitorare con precisione il microclima interno per offrire ai suini le condizioni ambientali più idonee ed esprimere così al meglio le loro potenzialità genetiche. Il D.L.vo 122 del 07/07/2011 definisce i parametri di illuminazione, temperatura e umidità nei diversi settori.

Acqua: la somministrazione dell'acqua avviene tramite abbeveratoi automatici che consentono l'erogazione nel momento stesso in cui l'animale la richiede, garantendo elevati livelli di freschezza e igiene. Esistono differenti tipologie di abbeveratoi, tuttavia è buona norma mantenere la stessa tipologia costruttiva in tutte le fasi produttive, verificare regolarmente la pulizia e la funzionalità degli stessi, nonché assicurarne un numero sufficiente (uno ogni dieci capi) (Tosi *et al.*, 2003).

3.2.3. Normativa sul Benessere

La crescente attenzione del consumatore nei confronti delle specie allevate ai fini alimentari ha portato all'emanazione di una serie di normative specie-specifiche in tema di benessere animale.

Per quanto riguarda la specie suina, la normativa a cui gli allevatori devono fare riferimento è rappresentata dal D.Lgs 7 luglio 2011 n 122 "Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce norme minime per la protezione dei suini". Tale decreto chiarisce tutti gli aspetti dell'allevamento del suino.

3.2.4. Alimentazione

La corretta alimentazione dei suini risulta fondamentale per diversi aspetti. *In primis*, garantisce un ottimale stato di benessere degli animali allevati, condizione essenziale per ottenere delle adeguate performance produttive e riproduttive; alcuni indici di valutazione sono l'assunzione di alimento, l'incremento ponderale medio giornaliero (IMPG) e l'indice di conversione alimentare (ICA).

Alimentare gli animali in maniera adeguata consente inoltre di ottenere dei prodotti destinati al consumo umano che corrispondano ai requisiti di sicurezza, salubrità e qualità. Ad esempio, prodotti a marchio garantito, come DOP e IGP, di cui l'Italia è il primo Paese al Mondo per numerosità (291, Mipaaf), prevedono un disciplinare di produzione molto stringente, in termini di piano alimentare, scelta delle materie prime, densità di stabulazione ed applicazione della normativa sul benessere, che gli allevatori devono necessariamente rispettare.

I suini devono quindi avere a disposizione ogni giorno una dieta che sia in grado di soddisfare i loro fabbisogni e che sia adeguata alla loro età e al loro peso, oltre che conforme alle loro esigenze fisiologiche, come riportato dalla Direttiva 91/630/CEE.

La formulazione di una dieta deve però sempre tenere in conto, oltre alle mere esigenze del suino in termini di principi nutritivi, anche delle esigenze etologiche della specie, al fine di garantire un livello di benessere generale. In tal senso, carenze dietetiche sono in grado di indurre la comparsa o l'aumento di frequenza di alcuni comportamenti, che nel suino sono indicatori di uno scarso livello di benessere. Per esempio, è stato osservato che la morsicatura della coda si presenta con frequenze maggiori in suini con un'alimentazione carente in

aminoacidi essenziali (per esempio triptofano) o in minerali (ferro, rame, calcio, fosforo e cloruro di sodio) (Cevolani, 2016).

L'alimentazione è anche in grado di controllare e prevenire l'insorgenza di alcune forme patologiche, in particolare di origine enterica. Nello specifico, i suinetti nella fase di post-svezzamento sono la categoria produttiva più sensibile a patologie gastro-intestinali che, sulla base della gravità, possono manifestarsi come semplice calo di assunzione, fenomeni diarroici più o meno gravi, fino alla morte del soggetto (< 10% casi) (Fairbrother *et al.*, 2005). Tali patologie sono provocate da infezioni batteriche, prevalentemente a carico di *E.coli*, che, in concomitanza con un calo delle difese immunitarie dei soggetti dovuti al cambio di alimentazione e di struttura, al rimescolamento tra le nidi e altri eventi stressanti, provoca il quadro sintomatologico sopra riportato.

In tal senso, introdurre nella dieta additivi come nucleotidi, prebiotici e acidi organici, consente una più rapida attività proliferativa degli enterociti e stimola in maniera positiva il sistema immunitario (Dell'Orto *et al.*, 2009).

3.2.5. Impatto ambientale

Come è noto, le due maggiori fonti di inquinamento negli allevamenti zootecnici sono rappresentate da feci e urine; attraverso tali frazioni vengono infatti dispersi nell'ambiente quantitativi variabili di effluenti, di cui è necessario conoscere la composizione e il relativo volume per poterne ottimizzare l'utilizzo senza rischi per l'ambiente.

L'alimentazione costituisce la prima forma di controllo dell'inquinamento, poiché le deiezioni contengono i nutrienti che l'animale non è stato in grado di "fissare" nel proprio organismo o nei suoi prodotti e per quanto riguarda l'allevamento dei suini, le escrezioni di azoto e fosforo rappresentano la principale problematica relativa alla gestione dei reflui.

L'azoto deriva dal catabolismo di proteine e aminoacidi somministrati agli animali per promuovere l'accrescimento muscolare. Tuttavia, esiste un limite fisiologico oltre il quale aumentando la percentuale di proteina nella dieta, non si ottengono miglioramenti nelle performance produttive, in quanto le dosi somministrate superano i fabbisogni degli animali. Per evitare eccessive perdite di azoto, è necessario conoscere i fabbisogni proteici dei suini, che decrescono con l'aumentare dell'età, e successivamente intervenire sulle caratteristiche delle diete. In particolare è possibile formulare diete specifiche per le singole fasi fisiologiche (razionamento per fasi) oppure ridurre gli apporti proteici totali a favore di un'integrazione più mirata di singoli aminoacidi di sintesi. In aggiunta, i trattamenti fisico-chimici degli alimenti, come la fiocatura e l'estrusione, nonché l'utilizzazione di materie prime a elevata digeribilità possono contribuire a ridurre efficacemente la quota di azoto attraverso le feci.

Ad esempio, considerando due diete isoenergetiche, una riduzione di un punto percentuale di proteina, controbilanciato dalla corretta supplementazione di aminoacidi, può ridurre l'escrezione di azoto netto di circa il 10%, senza compromettere i parametri produttivi.

Dal punto di vista fisiologico, l'efficienza di utilizzazione del fosforo da parte del suino è relativamente bassa (circa il 25% del totale). Nelle matrici vegetali inoltre, tale elemento è presente sotto forma di fosforo fitinico, ovvero contenuto nella fitina, e il suo utilizzo è strettamente correlato alla presenza delle fitasi, specifici enzimi in grado di idrolizzare tale composto, pertanto assenti nella specie suina. Ciò comporta che gran parte del fosforo somministrato con la dieta viene perso con le urine, contribuendo ad aggravare il fenomeno dell'eutrofizzazione delle acque.

Un'utile soluzione per incrementare l'efficienza di utilizzo del fosforo (+ 30-40%) è rappresentata dall'impiego di enzimi specifici quali le fitasi nella dieta.

Lo spandimento sul terreno dei reflui zootecnici, oltre a squilibri minerali, può causare un accumulo di rame e zinco con successivi rischi di fitotossicità e inquinamento delle falde acquifere.

Tali metalli sono stati largamente utilizzati in passato nell'alimentazione del suino come auxinici, in quanto grazie al loro effetto a livello intestinale erano in grado di ridurre i fenomeni diarroici, principale causa di ritardi di crescita e mortalità nel post-svezzamento, migliorando le performance. Tuttavia, la capacità di assorbimento di tali metalli da parte degli animali è ridotta, ne risulta quindi un accumulo nelle deiezioni.

Per questo motivo, si è provveduto a ridurre la quota di rame e zinco normalmente addizionata ai mangimi per suini nel periodo di accrescimento/ingrasso (25ppm per il rame e 150ppm per lo zinco), nonché a migliorare l'utilizzazione da parte dell'animale della quota presente nelle materie prime di origine animale e vegetale e/o facendo ricorso a oligoelementi a più elevata disponibilità biologica (chelati e simili) (Cevolani, 2016).

4. Prodotti di Origine Animale

4.1. Qualità e caratteristiche nutrizionali della carne

4.1.1. Acqua

L'acqua è il costituente principale del muscolo, rappresenta circa il 75% del totale; in generale tale percentuale tende a diminuire con l'aumentare dell'età dell'animale in relazione alla diminuzione del rapporto muscolo/grasso della carcassa.

La maggior parte dell'acqua è localizzata a livello intracellulare, tuttavia una quantità significativa occupa gli spazi extracellulari (12-15% del volume totale).

Esistono tre tipologie di stati chimico-fisici dell'acqua nella carne:

1. acqua legata (4-10/100g di proteina); comprende l'acqua legata direttamente alle proteine attraverso le interazioni con le catene polari degli amminoacidi.
2. acqua immobilizzata (20-60g/100g di proteina); è rappresentata dalle molecole d'acqua trattenute mediante legami idrogeno stabiliti con le molecole dell'acqua legata.
3. acqua libera (30-60g/100g di proteina) è costituita da acqua trattenuta prevalentemente da forze di tipo superficiale. È la categoria più importante dal punto di vista tecnologico, in quanto tende ad essere perduta durante le fasi di lavorazione. Fattori quali il pH, la concentrazione ed il tipo di proteine, il numero di gruppi polari esposti e la presenza di sali e la temperatura, influenzano l'acqua legata (Martinelli and Cabras, 2004).

4.1.2. Proteine

Le proteine rappresentano il 20% circa della massa muscolare e possono essere suddivise in tre frazioni a seconda delle loro caratteristiche di solubilità (Tabella 17):

1. Proteine dell'apparato contrattile o miofibrillari. Costituiscono il 50-60% delle proteine muscolari totali. A questo gruppo appartengono le proteine contrattili (miosina e actina), responsabili del meccanismo di contrazione muscolare.
2. Proteine sarcoplasmatiche. Costituiscono il 30% delle proteine muscolari. Sono solubili in acqua e sono rappresentate principalmente da enzimi, da proteinasi endogene nonché da citocromi. A questa classe proteica appartiene la mioglobina, molecola responsabile della colorazione rossa della carne.
3. Proteine dello stroma. Esse costituiscono il 10% circa delle proteine muscolari, comprendono il collagene e l'elastina (proteine del tessuto connettivo), nonché altri componenti che determinano l'integrità strutturale del muscolo e ne consentono l'inserzione con l'apparato scheletrico.

Tabella 17. Suddivisione delle proteine di tessuto muscolare (modificato da Martinelli and Cabras, 2004).

Proteine	%
<i>Proteine miofibrillari</i>	60,5
miosina	29,0
actina	13,0
titina	3,7
tropomiosina	3,2
troponina	3,2
$\alpha \beta$ actinine	2,6
miomesina	3,7
desmina	2,1
<i>Proteine del sarcoplasma</i>	29,0
gliceraldeidefosfato deidrogenasi	6,5
aldolasi	33,3
creatina chinasi	2,7
altri enzimi glicolitici	12,0
mioglobina	1,1
emoglobina	3,3
<i>Proteine dello stroma</i>	10,5
collagene	5,2
elastina	0,3
proteine mitocondriali	5,0

Oltre alle proteine, nella carne sono presenti piccole quantità di composti azotati non proteici di diversa natura tra i quali: amminoacidi liberi, dipeptidi (es. carnosina), oligopeptidi, nucleotidi, creatina, creatinina, ammine, urea e ammoniaca, particolarmente importanti per i loro effetti extranutrizionali (cfr paragrafo 4.1.6.).

Risulta importante conoscere la composizione proteica delle carni, tuttavia un dato di maggior interesse è dato dal fabbisogno proteico individuale. Per questo motivo, l'EFSA, l'autorità europea per la sicurezza alimentare, ha pubblicato i quantitativi di assunzione di riferimento per la popolazione (PRI) riferiti alle proteine (Tabella 18). Un PRI indica la quantità di un singolo nutriente di cui un individuo medio necessita per mantenersi in buona salute (EFSA, 2012).

Tabella 18. Fabbisogno proteico individuale (EFSA).

Categoria	Quantitativo
<i>Adulti (compresi gli anziani)</i>	0,83g per kg di peso corporeo al giorno
<i>Lattanti, bambini e adolescenti</i>	0,83g - 1,31g per kg di peso corporeo al giorno
<i>Donne in gravidanza</i>	+ 1/9/28g al giorno rispettivamente per il I, II e III trimestre.
<i>Donne in allattamento</i>	+ 19g al giorno nei primi 6 mesi di allattamento e + 13g al giorno nel periodo successivo

Inoltre, la Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU), all'interno dei LARN - Livelli di assunzione di riferimento per la popolazione italiana 2014, riporta un fabbisogno proteico leggermente inferiore a quanto indicato in precedenza dall'EFSA (Tabella 19).

Tabella 19. Fabbisogno proteico individuale (SINU).

Categoria	Quantitativo
<i>Adulti (compresi gli anziani)</i>	0,71g per kg di peso corporeo al giorno
<i>Lattanti, bambini e adolescenti</i>	0,76g - 1,11g per kg di peso corporeo al giorno
<i>Donne in gravidanza</i>	+ 0,5/7/21g al giorno rispettivamente per il I, II e III trimestre.
<i>Donne in allattamento</i>	+ 17g al giorno nei primi 6 mesi di allattamento e + 11g al giorno nel periodo successivo

Sebbene i quantitativi non coincidano perfettamente (0,83 vs 0,71g/kg x giorno nel caso di individui adulti), le differenze sono irrilevanti; si parla di uno scarto di 0,1g/kg x giorno, che, nel caso di una persona adulta del peso di 80kg, corrisponde a 8g di proteina al giorno.

Come è possibile vedere dalla Tabella 18 e Tabella 19, in alcune circostanze, come nel caso di bambini in crescita, di donne in gravidanza o allattamento, il fabbisogno proteico deve essere necessariamente aumentato. Da non dimenticare inoltre la categoria degli sportivi, in cui i quantitativi proteici giornalieri devono essere calcolati in funzione della frequenza e dell'intensità dell'attività fisica.

Per soddisfare il fabbisogno proteico giornaliero raccomandato, sono disponibili diverse fonti alimentari (carne, uova, latte, pesce e legumi; Grafico 6), caratterizzate da un differente profilo amminoacidico. In tal senso, un ruolo di estrema rilevanza è dato dalla presenza di amminoacidi essenziali e/o limitanti; i primi corrispondono a molecole che il nostro organismo non è in grado di sintetizzare in quantità adeguate e che devono quindi essere introdotte con l'alimentazione; i principali sono metionina, lisina, triptofano, leucina e valina. Una loro carenza compromette la funzionalità del sistema immunitario, aumentando la suscettibilità alle malattie. Tra gli aminoacidi presenti nella carne va sottolineato il contenuto in aminoacidi ramificati che svolgono un ruolo importante nella crescita, in relazione ai loro effetti anabolici, nel

mantenimento di livelli di energia, nonché nella formazione dell'emoglobina. Al contrario, si definiscono limitanti quelle molecole la cui assenza condiziona l'utilizzo di altri aminoacidi per la sintesi di nuove proteine (Dell'Orto and Cheli, 2013).

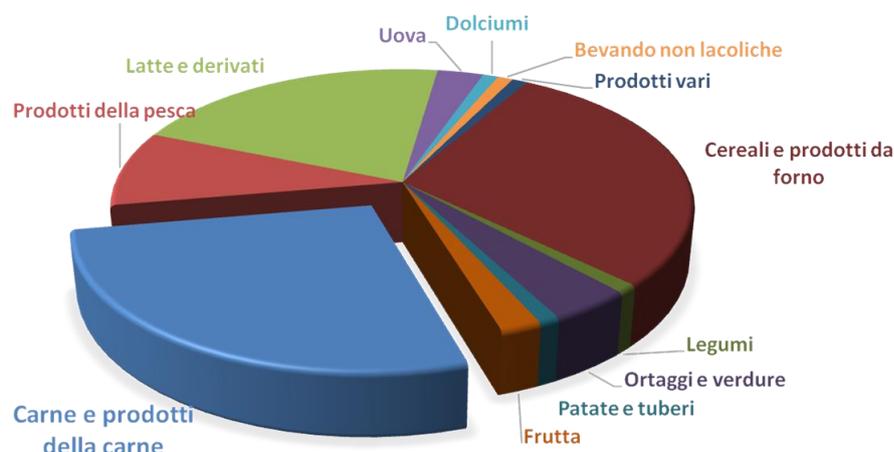


Grafico 6. Suddivisione delle fonti alimentari proteiche.

La presenza di aminoacidi essenziali e/o limitanti negli alimenti ne determina il valore biologico; tanto più il profilo aminoacidico dell'alimento si avvicina a quello della proteina da sintetizzare da parte dell'organismo, tanto più tale nutriente rappresenta un'ottima fonte alimentare. Le proteine di origine animale, in particolare uova e latte, hanno una composizione aminoacidica molto più vicina a quella dell'organismo umano e animale rispetto alle proteine vegetali e questo ne aumenta il loro valore biologico; contrariamente, le fonti proteiche vegetali (legumi e cereali) sono carenti in metionina, lisina e cisteina, come riportato in Tabella 20.

Tabella 20. Digeribilità della frazione proteica (espressa in %) e presenza di aminoacidi limitanti in differenti fonti alimentari calcolati per individui adulti (modificato da EFSA, 2012).

Prodotto	Digeribilità (%)	aa limitanti
<i>Animale</i>		
uova	> 1.0	/
latte e derivati	> 1.0	/
carne e pesce	> 1.0	/
<i>Vegetale</i>		
soia	~ 0.95	Met + Cys
legumi	~ 0.7-0.75	Met + Cys
riso	~ 0.65	Lys
frumento	~ 0.5	Lys
mais	~ 0.5	Lys

Da ciò ne segue che un regime alimentare basato sull'utilizzo di sole fonti vegetali è possibile, ma necessita di opportune integrazioni per evitare importanti carenze aminoacidiche; in

quanto la biodisponibilità totale di un alimento non corrisponde alla somma di tutte le sue componenti, ma è limitata dal nutriente che presenta la concentrazione più bassa.

Questo principio è meglio conosciuto come legge del minimo o della botte di Liebig, inizialmente sviluppato da Carl Sprengel nel 1828 in campo agronomico, è stato poi reso noto da Justus von Liebig applicato in diversi settori (Figura 7).

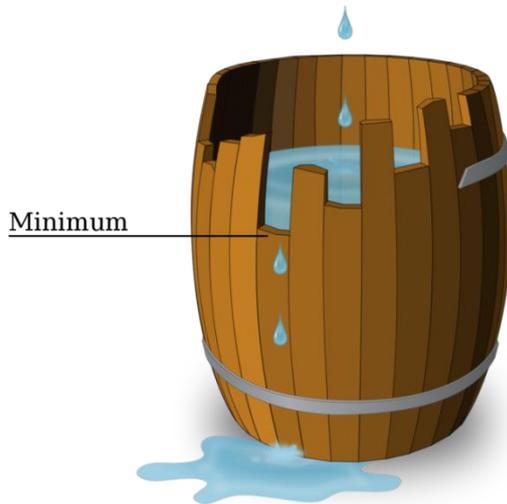


Figura 7. Rappresentazione della legge del minimo o botte di Liebig.

4.1.3. Lipidi

I lipidi presenti nella carne sono un gruppo eterogeneo di composti la cui composizione determina la stabilità ossidativa del muscolo che a sua volta si ripercuote su caratteristiche quali l'aroma e il colore della carne ed è essenziale dal punto di vista nutrizionale.

Il contenuto in lipidi e la composizione in acidi grassi della carne variano in relazione a diversi fattori quali la specie, il tipo di muscolo, l'età dell'animale, il regime alimentare, il tipo di allevamento ecc (Tabella 21). Tuttavia, in generale, il tenore di grasso non supera il 5% del totale nei tagli magri ed è composto per il 42% da grassi saturi, il 43% da monoinsaturi e il rimanente 15% da polinsaturi.

Tabella 21. Composizione in acidi grassi dei lipidi di diverse specie (modificato da Martinelli and Cabras, 2004).

Acidi grassi (%)	Specie		
	Bovino	Agnello	Suino
<i>C12:0</i>	0,08	0,31	0,12
<i>C14:0</i>	2,66	3,30	1,33
<i>C16:0</i>	25,00	22,2	23,2
<i>C18:0</i>	13,4	18,1	12,2
<i>C18:1 9c</i>	36,1	32,5	32,8
<i>C18:2 9c, 12c</i>	2,42	2,70	14,2
<i>C18:3 9c, 12c, 15c</i>	0,70	1,37	0,95
<i>SFA</i>	45,0	53,0	40,0
<i>PUFA</i>	55,0	47,0	60,0

SFA = acidi grassi saturi

PUFA = acidi grassi polinsaturi

Si possono individuare tre tipologie di lipidi:

1. tessuto adiposo; è costituito dai depositi di grasso localizzati sulla superficie del muscolo o a livello addominale e dunque facilmente separabili. La sua presenza nelle carni fresche determina un aumento del contenuto lipidico medio con importanti implicazioni dal punto di vista nutrizionale, in quanto questi grassi sono costituiti prevalentemente da trigliceridi ed acidi grassi saturi.
2. grasso intermuscolare; è localizzato tra i fasci muscolari di una determinata parte anatomica e determina il miglioramento di alcune caratteristiche organolettiche delle carni quali la tenerezza e la succulenza.
3. grasso intramuscolare; rappresenta quantitativamente il grasso meno soggetto a variabilità (1-4%), in quanto costituito prevalentemente da fosfolipidi. Per questa ragione il grasso intramuscolare è spesso caratterizzato da livelli di acidi grassi polinsaturi superiori rispetto alle altre due tipologie di grasso (Martinelli and Cabras, 2004).

A differenza della frazione proteica, che è strettamente legata alla componente genetica dell'animale e quindi poco modificabile con l'alimentazione; è invece possibile intervenire sulla composizione degli acidi grassi presenti della carne agendo sulla composizione della dieta degli animali. In tal senso, la modificazione della qualità dei prodotti di origine animale, nello specifico la carne, attraverso la manipolazione della dieta degli stessi viene riportata nel capitolo 4.3.

4.1.4. Micronutrienti

Il regolare consumo di prodotti di origine animale non consente solamente di soddisfare i fabbisogni proteici dell'organismo, ma rappresenta anche un importante fonte di micronutrienti tra cui ferro, zinco, calcio e fosforo.

Il ferro ha un ruolo cruciale nel mantenimento della salute, in quanto una sua carenza è collegata al malfunzionamento di diversi meccanismi biologici, nonché a disturbi nella crescita.

Il ferro può essere trovato in molti alimenti animali e vegetali, ma in base alla sua biodisponibilità può essere suddiviso in eme e non-eme. Il ferro eme presenta una maggiore percentuale di assorbimento a livello intestinale (15%) rispetto al ferro non-eme (5%). Il ferro-eme è contenuto nell'emoglobina e nella mioglobina, quindi è presente solamente in alimenti di origine animale; in particolare la carne è la migliore fonte di ferro in forma eme e il suo contenuto dipende dall'utilizzo del muscolo da parte dell'animale stesso. La carne e i prodotti della carne consumati all'interno di una dieta sana ed equilibrati possono contribuire fino al 18% del fabbisogno giornaliero di ferro.

L'assimilazione del ferro da parte dell'organismo può anche essere facilitata o inibita dalla presenza di altri componenti negli alimenti. Le proteine della carne ad esempio contribuiscono ad aumentare l'assorbimento di ferro e zinco da altre fonti alimentari. Un studio di Reddy *et al.* (2000) ha calcolato che 1g di carne (20% PG) ha un ruolo enhancer del ferro non emico equivalente a 1 mg di acido ascorbico e ha definito tale fenomeno come "effetto carne". Al contrario, i fitati e alcuni composti fenolici come i flavani polimerizzati sono potenziali inibitori dell'assorbimento del ferro; tali composti si trovano principalmente nelle fonti vegetali, in special modo nei legumi.

4.1.5. Vitamine

I prodotti di origine animale presentano anche importanti livelli di vitamine, sia quelle idrosolubili, in particolare il gruppo B (1, 2, 3, 6 e 12), sia quelle liposolubili (A, D, E e K), particolarmente presenti nelle frattaglie (fegato, reni ecc.) e nei tagli grassi (Tabella 22).

Tabella 22. Contenuto in vitamine, espresse in 100gr di carne fresca, di differenti specie (modificato da Martinelli and Cabras, 2004).

Vitamine	Vitello	Vitellone	Suino	Ovino
<i>A (U.I.)</i>	tracce	tracce	tracce	tracce
<i>Tiamina (mg)</i>	0,10	0,07	1,00	0,15
<i>Riboflavina (mg)</i>	0,25	0,20	0,20	0,25
<i>Niacina (mg)</i>	7,00	5,00	5,00	5,00
<i>Acido pantotenico (mg)</i>	0,60	0,40	0,60	0,50
<i>Biotina (μg)</i>	5,00	3,00	4,00	3,00
<i>Acido folico (μg)</i>	5,00	10,00	3,00	3,00
<i>B₆ (mg)</i>	0,30	0,30	0,50	0,40
<i>B₁₂ (μg)</i>	0,00	2,00	2,00	2,00
<i>C (mg)</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>D (U.I.)</i>	tracce	tracce	tracce	tracce

4.1.6. Peptidi bioattivi

I peptidi bioattivi sono costituiti da piccole sequenze amminoacidiche (2-20 aa), già presenti all'interno della struttura proteica dell'alimento o generate in seguito alla digestione dello stesso, che esercitano un'attività biologica sull'organismo, oltre al semplice valore nutrizionale (Vermeirssen *et al.*, 2007).

All'interno della sequenza proteica nativa, tali composti sono in forma inattiva; il processo di digestione gastrico e il successivo assorbimento da parte della parete intestinale consentono di liberare ed attivare tali peptidi, che possono agire direttamente sul tratto gastro-enterico con un effetto locale, oppure entrare nel circolo sistemico (Ryan *et al.*, 2011).

Da tempo sono note le sostanze bioattive contenute negli alimenti vegetali (ad esempio i polifenoli nel tè verde o il licopene nei pomodori), ma anche i prodotti di origine animale (carne, latte e pesce) rappresentano una fonte importante di peptidi bioattivi molto studiati per la loro azione antipertensiva, antiossidante, antimicrobica e anti proliferativa (Kim *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2008; Cinq-Mars *et al.*, 2008).

4.1.6.1. Lattoferrina

Per il suo significato fisiologico il latte in primis può essere considerato "alimento funzionale", in quanto non solo fornisce principi essenziali per la crescita e lo sviluppo durante la vita neonatale e la prima infanzia, ma rappresenta anche una fonte di molecole bioattive, con proprietà immunologiche, antinfettive essenziali per lo sviluppo del neonato (Dell'Orto, 2009).

Fra le componenti native del latte, di particolare rilievo e interesse sono alcune ascrivibili alla frazione proteica e lipidica; e l'importanza di questi composti è data non solo dal loro contenuto ma anche dalla loro bioaccessibilità e biodisponibilità (Baldi and Pinotti, 2008).

Le proteine del latte, in particolar modo le sieroproteine, svolgono numerose funzioni extranutrizionali, come riportato in Tabella 23. Tra queste, particolare interesse riveste la lattoferrina, proteina multifunzionale coinvolta nei meccanismi di difesa immunitaria aspecifica e nella modulazione dello sviluppo gastroenterico e della microflora intestinale (Baldi *et al.*, 2005).

Tabella 23. Funzioni biologiche delle principali proteine del latte (modificato da Séverin and Wenshi, 2005).

Proteine	Funzioni
Caseine (α , β , k caseina)	carrier di ioni (Ca, P, Fe, Zn, Cu), precursori di peptidi bioattivi
<i>Sieroproteine</i>	
β -lattoglobulina	carrier del retinolo, legante acidi grassi, antiossidante
α -lattoalbumina	sintesi del lattosio, carrier di Ca, immunomodulatore, anticarcinogeno
immunoglobuline (A, M, G)	immunoprotezione
lattoferrina	antimicrobico, antiossidante, immunomodulatore, assorbimento di Fe, anticarcinogeno
lattoperossidasi	antimicrobico
lisozima	antimicrobico, azione sinergica con immunoglobuline e lattoferrina
glicomacropetide	antivirale, bifidogenico

4.1.6.2. Coniugati dell'acido Linoleico (CLA)

Il termine CLA si riferisce ad un gruppo di isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico C18:2 9c, 12c, caratterizzati dalla presenza di due doppi legami coniugati. Tali legami si possono trovare nelle posizioni che vanno da 7,9 a 12,14 e per ogni isomero posizionale sono possibili 4 paia di isomeri geometrici (cis,cis; trans,cis; cis,trans; trans,trans); di conseguenza il termine CLA include un totale di 24 isomeri (Cruz-Hernandes *et al.*, 2004).

In natura gli isomeri più abbondanti sono il 9c, 11t detto anche acido rumenico (RA) e il 10t, 12c molto studiati per le diverse attività biologiche. Le principali risorse alimentari del CLA sono il latte e suoi derivati, e le carni dei ruminanti, dove l'acido rumenico rappresenta circa il 90% dei CLA totali; al contrario, nei prodotti vegetali tale isomero è presente in quantità limitate.

In particolare i CLA si trovano nella componente lipidica dei prodotti di origine animale, quindi sono presenti nel grasso della carne e del latte. Il contenuto di CLA nelle carni dipende dalla razza, dal taglio della carne e soprattutto dall'alimentazione, in particolare dall'assunzione di

foraggi freschi. La carne di agnello presenta concentrazioni più elevate (4,3–19mg/g grasso), valori inferiori sono riscontrati nella carne bovina (1,2-10mg/g di grasso), infine, carne bianche (maiale e avicoli) contengono valori inferiori a 1mg CLA/g di grasso.

Nel 2001, Pariza *et al.*, mediante studi in vivo, hanno osservato che il CLA 9c, 11t agisce come promotore di crescita senza modificare la composizione corporea. Al contrario, l'isomero 10t, 12c, modifica la massa corporea, inducendo l'aumento della massa magra e riducendo la massa grassa. Tale isomero impedirebbe l'introduzione dei lipidi nelle cellule degli adipociti interferendo con l'attività degli enzimi lipoproteinlipasi e stearoil CoA-desaturasi. In quest'ultimo caso, oltre all'inibizione diretta dell'enzima impedirebbe anche la trascrizione del gene. Gli stessi autori riportano un'azione ipocolesterolemica dei due isomeri più importanti (9c, 11t e 10t, 12c); in seguito alla somministrazione di diete arricchite con CLA, si osserva una diminuzione del colesterolo e delle LDL plasmatici e il conseguente decremento della formazione di placche ateromatose.

Oltre agli effetti benefici riportati in medicina umana, diversi studi sono stati condotti sulla supplementazione di CLA nella specie suina. Bontempo *et al.* (2004) hanno osservato un significativo incremento delle IgG nel colostro in seguito a somministrazione di CLA (0,5%) (Tabella 24). Inoltre, tale integrazione ha influenzato la composizione acidica della componente lipidica del colostro, in particolare con un aumento degli acidi eicosenoico e eicosatrienoico e una riduzione degli acidi palmitoleico e γ -linolenico. Gli autori hanno riportato che la somministrazione di CLA alle scrofe ha prodotto un aumento significativo dei livelli sierici di lisozima e di IgG (circa 1,5 volte superiori rispetto al controllo, Tabella 25-) sia nelle scrofe che nei suinetti.

Tabella 24. Effetto della somministrazione di CLA (0,5%) sui livelli di IgG nel colostro e sulle variabili immunogeniche nel siero di scrofe (Bontempo *et al.*, 2004).

Item	Giorni di lattazione				p-value
	0	2	10	20	
<i>IgG colostro (g/l)</i>					
Controllo	33,59	/	/	/	0,013
Trattamento	49,44	/	/	/	
<i>IgG siero (g/l)</i>					
Controllo	/	10,78	14,98	17,41	0,005
Trattamento	/	20,85	21,33	25,06	
<i>Lisozima siero (mg/l)</i>					
Controllo	/	0,996	1,398	1,462	0,025
Trattamento	/	1,866	2,013	2,256	

Tabella 25. Effetto della somministrazione di CLA alle scrofe sulle variabili immunologiche nel siero dei suinetti (Bontempo et al., 2004).

Item	Giorni di lattazione			p-value
	2	10	20	
<i>IgG siero (g/l)</i>				
Controllo	22,92	12,28	9,8	0,001
Trattamento	29,40	20,86	16,22	
<i>Lisozima siero (mg/l)</i>				
Controllo	0,47	0,50	1,29	0,001
Trattamento	0,65	0,71	2,19	

4.1.6.3. Creatina

La creatina rappresenta un composto intermedio del metabolismo energetico sintetizzato dalla contrazione muscolare. La creatina presenta una sintesi endogena, tuttavia i prodotti di origine animale costituiscono un'ottima fonte; la carne di manzo contiene circa 260-400mg di creatina per 100g di carne fresca, la carne di agnello circa 280-510mg infine la carne di maiale tra 250 e 370mg. Nel pesce la quantità di creatina può variare tra 200 e 1000mg/100g a seconda della specie considerata. La creatina agisce come riserva energetica in caso di affaticamento o sforzo muscolare prolungato e promuove inoltre la rigenerazione tissutale (Baird et al., 2012).

4.1.6.4. Carnosina

Questa sostanza è un dipeptide, composta da alanina e istidina, e viene comunemente sintetizzata dal muscolo, come facilmente deducibile dal nome. L'organismo umano presenta una via di sintesi endogena, ma consumando prodotti di origine animale, specialmente carne, è possibile aumentare i livelli di carnosina. Il contenuto di questo peptide varia in base al muscolo considerato e alla specie animale considerati, tuttavia i valori sono compresi tra 200 e 500mg per 100g.

La carnosina agisce a livello muscolare come tampone del pH e antiossidante. L'aggiunta di carnosina nei prodotti a base di carne inibisce l'ossidazione del grasso e la formazione della mioglobina, migliorando il colore e il gusto durante la shelf life. Inoltre, grazie al suo effetto antiossidante, la carnosina è spesso commercializzata come sostanza anti-aging (Sanchez-Escalante et al., 2001).

4.1.6.5. Taurina

La taurina è un amminoacido sulfonico sintetizzato per via endogena nell'uomo e presente unicamente negli alimenti di origine animale. La carne e il pesce contengono quantità elevate che variano tra 18 e 306mg/100g in base alla specie o alla parte anatomica considerata. La taurina è implicata nello sviluppo della retina, nella modulazione della sedimentazione del

livello del calcio ed è un importante componente della funzione degli acidi biliari (Purchas *et al.*, 2004; Pasantés-Morales *et al.*, 2002).

4.1.6.6. Coenzima Q10

Questo composto è presente nella maggior parte dei cibi, ma la sua biodisponibilità è minima (10%). La maggiore concentrazione si trova nella carne e nel pesce (1,4-4,6mg/100g), tuttavia con la cottura si osserva una riduzione tra il 15 e il 32%.

Il coenzima Q10 è un antiossidante molto efficace, impedisce l'ossidazione dei grassi, delle proteine e del DNA nell'organismo umano. Assume inoltre un ruolo importante nella rigenerazione di altri antiossidanti come per esempio la vitamina E; influisce positivamente sul processo d'invecchiamento (Littarru and Tiano, 2007).

4.2. Controlli ufficiali/sicurezza

La normativa nazionale e comunitaria stabilisce azioni di controllo per verificare la presenza di sostanze indesiderate negli alimenti. In particolare, ogni Stato membro deve annualmente eseguire il Piano Nazionale per la ricerca dei Residui (PNR), un programma articolato che ha lo scopo di sorvegliare e monitorare la presenza di residui di sostanze di uso zootecnico, sia illecite sia autorizzate, e di contaminanti ambientali negli animali vivi e negli alimenti che da essi hanno origine.

Il PNR consiste in una serie di campionamenti predisposti a livello nazionale adattati alla realtà regionale ed effettuati dalle ASL di competenza, sia negli allevamenti (produzione primaria) che negli stabilimenti di prima trasformazione (macelli o i centri di raccolta del latte). Le analisi effettuate per svelare la presenza di sostanze illecite sono effettuate dai laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS).

Le sostanze da ricercare rientrano in due categorie:

- La categoria A: comprende le sostanze ad effetto anabolizzante e le sostanze non autorizzate per il trattamento degli animali da reddito. A questa categoria appartengono quindi sostanze che vengono utilizzate in modo fraudolento, ad esempio per gli effetti anabolizzanti che inducono un incremento ponderale dell'animale trattato.
- La categoria B: comprende i medicinali veterinari, per i quali l'Unione europea definisce un limite massimo di residuo (LMR) che non può essere superato nei prodotti destinati al consumo, ed i contaminanti ambientali come i metalli pesanti.

Nel caso sia rilevata la somministrazione di sostanze vietate o il tenore di residui di sostanze autorizzate o di contaminanti ambientali sia superiore ai limiti stabiliti, vengono attuati interventi a tutela del consumatore quali ad esempio il richiamo dei prodotti pericolosi,

l'applicazione di sanzioni di tipo amministrativo e penale, la conduzione di indagini epidemiologiche per stabilire le responsabilità e scoprire eventuali ulteriori trattamenti.

Nel 2014, l'attuazione del PNR ha portato ad analizzare 40.806 campioni, di cui 16.276 per la ricerca di residui di sostanze appartenenti alla categoria A (pari al 39,9% del totale delle analisi) e 24.530 per la ricerca di residui di sostanze appartenenti alla categoria B (pari al 60,1%).

I campioni che hanno fornito risultati irregolari per la presenza di residui sono stati complessivamente 44, pari allo 0,11% del totale di quelli analizzati. Di questi, 15 sono risultati non conformi per la presenza di residui appartenenti alla categoria A (34,1%) e 29 per il riscontro di residui di sostanze della categoria B (65,9%) (Carnisostenibili.it, 2017).

4.3. Ruolo della nutrizione sulla qualità dei prodotti di origine animale

Come precedentemente riportato nel capitolo 4.1.3., relativo alla qualità dei prodotti di origine animale, è possibile modificare il profilo nutrizionale degli stessi, con specifico riferimento alla carne, attraverso l'alimentazione.

A differenza della frazione proteica che è maggiormente legata alla componente genetica dell'animale e quindi poco modificabile con l'alimentazione; è invece possibile intervenire sulla composizione degli acidi grassi presenti nella carne agendo sulla composizione della. Ad esempio, studi condotti nella specie suina e bovina hanno dimostrato che è possibile modificare il rapporto $\omega 6$: $\omega 3$ della frazione lipidica delle carni somministrando agli animali semi di lino (5% SS), fonte di acido linoleico appartenente alla serie $\omega 3$ (Corino *et al.*, 2008; Musella *et al.*, 2009; Alberti *et al.*, 2014).

Oltre alla concentrazione delle singole frazioni lipidiche nella carne, è molto importante il rapporto tra acidi grassi polinsaturi (PUFA) e saturi (SFA); in quanto un'eccessiva concentrazione di SFA rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari (Barton *et al.*, 2007). Tale rapporto assume un valore di circa 0,11 nella carne di manzo e 0,15 nella carne d'agnello, ed è quindi inferiore al rapporto di 0,4, considerato ottimale dai nutrizionisti (Scollan *et al.*, 2006).

E' stato dimostrato che aumentando il rapporto PUFA: SFA della dieta, si può ottenere una riduzione del colesterolo plasmatico totale; in tal senso, diversi studi sono stati rivolti al miglioramento di questo rapporto nella carne (Scollan *et al.*, 2001).

Agendo sulla composizione della dieta, è possibile modificare il rapporto PUFA: SFA nella carne, a favore della frazione insatura, con interessanti ricadute da punto di vista nutrizionale. In tal senso, l'aggiunta di semi di girasole o semi di cotone, fonti di acido linoleico, alla dieta di bovini da carne consentirebbe di incrementare la concentrazione di PUFA sia nella carne che nel grasso degli stessi (Polviset *et al.*, 2015).

Un recente studio condotto da Barahona *et al.* (2016) ha dimostrato come l'integrazione di semi di lino (10% SS) in bovini da carne sia in grado di aumentare in maniera significativa il tenore di acidi grassi polinsaturi ω 3 a livello intramuscolare; da ciò ne consegue non solo un miglioramento del profilo acidico della carne, ma anche delle caratteristiche organolettiche della stessa. Gli autori hanno infatti riportato una correlazione positiva tra il tasso di inclusione dei semi di lino e la tenerezza della carne, previa cottura, dovuta ad una maggiore infiltrazione di grasso tra le fibre muscolari.

Tra gli acidi grassi polinsaturi, crescenti sono le evidenze che indicano un ruolo importante dei ω -3 PUFA sullo sviluppo del feto e sullo sviluppo e il mantenimento delle funzioni cognitive (Karr *et al.*, 2011). L'apporto in ω -3 PUFA della carne è sicuramente inferiore rispetto ad altre fonti, quali il pesce e gli oli di pesce. Tuttavia, la possibilità di maggiore assunzione di catena lunga ω -3 da oli di pesce e pesce appare limitato sia a causa di un basso consumo di questo alimento sia per garantire la futura sostenibilità di questa fonte alimentare (Dell'Orto and Cheli, 2013).

Va infine ricordato come la carne dei ruminanti rappresenti anche una fonte quasi unica di coniugati dell'acido linoleico (CLA). Per alcuni isomeri dei CLA, sono sempre maggiori le evidenze di un loro ruolo funzionale sulla salute umana (attività antitumorale, antiterogena, antiobesità) (De la Torre *et al.*, 2006).

5. Nutrizione umana

5.1. Consumi POA

La classifica Ismea 2016 degli maggiori consumatori europei di carne, vede in testa i danesi con 109,8kg annui pro-capite seguiti da Portogallo (101kg), Spagna (99,5kg), Francia (85,8kg), Germania (86,0kg) ed infine l'Italia con 79 chilogrammi pro-capite.

Il consumo medio annuo in Italia di carne (comprensivo di pollo, suino, bovino e ovino) è infatti il più basso d'Europa; in particolare, la più consumata resta la carne di maiale (37kg pro-capite per anno), seguita da quella bovina (21kg) e infine da quella avicola (19kg). Le carni ovine rappresentano invece una quota marginale perlopiù legate a particolari occasioni o aree geografiche.

I consumi hanno mostrato un trend in diminuzione rispetto al precedente anno (- 4,4%), dovuto sia agli effetti della crisi economica, sia ad un consumo più consapevole e morigerato; di particolare rilevanza, il calo della carne bovina (- 5%), in parte sostituita con carni bianche, quali coniglio (+ 3%) e pollame (+ 1,1%) (Grafico 7).

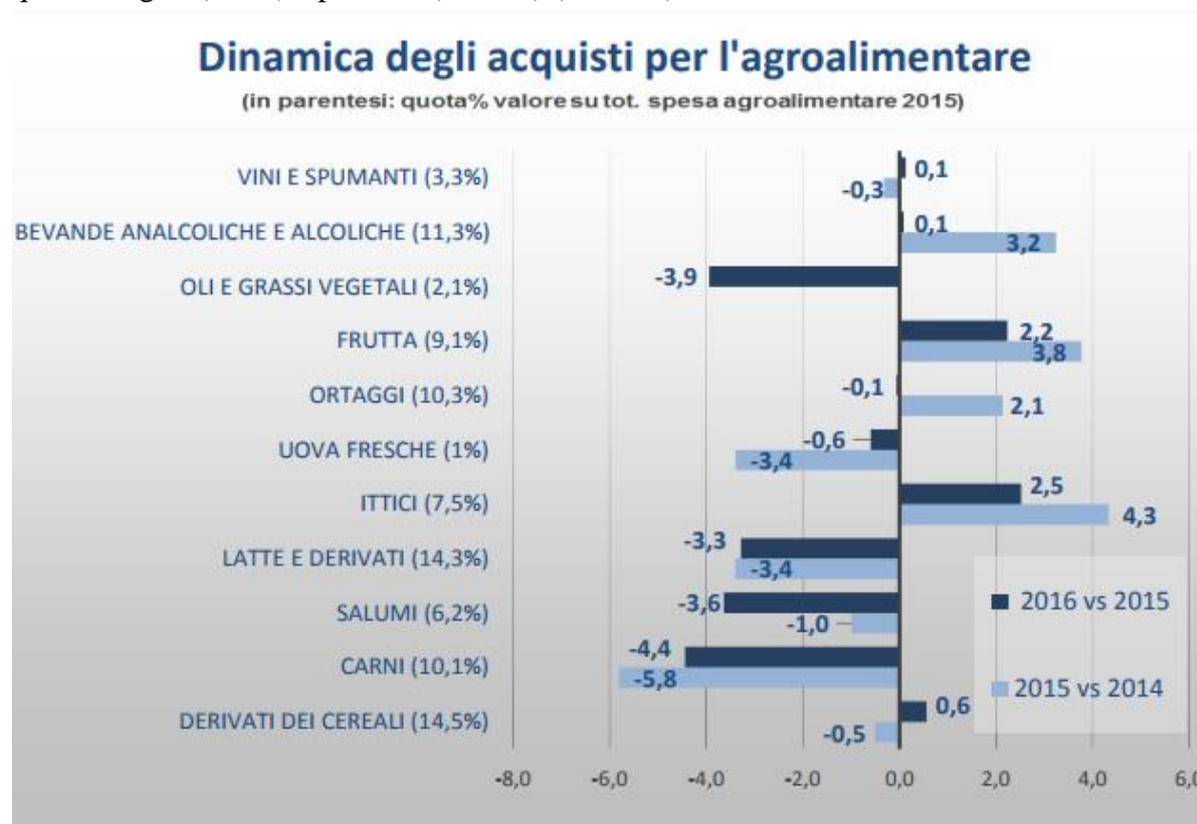


Grafico 7. Dinamica degli acquisti per l'agroalimentare (Ismea-Nielsen, 2017).

Va comunque sottolineato che in Italia il consumo di carne e salumi è molto al di sotto, circa la metà, dei quantitativi individuati come potenzialmente rischiosi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (400-500gr/settimana).

Grazie alla dieta mediterranea equilibrata, varia e sostenibile, gli italiani sono il secondo popolo più longevo al mondo. In aggiunta, la qualità delle carni consumate è ben diversa dalle produzioni Nord europee; gli allevamenti italiani producono carni più magre e di migliore qualità rispetto a quella degli allevamenti di altri paesi (Assocarni).

5.2. Dieta mediterranea

“La Dieta Mediterranea è molto più che un semplice alimento. Essa promuove l'interazione sociale, poiché il pasto in comune è alla base dei costumi sociali e delle festività condivise da una data comunità, e ha dato luogo a un notevole corpus di conoscenze, canzoni, massime, racconti e leggende. La Dieta si fonda nel rispetto per il territorio e la biodiversità, e garantisce la conservazione e lo sviluppo delle attività tradizionali e dei mestieri collegati alla pesca e all'agricoltura nelle comunità del Mediterraneo”.

È con queste motivazioni che nel novembre 2010 la Dieta Mediterranea è stata riconosciuta dall'UNESCO Patrimonio Culturale Immateriale dell'Umanità (Figura 8). Un patrimonio che riunisce le abitudini alimentari consolidate nel corso dei secoli da parte dei popoli del bacino del Mediterraneo (Italia, Spagna, Grecia, Marocco, Portogallo, Croazia e Cipro) e che va ben oltre una semplice lista di alimenti.



Figura 8. Schema della suddivisione degli alimenti secondo la Dieta Mediterranea.

Come suggerisce l'etimologia della parola (dal greco *diaita*), la Dieta Mediterranea rappresenta uno stile di vita; in tal senso, il "mangiare insieme" non significa semplicemente consumare un pasto, ma vuol dire coltivare e rafforzare le relazioni interpersonali, promuovere il dialogo e la creatività, tramandare l'identità ed i valori delle comunità.

Pane, pasta, verdure, legumi, frutta fresca e secca, ma anche carni bianche e rosse, pesce, latticini, uova, olio d'oliva e vino sono gli alimenti alla base della Dieta Mediterranea. Un modello alimentare sano ed equilibrato fondato prevalentemente su cibi di origine vegetale e sul loro consumo diversificato e bilanciato.

Dietologi, medici e nutrizionisti hanno elaborato la piramide alimentare, che si basa sulla divisione degli alimenti secondo la loro appartenenza ai diversi gruppi di nutrienti e sulla loro ripartizione secondo un criterio quantitativo che considera le porzioni giornaliere raccomandate. Alla base della piramide si trovano i cibi che costituiscono il fondamento della dieta da consumare quotidianamente, fino ad arrivare al vertice, dove ci sono gli alimenti da assumere con moderazione e solo in occasioni speciali (Figura 9).

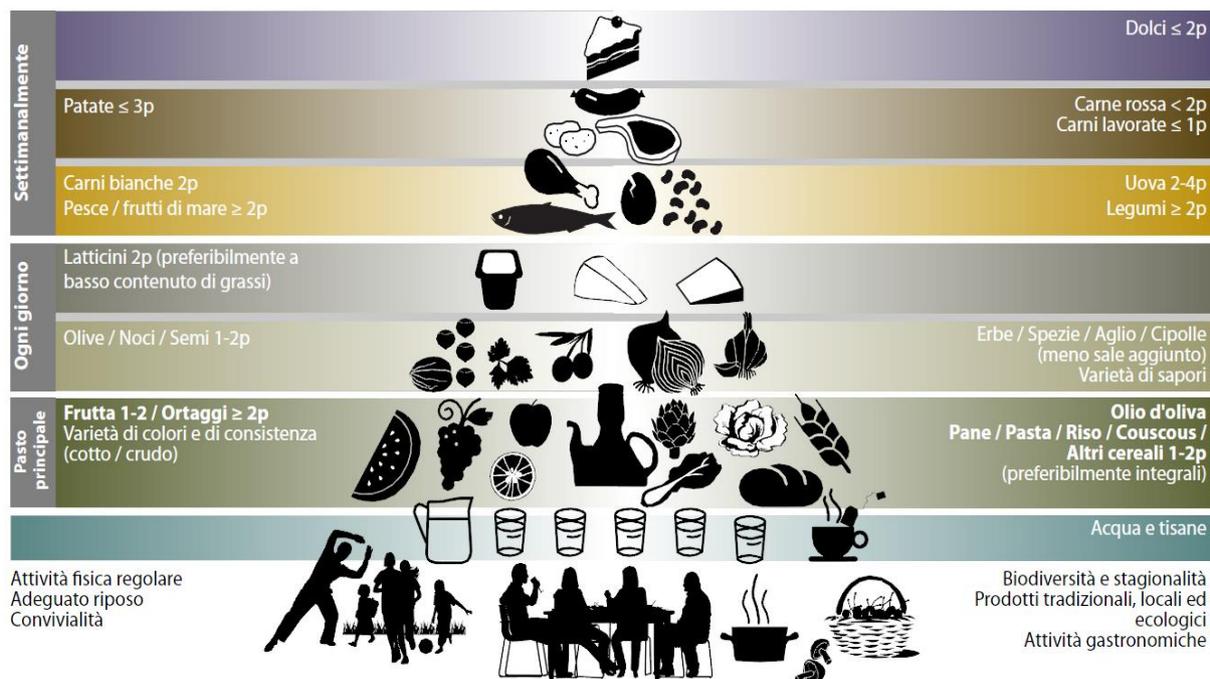


Figura 9. Nuova piramide alimentare

In dettaglio, ai piedi della piramide alimentare si trovano i prodotti di origine vegetale, che devono essere consumati spesso e in grandi quantità, dunque i cereali (pasta, pane, riso, cuscus o altro, preferibilmente integrali) seguiti da frutta e verdura (sia cruda che cotta), ricche di antiossidanti, fibre, vitamine e sali minerali.

I pasti devono essere inoltre accompagnati da un importante consumo di acqua (1,5-2 litri al giorno) per garantire un'adeguata idratazione nonché il corretto funzionamento dell'organismo.

Per quanto riguarda i condimenti, non deve mancare l'olio d'oliva, fonte fondamentale di lipidi soprattutto nella sua variante extra-vergine, consigliato sia come condimento a crudo sia per cucinare.

Salendo la piramide si trovano gli alimenti da consumare giornalmente: i prodotti caseari magri come yogurt e formaggi (ricchi di grassi insaturi), spezie ed erbe aromatiche (per evitare un eccessivo utilizzo di sale). Infine, è concessa una moderata assunzione di vino e bevande fermentate (un bicchiere per le donne e due bicchieri per gli uomini al giorno, possibilmente durante i pasti).

Un gradino più in alto, nel livello intermedio troviamo carni bianche (due porzioni), rosse (meno di due porzioni, se possibile magre) e lavorate (meno di una porzione), pesce (due o più porzioni), uova (da due a quattro porzioni) ed infine i legumi (più di due porzioni).

Dunque, all'apice della piramide, e quindi tra gli alimenti che devono essere assunti soltanto occasionalmente, ci sono quelli caratterizzati da un rilevante apporto di zuccheri e grassi saturi, come i dolci, le caramelle, i succhi di frutta zuccherati e gli analcolici, che dovrebbero essere assunti in piccole quantità e solamente in occasioni speciali.

I cibi, e le rispettive quantità da assumere, non esauriscono però la piramide alimentare della Dieta Mediterranea, la cui vera rivoluzione è comprendere al suo interno elementi sociali. Alle indicazioni nutrizionali vanno aggiunti perciò altri elementi per godere appieno dei benefici della Dieta Mediterranea; questi fattori sono rappresentati alla base come pilastri della piramide e sono la socializzazione e la condivisione della tavola, l'utilizzo di ingredienti stagionali ed il più possibile sostenibili e l'attività fisica, da compiere regolarmente (MedDiet).

5.2.1. Effetti benefici

Numerosi studi scientifici hanno dimostrato inoltre che la Dieta Mediterranea è una dieta salutare che aiuta a prevenire le principali malattie croniche come le patologie cardiovascolari, il diabete, la bulimia e l'obesità e rappresenta anche un importante strumento nella prevenzione dei tumori.

Specifiche sostanze nutritive degli alimenti o micronutrienti caratteristici della Dieta Mediterranea possono svolgere un ruolo nella prevenzione del cancro al seno; infatti l'assunzione di alimenti contenenti fitosteroli, vitamine C ed E, betacarotene e calcio può esercitare un'azione protettiva (Toledo *et al.*, 2015). Le sostanze come l'acido ascorbico, i carotenoidi e altre vitamine antiossidanti sono infatti inversamente correlate allo sviluppo del cancro gastrico e neoplasie dell'apparato digerente superiore e delle vie respiratorie (Stojanovic *et al.*, 2017; Sorli-Aguilar *et al.*, 2015).

Lo studio PREDIMED, un'indagine internazionale che ha coinvolto 7500 pazienti con lo scopo di valutare gli effetti della Dieta Mediterranea sulla prevenzione primaria delle malattie

cardiovascolari, ha dimostrato per la prima volta che il modello alimentare mediterraneo protegge dalle malattie cardiovascolari e ha confermato inoltre che riduce i fattori di rischio cardiovascolare classici ed emergenti (fig patologie cardiovascolari + mortalità) (Estruch *et al.*, 2013).

In particolare, in questo studio sono state messe a confronto una dieta di controllo con due regimi alimentari basati sul modello della Dieta Mediterranea che prevedevano l'assunzione di 30gr di frutta secca al giorno (15gr noci, 7,5gr nocciole e 7,5gr mandorle) e 1l alla settimana di olio EVO. Nel Grafico 8 si nota chiaramente un effetto protettivo nei confronti dell'insorgenza di patologie cardiovascolari da parte delle diete fondate sul modello Mediterraneo rispetto a controllo. Lo stesso risultato, seppur con differenze meno marcate, si può osservare relativamente all'associazione tra alimentazione e mortalità totale.

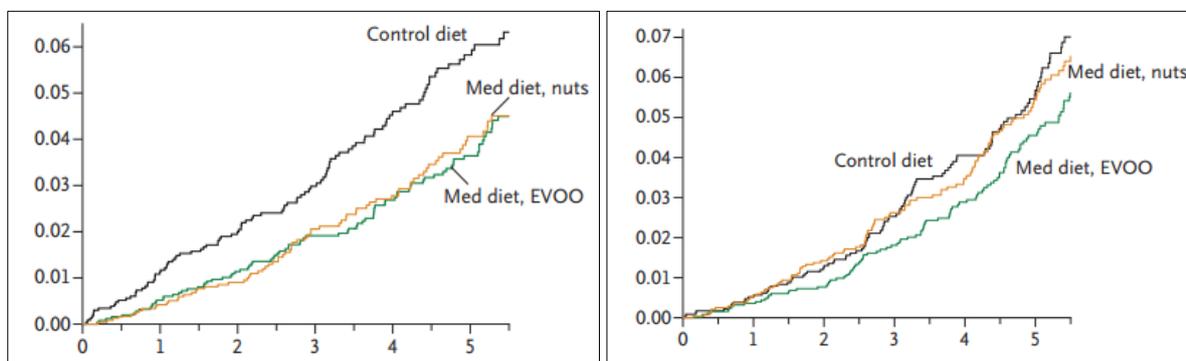


Grafico 8. Risultati dello studio PREDIMED. A sinistra, la relazione tra l'aderenza ai due modelli di Dieta Mediterranea e la protezione nei confronti delle patologie cardiovascolari, a destra, la relazione con la mortalità totale (modificato da Estruch *et al.*, 2013).

Altri effetti potenzialmente benefici della Dieta Mediterranea riguardano una maggior difesa contro le malattie neurodegenerative e la conservazione delle funzioni cognitive, una ridotta infiammazione, il miglioramento della sensibilità all'insulina ed un possibile ruolo nella prevenzione della demenza e della malattia di Alzheimer (Poli, 2013).

Negli ultimi anni, alcuni autori hanno indicato che l'aderenza al modello alimentare mediterraneo riduce l'incidenza di insorgenza del diabete ed i principali composti protettivi sono rappresentati da fibre e grassi vegetali come l'olio di oliva; in particolare, questa protezione è garantita dal consumo di olio di oliva extra vergine per condire e cucinare gli alimenti. Sembrerebbe infatti che le diete ricche di grassi monoinsaturi, come la Dieta Mediterranea, migliorino la sensibilità all'insulina (Georgoulis *et al.*, 2014).

5.3. Studio EPIC e classificazione IARC

Lo studio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), coordinato dalla Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) di Lione e con il supporto finanziario del Programma Europe Against Cancer della Commissione Europea, è stato uno dei più grandi studi di coorte mai realizzato su scala mondiale, in cui più di mezzo milione di pazienti (521.457 in totale) di età compresa tra i 35 ed i 70 anni, selezionati in 23 centri situati in 10 differenti paesi europei, sono stati monitorati per circa 15 anni al fine di studiare con precisione le possibili relazioni tra la dieta, lo status nutrizionale, lo stile di vita ed i fattori ambientali con l'incidenza di forme neoplastiche e altre patologie di natura cronica.

Tra gli alimenti sotto indagine, gli autori hanno riportato un'associazione consistente tra il consumo di carne processata e il tasso di mortalità totale, associazione pertanto non riscontrata nel caso della carne rossa (Grafico 9). Tale risultato può essere spiegato analizzando gli alimenti stessi; la carne processata contiene una concentrazione di acidi grassi saturi e colesterolo, entrambi fattori di rischio per l'insorgenza di patologie cardiovascolari, superiore alla carne rossa, dalla quale la maggior parte del grasso può essere rimossa prima del consumo.

In aggiunta, la carne processata, come suggerisce il nome, è stata sottoposta a trattamenti come la salatura, la marinatura o l'affumicatura al fine di aumentare la conservabilità e migliorarne le caratteristiche qualitative come il colore e il sapore. Tutti questi processi tecnologici tuttavia portano ad un aumento della concentrazione di composti ad azione cancerogena (amine e idrocarburi policiclici aromatici, nitriti e nitrosamine) nel prodotto con il conseguente accumulo nell'organismo ed un aumento del rischio di insorgenza di forme tumorali, in particolar modo a carico del basso intestino (Rohrmann *et al.*, 2013).

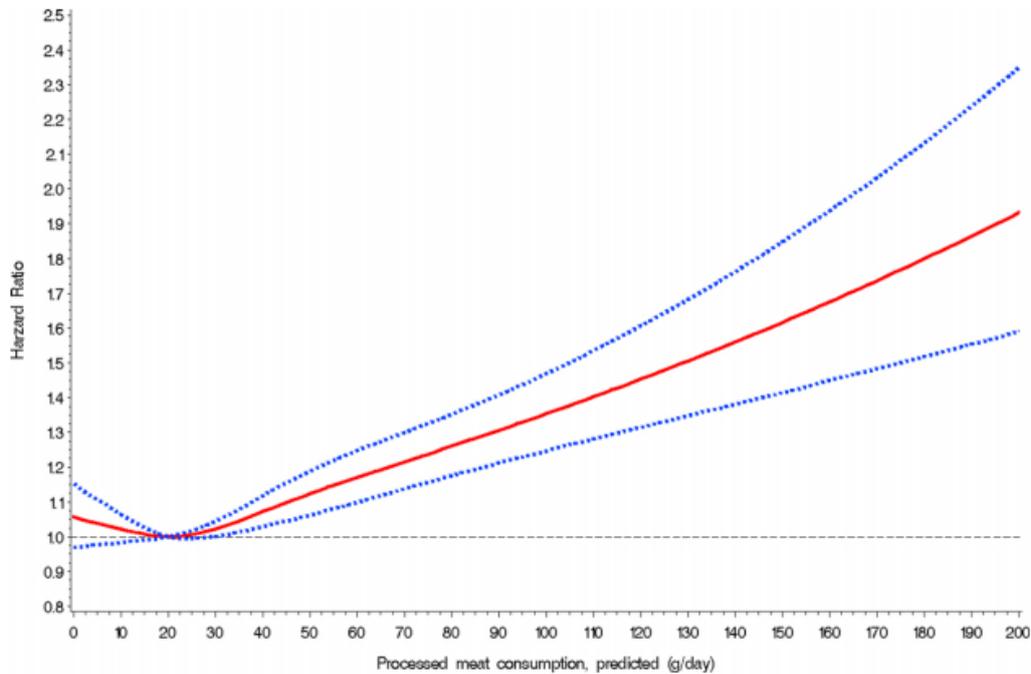


Grafico 9. Curva di regressione non parametrica sulla relazione tra il consumo di carne processata e le cause di mortalità (modificato da Rohrmann et al., 2013).

Tabella 26. Associazione tra il consumo di carne rosso, processata e avicola con ogni causa di mortalità (Rohrmann et al., 2013).

Intake (g/d)	Mean (s.e.) intake ^a (24 hour recall; g/d)		N _{cases}	HR ^b	95% CI ^b	HR ^c	95% CI ^c	HR ^d	95% CI ^d
	Men	Women							
Red meat									
0 to 9.9	20.3 (2.0)	20.5 (1.0)	3175	1.05	(0.99, 1.10)	1.07	(1.01, 1.13)	1.04	(0.99, 1.10)
10 to 19.9	35.5 (2.0)	25.9 (0.9)	2774	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)
20 to 39.9	47.9 (1.5)	33.1 (0.7)	6459	1.02	(0.98, 1.07)	1.01	(0.97, 1.06)	1.01	(0.97, 1.06)
40 to 79.9	62.3 (1.4)	44.8 (0.8)	8935	1.04	(0.99, 1.09)	0.99	(0.94, 1.03)	0.99	(0.94, 1.03)
80 to 159.9	81.0 (2.0)	55.9 (1.5)	4639	1.15	(1.09, 1.21)	1.03	(0.98, 1.09)	1.03	(0.97, 1.08)
160+	110.8 (7.7)	70.9 (10.8)	362	1.37	(1.23, 1.54)	1.14	(1.01, 1.28)	1.10	(0.98, 1.24)
Processed meat									
0 to 9.9	14.9 (0.9)	14.3 (0.5)	6236	1.00	(0.96, 1.04)	1.04	(0.99, 1.08)	1.01	(0.97, 1.06)
10 to 19.9	37.5 (1.5)	26.9 (0.6)	4683	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)
20 to 39.9	51.1 (1.2)	36.1 (0.6)	7301	1.06	(1.03, 1.11)	1.03	(0.99, 1.07)	1.03	(0.99, 1.07)
40 to 79.9	71.6 (1.4)	46.6 (0.9)	5997	1.17	(1.12, 1.22)	1.09	(1.05, 1.14)	1.09	(1.04, 1.13)
80 to 159.9	90.7 (2.4)	57.8 (2.5)	1904	1.36	(1.28, 1.44)	1.21	(1.14, 1.28)	1.20	(1.13, 1.28)
160+	121.3 (7.7)	71.0 (12.2)	223	1.74	(1.51, 2.00)	1.44	(1.24, 1.66)	1.43	(1.24, 1.64)
Poultry									
0 to 4.9	9.7 (0.8)	10.5 (0.5)	6973	1.08	(1.04, 1.13)	1.08	(1.04, 1.13)	1.08	(1.03, 1.12)
5 to 9.9	11.4 (1.0)	12.5 (0.6)	4568	1.00	(ref)	1.00	(ref)	1.00	(ref)
10 to 19.9	20.4 (1.1)	16.0 (0.6)	7211	0.97	(0.94, 1.01)	0.98	(0.95, 1.02)	0.98	(0.95, 1.02)
20 to 39.9	22.4 (1.1)	22.4 (0.8)	4563	0.95	(0.91, 0.99)	0.97	(0.93, 1.02)	0.97	(0.93, 1.01)
40 to 79.9	36.6 (2.2)	26.3 (1.4)	2702	0.95	(0.90, 1.00)	0.97	(0.93, 1.03)	0.97	(0.92, 1.02)
80+	50.3 (6.1)	35.6 (6.2)	327	1.03	(0.92, 1.15)	1.05	(0.94, 1.18)	1.05	(0.94, 1.18)

^ameans (and SD) computed from 24-hour recalls based on categories from FFQs; ^bstratified by age (one-year age groups), sex, study center; ^cstratified by age (one-year age groups), sex, study center, adjusted for education (five categories), body weight (continuous), body height (continuous), total energy intake (continuous), alcohol consumption (continuous), physical activity (four categories), smoking status (seven categories), smoking duration (six categories); ^dstratified by age (one-year age groups), sex, study center, adjusted for education (five categories), body weight (continuous), body height (continuous), total energy intake (continuous), alcohol consumption (continuous), physical activity (four categories), smoking status (seven categories), smoking duration (six categories), meat intake mutually adjusted for each other. CI, confidence interval; FFQs, food frequency questionnaires; HR, hazard rate; N, number; s.e., standard error.

A seguito di questo studio, lo IARC, l'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro, ha inserito la carne rossa nella categoria 2A, mentre nel gruppo 1, la carne processata per l'associazione tra il consumo di questi prodotti di origine animale e l'insorgenza di forme neoplastiche al colon-retto (Figura 10).

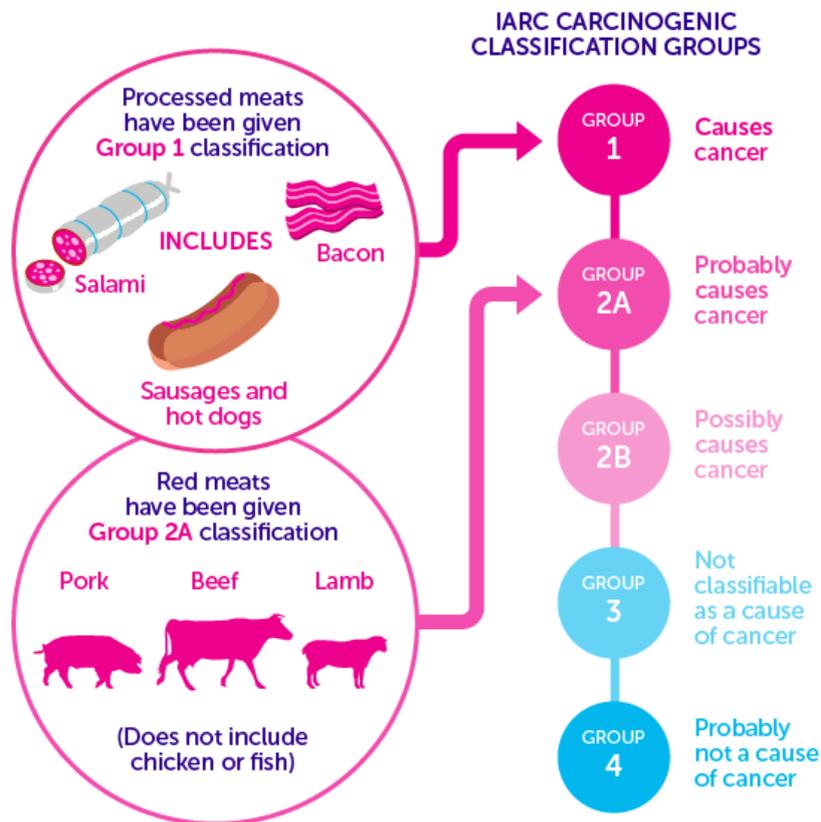


Figura 10. Classificazione IARC delle sostanze sulla base dell'insorgenza di forme tumorali.

Come riporta la Figura 10, la classificazione IARC suddivide tutte le sostanze in quattro gruppi per ordine decrescente in base all'associazione più o meno stretta con l'insorgenza di tumori; il gruppo 1 comprende tutti i composti in grado di provocare forme neoplastiche, al contrario, nel gruppo 4 sono incluse le sostanze che probabilmente non causano tumori.

La carne processata, che comprende salumi, hot dog e tutta quella gamma di prodotti affumicati o marinati, è stata inserita nel gruppo 1, ovvero l'insieme di tutte sostanze sicuramente causa di cancro, al pari del fumo e dell'esposizione all'amianto. La carne rossa invece rientra nel gruppo 2A, come composto a probabile azione cancerogena.

Risulta estremamente importante specificare che le monografie della IARC non si occupano del "risk assessment" (valutazione del rischio), ma semplicemente della cosiddetta "hazard evaluation", ossia la valutazione del pericolo. In altre parole, non forniscono stime quantitative di rischio, ma si limitano a classificare le varie sostanze o le varie esposizioni in funzione della

loro associazione con l'insorgenza di forme tumorali; non viene pertanto considerata la dose di esposizione.

5.4. Modalità di cottura

La potenziale relazione esistente tra neoplasie e proteine di origine animale è intimamente collegata alle metodologie di cottura, di preparazione e conservazione della carne e derivati, che sono strettamente dipendenti dalle abitudini del consumatore e pertanto da esso facilmente gestibili (Sgoifo Rossi, 2016).

Tra le modalità di cottura più a rischio, cuocere la carne ad elevate temperature, per tempi prolungati e su fiamma diretta, come nel caso del barbecue, provoca la formazione di amine eterocicliche aromatiche, idrocarburi policiclici aromatici e nitroso composti, in particolare sulla superficie del prodotto direttamente a contatto con la fiamma, dotati di attività mutagena e cancerogena specialmente a carico del colon-retto. Abusare quindi di tale metodologia di cottura aumenta il rischio di insorgenza di tumori; al contrario, tutte le altre tecniche di preparazione non presentano problematiche di questo genere.

5.5. Il concetto di dose

Tutti gli alimenti che fanno abitualmente parte della nostra dieta, sia di derivazione animale che vegetale, racchiudono in sé qualcosa di positivo e qualcosa di negativo e l'effetto sul nostro organismo dipende sempre dalla dose e dalla frequenza con cui vengono assunti.

Ad esempio, bevande come il caffè o il tè, se consumati in modo sconsiderato, possono provocare disfunzioni cardiache e problemi di pressione, fino alla dose letale di 150mg di caffeina per kg di peso corporeo, ovvero il corrispettivo di circa 80 caffè in un giorno (Kerrigan and Lindsey, 2005).

Tale ragionamento è valido anche per le sostanze inserite nella lista 1 dello IARC, considerate "sicuramente cancerogene", l'effetto dipende sempre dalla dose.

Un esempio è il sole, definito secondo la classificazione IARC "sicuramente cancerogeno" e quindi inserito nel gruppo 1, in quanto implicato nel processo del cancro alla pelle. Tuttavia, tale associazione è valida solamente per esposizioni molto prolungate, nelle ore più calde della giornata e senza alcun tipo di protezioni solari; condizioni non solo demonizzate dai mass media, ma anche e soprattutto dal buon senso.

Anche per salumi e insaccati vale il discorso dell'esposizione. Se consumati con moderazione nell'ambito di una dieta varia, ricca di vegetali ad azione protettiva, come quella basata sul modello Mediterraneo, si può godere degli apporti positivi di questi alimenti (ASSICA, 2017).

A conferma di questa affermazione, il Ministero della Salute, ed in particolare il Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA) della Sezione Sicurezza Alimentare, il 4 febbraio 2016, ha pubblicato il parere n°15 sul “rischio legato alla cancerogenicità delle carni rosse fresche e trasformate” in cui afferma che: *“il tumore al colon-retto, come tutte le neoplasia, sia il risultato di più fattori e sia innescato dall’interazione tra ambiente, stile di vita e genetica; che, in questo quadro generale, risultino particolarmente rilevanti: eccesso ponderale, sedentarietà, scarso contenuto di fibre, l’eccesso di calorie nella dieta, lo stile di vita nel suo complesso, compreso quello alimentare”*. Tale parere conclude dicendo: *“In conclusione, una sana alimentazione associata a uno stile di vita attivo rappresenta uno strumento valido per la prevenzione, la gestione e il trattamento di molte malattie. Un regime dietetico adeguato ed equilibrato non solo garantisce un apporto ottimale di nutrienti, in grado di soddisfare i fabbisogni dell’organismo, ma permette anche di ricevere sostanze che svolgono un ruolo preventivo e/o protettivo nei confronti di determinate condizioni patologiche”*.

In aggiunta all’autorevole parere del Ministero della Salute, che ha chiarito il quadro multifattoriale legato all’insorgenza delle forme tumorali, in cui la dieta rappresenta solamente una delle possibili cause, una ricerca italiana pubblicata su Nutrition and Cancer ha fotografato la realtà del nostro paese (Rosato *et al.*, 2017).

Questo studio, considerato il più ampio multicentrico italiano, aveva come obiettivo primario quello di raccogliere dati in tutta Italia per esprimere un giudizio che rappresentasse lo stato dell’arte nel nostro paese sulla relazione fra il consumo di carni rosse e trasformate e lo sviluppo di forme tumorali come il cancro del colon-retto, considerato il tumore più frequente in individui non fumatori di entrambi i sessi.

Nel dataset sono stati inseriti i dati di tre studi caso-controllo italiani, condotti in tre diversi periodi dal 1985 al 2010 su oltre 10.000 soggetti (3.745 casi e 6.804 controlli) e per una durata complessiva di oltre 30 anni. I risultati ottenuti hanno dimostrato che in Italia, non emerge un’associazione statisticamente significativa tra gli attuali consumi di salumi della popolazione e il tumore al colon-retto; infatti il rischio relativo considerando il livello di consumo più alto è 1,04 – quindi molto vicino all’1. Gli autori hanno giustificato tale esito con due importanti argomentazioni: i reali consumi degli italiani e le caratteristiche delle carni prodotte e lavorate nel nostro Paese.

Per quanto riguarda il consumo di carne è utile sottolineare la differenza tra consumo apparente e reale; il primo, riportato dalle maggiori fonti istituzionali come Istat, Eurostat, FAO e associazioni di categoria, indica la disponibilità teorica di quella categoria di prodotto e include quindi tendini, ossa, grasso, legamenti e parti non edibili. Il consumo reale al contrario, riportato da organizzazioni come INRAN, Nielsen, Eurisko o da studi di coorte come EPIC, indica il consumo netto per quell’alimento da parte del consumatore, escluse tutte le parti non edibili.

I dati riportati da Rosato *et al.* (2017) mostrano che il consumo medio apparente dei salumi e delle carni conservate in Italia corrisponde a 40-45 grammi al giorno, valore che scende a 15-20 g al giorno se si considera il consumo reale. Tali quantitativi rappresentano circa un terzo o un quarto rispetto al consumo registrato in molti altri Paesi d'Europa e del Nord America (Grafico 10).

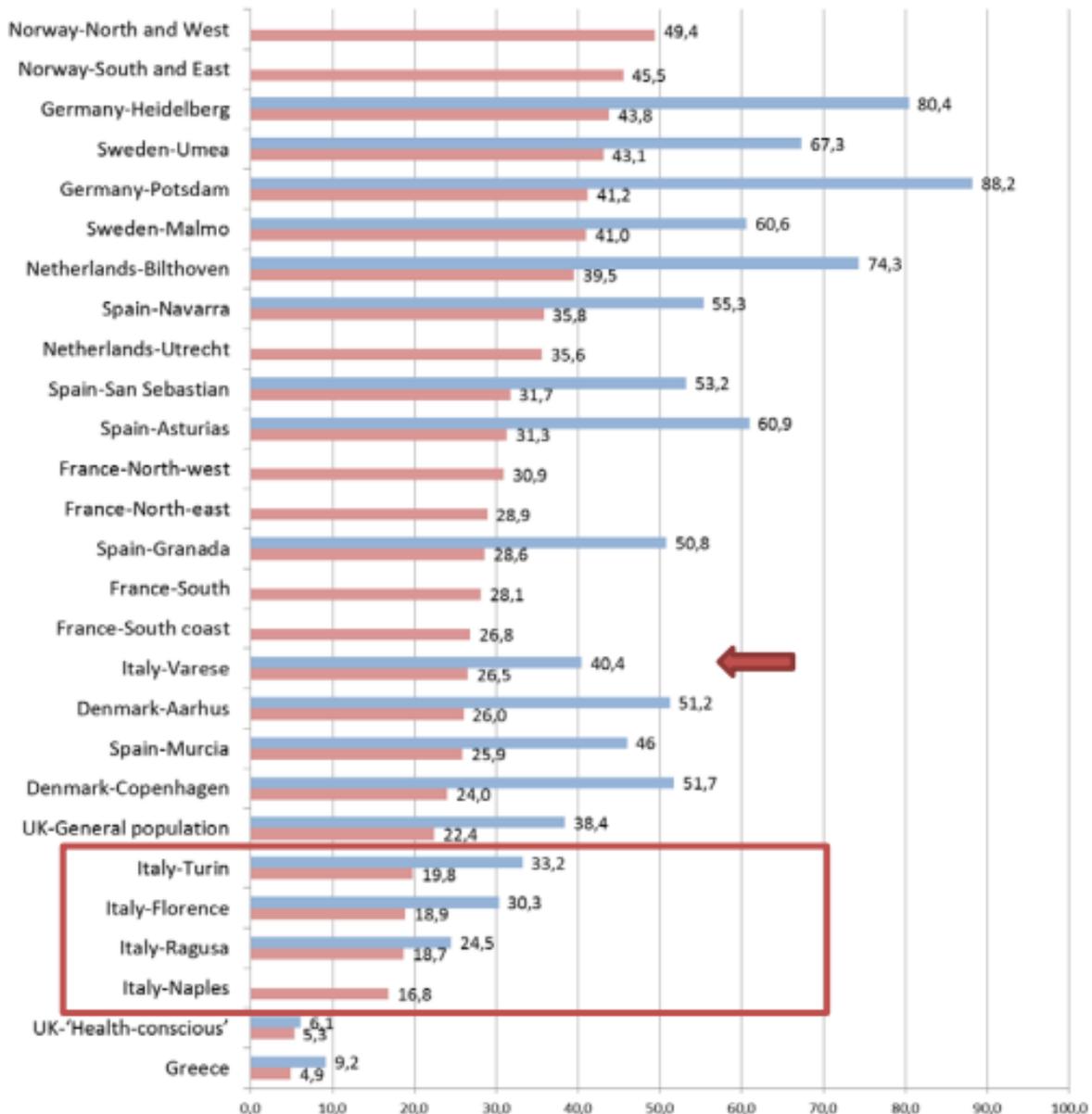


Grafico 10. Consumi di carne processata nelle principali città europee (dati espressi in grammi/die).

Il secondo punto messo in discussione dagli autori è rappresentato dalle differenti caratteristiche dei salumi italiani rispetto a quelli diffusi in Nord Europa e negli Stati Uniti.

Contrariamente a quanto accade in Italia, negli altri Paesi, processi quali affumicatura, speziatura, essiccazione e marinatura sono tradizionalmente molto diffusi e vengono applicati a tutti gli alimenti, in particolare ai prodotti a base carne. Oltre a modificare le caratteristiche

organolettiche del prodotto, tali fasi tecnologiche possono rappresentare un rischio per il consumatore in termine di sviluppo e accumulo di metaboliti esogeni e potenzialmente cancerogeni nel prodotto.

Inoltre, nel 2011 sono stati presentati i nuovi valori nutrizionali dei Salumi Italiani emersi dalle analisi effettuate da INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione - oggi CRA-NUT) e SSICA (Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari). Dai risultati è emerso che i salumi odierni sono profondamente diversi da quelli del passato; nello specifico lo studio ha paragonato le caratteristiche nutrizionali dei salumi prodotti nel 1993.

Benché i salumi utilizzino il sale per la sua funzione conservante, da cui deriva il termine “salumi”, grazie all'evoluzione dei sistemi di produzione, al controllo dei periodi di asciugatura e stagionatura e alla maggiore attenzione nella quantità e qualità delle spezie utilizzate, si è arrivati a una riduzione media superiore al 20% del suo impiego, con valore massimo di riduzione del 47% per la pancetta arrotolata (Tabella 27 e Grafico 11).

Tabella 27. Valori medi del contenuto di sale nei principali salumi nel 1993 e nel 2011 (modificato da INRAN-SSICA-IBSI-ISIT, 2011).

Prodotto	Anno		Variazione % 2011/1993
	1993	2011	
<i>Pancetta arrotolata</i>	5,7	3,0	- 47%
<i>Prosciutto crudo di San Daniele DOP</i>	7,0	4,5	-36%
<i>Zamponone Modena IGP cotto</i>	2,5	1,7	- 32%
<i>Cotechino Modena IGP cotto</i>	3,0	2,2	- 27%
<i>Wurstel di puro suino</i>	2,8	2,2	- 21%
<i>Mortadella Bologna IGP</i>	3,0	2,4	- 20%
<i>Speck Alto Adige IGP</i>	5,1	4,1	- 19%
<i>Salami Cacciatorini DOP</i>	5,1	4,2	- 18%
<i>Salame Milano</i>	4,6	3,9	- 15%
<i>Salame ungherese</i>	4,7	4,0	- 15%
<i>Prosciutto crudo nazionale</i>	7,0	6,0	- 15%
<i>Salame Napoli</i>	4,7	4,1	- 13%
<i>Prosciutto cotto</i>	2,3	2,1	- 9%
<i>Coppa</i>	5,1	4,9	- 4%

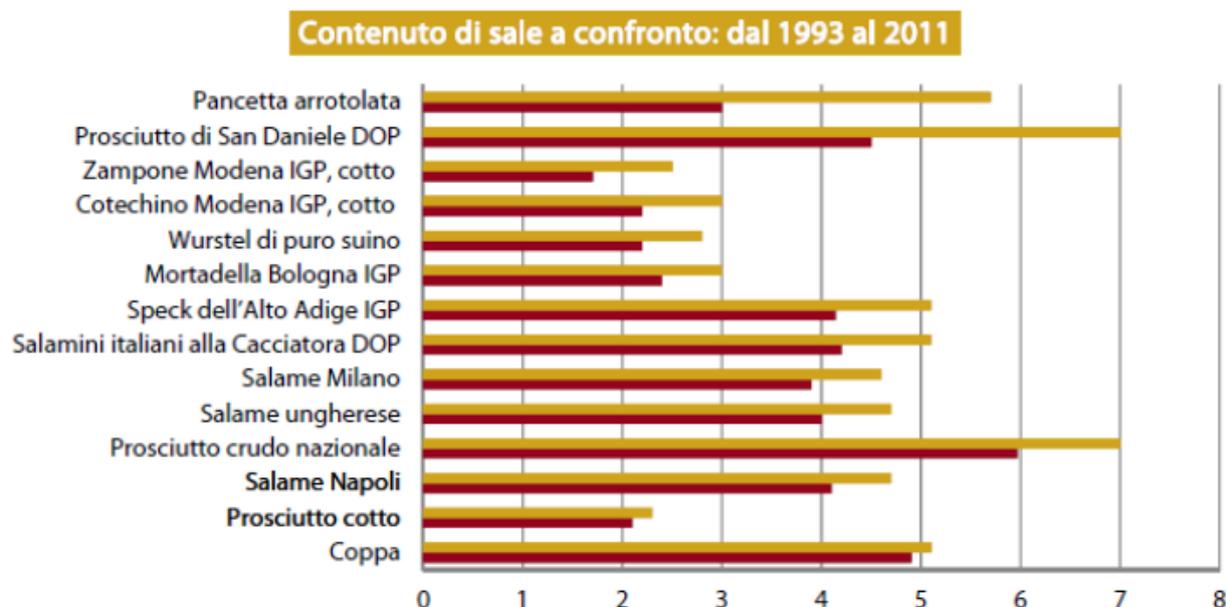


Grafico 11. Contenuto medio di sale nei principali salumi nel 1993 (in giallo) e nel 2011 (in rosso) (modificato da INRAN-SSICA-IBSI-ISIT, 2011).

Un altro parametro che si è ridotto nel corso degli anni è rappresentato dalla concentrazione di nitriti e nitrati. Questi additivi, consentiti dalla legge, venivano molto impiegati in passato quando non erano disponibili i metodi di refrigerazione artificiale diffusi oggi e anche gli ambienti di lavorazione non erano sottoposti ai rigorosi controlli attuali.

Oggi nitrati e nitriti sono comunque inseriti nei salumi per motivi di sicurezza sanitaria, ovvero per controllare crescite batteriche, nonché per mantenere il colore rosso della carne; tuttavia il loro contenuto si è notevolmente ridotto, come mostra la Tabella 28 e il Grafico 12.

Tabella 28. Valori medi del contenuto di nitrati, espressi in ppm, nei principali salumi nel 1993 e nel 2011 (modificato da INRAN-SSICA-IBSI-ISIT, 2011).

Prodotto	Anno		Variazione % 2011/1993
	1993	2011	
Wurstel di puro suino	120,0	13,0	- 89%
Salame ungherese	35,0	19,0	- 46%
Mortadella Bologna IGP	40,0	11,0	- 73%
Pancetta arrotolata	120,0	21,0	- 83%
Prosciutto cotto	110,0	14,4	- 87%
Speck Alto Adige IGP	185,0	23,3	- 87%
Coppa	110,0	11,0	- 90%
Zampone Modena IGP cotto	80,0	4,0	- 95%
Cotechino Modena IGP cotto	140,0	5,0	- 96%

Nitrati (ppm) nei salumi e diminuzione % dal 1993 al 2011

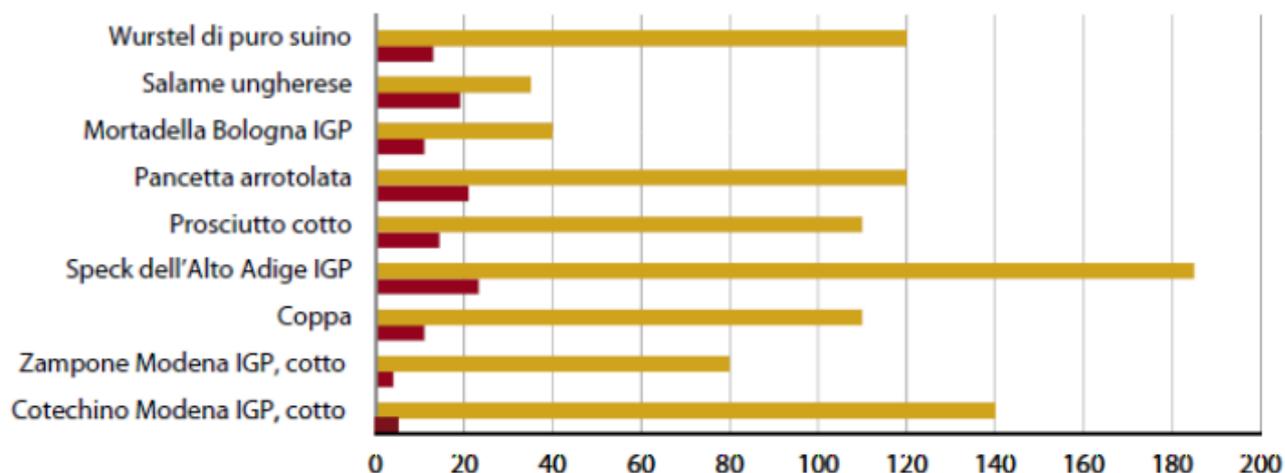


Grafico 12. Contenuto medio di nitrati, espressi in ppm, nei principali salumi nel 1993 e nel 2011 (modificato da INRAN-SSICA-IBSI-ISIT, 2011).

Oltre alla riduzione di sostanze conservanti quali sale, nitriti e nitrati, i salumi odierni presentano anche una riduzione del contenuto lipidico (- 4 - 48%), a dimostrazione delle moderne tecniche di allevamento che consentono di ottenere animali più magri (Tabella 29).

In particolare, gli alimenti più interessanti da questo punto di vista sono gli insaccati cotti; dove il contenuto in acidi grassi saturi si è ridotto notevolmente, fino a quasi il 40% e allo stesso tempo si è ottenuto un equilibrio tra contenuto in grassi saturi e insaturi. Questi ultimi sono passati dal 30% a oltre il 60% dei grassi totali (Tabella 30).

Tabella 29. Valori medi del contenuto di lipidi, espressi in g/100g di prodotto, nei principali salumi nel 1993 e nel 2011 (modificato da INRAN-SSICA-IBSI-ISIT, 2011).

Prodotto	Anno		Variazione % 2011/1993
	1993	2011	
<i>Prosciutto cotto</i>	14,7	7,6	- 48%
<i>Cotechino Modena IGP cotto</i>	24,7	16,3	- 34%
<i>Zampone Modena IGP cotto</i>	25,9	17,5	- 33%
<i>Bresaola Valtellina IGP</i>	2,6	2,0	- 24%
<i>Prosciutto cotto sgrassato</i>	4,4	3,5	- 21%
<i>Prosciutto di San Daniele DOP</i>	23,0	18,6	- 19%
<i>Mortadella Bologna IGP</i>	28,1	25,0	- 11%
<i>Wurstel di puro suino</i>	23,3	21,14	- 9%
<i>Speck Alto Adige IGP</i>	20,9	19,1	- 8%
<i>Coppa</i>	33,5	31,6	- 6%
<i>Salami Cacciatorini DOP</i>	34,0	32,7	- 4%

Tabella 30. Valori medi del rapporto di acidi grassi saturi/insaturi, espressi in g/100g di prodotto, nei principali salumi nel 1993 e nel 2011 (modificato da INRAN-SSICA-IBSI-ISIT, 2011).

Prodotto	Anno		Variazione % 2001/1993
	1993	2011	
<i>Prosciutto di San Daniele DOP</i>	0,64	0,57	- 11%
<i>Cotechino Modena IGP cotto</i>	0,53	0,49	- 8%
<i>Pancetta arrotolata</i>	0,57	0,53	- 7%
<i>Zampone Modena IGP cotto</i>	0,53	0,49	- 7%
<i>Mortadella Bologna IGP</i>	0,55	0,54	- 3%

In generale quindi, i salumi italiani non solo sono sicuri da un punto di vista nutrizionale e microbiologico, ma, se consumati con moderazione e all'interno di un'alimentazione sana e varia come quella basata sul modello della Dieta Mediterranea, fanno anche bene al nostro organismo.

5.6. Raccomandazioni

Come più volte ripetuto in precedenza, tutto dipende dalla dose e dalla frequenza di assunzione. Per quanto concerne la frequenza di assunzione, la piramide alimentare sopra riportata suggerisce in modo chiaro e semplice tutti gli alimenti con il relativo numero di porzioni da inserire in una dieta sana ed equilibrata.

Differente è il discorso della quantità massima consigliata, in quanto il calcolo prevede una serie di fattori tra cui l'età, il sesso, il livello e l'intensità di attività fisica praticata ecc. Come regola generale, l'OMS suggerisce che l'apporto proteico giornaliero non deve superare 0,8g di carne per kg di peso corporeo. Ciò significa che per un individuo di 85kg l'apporto non deve superare i 70grammi di carne cotta al giorno ed un totale di 500gr alla settimana, che corrispondono a 700-750gr di carne cruda. Tali quantitativi sono in accordo con quanto riportato da Bouvard *et al.* (2015) che suggerisce un consumo ottimale di carne cotta tra i 400 ed i 500gr alla settimana.

Tali quantitativi derivano da una revisione sistematica effettuata dal American Institute for Cancer Research insieme al World Cancer Research Fund International; tale studio ha dimostrato che aumentare di 100gr/settimana il consumo di carne rossa o di 50gr/settimana di carne processata causerebbe l'aumento del 17% del rischio di sviluppare cancro al colo-retto. Ciò significa che in caso di superamento delle dosi raccomandate di carne rossa e processata, il rischio di insorgenza di forme tumorali a carico del basso intestino passerà dal 4 al 4,72% nel sesso maschile, oppure dal 5 al 5,9% nel sesso femminile (AICR/WCRF. 1997).

6. Nutrizione animale

La maggior parte degli alimenti che comunemente arrivano sulle nostre tavole provengono da animali allevati con sistemi intensivi, in cui l'uomo provvede a fornire le condizioni più ottimali per la loro crescita. Tra queste troviamo ad esempio la progettazione delle strutture, il microclima, la gestione igienico-sanitaria e l'alimentazione.

Quest'ultima in particolare, oltre ad essere la prima voce nel bilancio aziendale (45-60% del totale), riveste un ruolo chiave all'interno del settore zootecnico, in quanto rappresenta l'elemento chiave per tutte le tipologie di produzioni (carne, latte e uova).

Nonostante il complesso quadro di specie allevate, linee genetiche, fasi produttive e dinamiche di allevamento, la nutrizione animale si basa su due principi cardine: la conoscenza dei fabbisogni degli animali e delle caratteristiche delle materie prime.

Per quanto riguarda i fabbisogni delle diverse specie nelle differenti fasi produttive, molte ricerche sono state fatte nel corso degli anni per studiare il metabolismo degli animali e stabilire con precisione le loro richieste in termini di energia (metabolizzabile, digeribile e netta), proteine con particolare riferimento agli aminoacidi essenziali e/o limitanti, grassi (saturi e polinsaturi) nonché vitamine e minerali.

Il National Research Council (NRC) fornisce infatti le linee guida per la corretta nutrizione delle specie ad interesse zootecnico (suini, bovini e avicoli) (Figura 11).

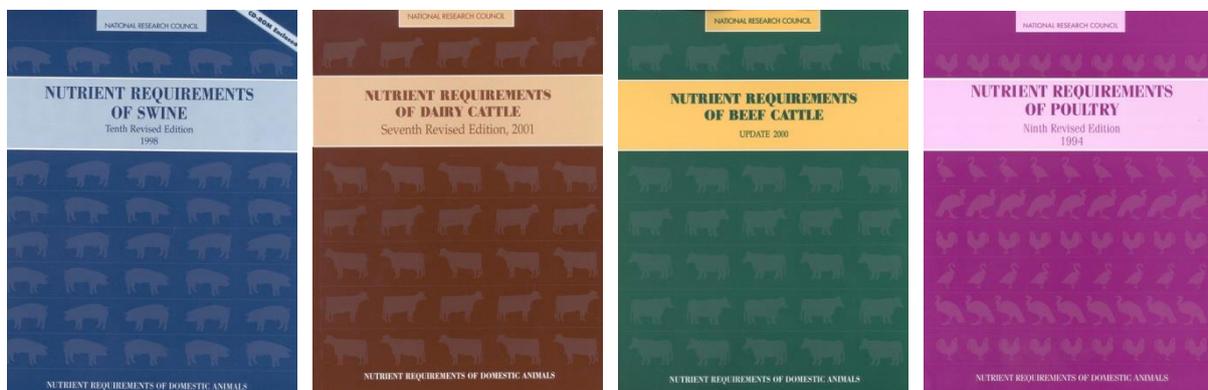


Figura 11. Manuali di nutrizione per la specie suina, bovina da latte, bovina da carne e avicola (da sinistra verso destra).

A titolo di esempio, in Tabella 31 sono riportati i fabbisogni nutrizionali nel pollo da carne.

Tabella 31. Fabbisogni nutrizionali del pollo da carne (modificato da Cerolini et al., 2008).

Parametro			
<i>Età (sett)</i>	0-3	3-6	6-8
<i>EM (kcal)</i>	3000-3200	3000-3200	> 3200
<i>Proteina grezza (%)</i>	22-24	20-22	18-22
<i>Lisina (%)</i>	1.10	1.00	0.85
<i>Metionina (%)</i>	0.5	0.38	0.32
<i>Treonina (%)</i>	0.8	0.74	0.68
<i>Triptofano (%)</i>	0.20	0.18	0.16
<i>Calcio (%)</i>	1.00	0.90	0.80
<i>Fosforo (%)</i>	0.45	0.35	0.30
<i>Ferro (mg)</i>	80	80	80
<i>Vitamina A (UI)</i>	1500	1500	1500
<i>Colina (mg)</i>	1300	1000	750

6.1. Volumi prodotti

Secondo dati Fefac, la Federazione Europea dei produttori di mangimi, la produzione del 2016 nei ventotto Paesi membri ha raggiunto 155.4 milioni di tonnellate, che equivale a una crescita dello 0,4% rispetto al 2015. In particolare, la produzione di mangimi per il settore avicolo è aumentata di circa il 2%, quella per i suini è diminuita di circa un punto percentuale, mentre si è mantenuto stabile il valore produttivo dei mangimi per bovini.

Per quanto riguarda la situazione italiana, a fronte di una contrazione complessiva della spesa destinata ai prodotti di origine animale (carne - 4,4%, latte - 5,2%), la leggera crescita del settore mangimistico dipende in larga misura dal comparto avicolo che continua a dimostrarsi un settore in crescita; infatti, più del 40%, corrispondente a quasi 6 milioni di tonnellate, del totale dei mangimi prodotti è destinato a tutte le principali specie avicole (polli da carne, galline ovaiole e tacchini).

Più limitata invece la situazione dei mangimi per suini con 3,6 milioni di tonnellate complessive. In leggero aumento infine i mangimi per vacche da latte (+ 0,7%), mentre si evidenzia una grave contrazione per i mangimi per bovini da carne (- 9,1% e 75.000 tonnellate). Secondo Assalzo, l'Associazione nazionale tra i produttori di alimenti zootecnici, la produzione italiana di mangimi per l'alimentazione animale nel 2016 è stata di 14.226.000 tonnellate totali, in aumento rispetto all'anno precedente (+ 1,2%). Inoltre, il mercato degli alimenti zootecnici in Italia ha generato un valore di 6.020 miliardi di euro nel 2016 contro i 5.860 del precedente anno e offre lavoro a 8.500 addetti, indotto escluso.

La ripresa del fatturato dipende in gran parte dall'aumento dei prezzi di produzione e del costo del lavoro; i primi infatti hanno registrato un aumento del 2,2% rispetto al 2015, il secondo invece un aumento dell'1,9 se confrontato con l'anno precedente.

Nel complesso bisogna considerare che la mangimistica italiana è un settore che opera in un contesto in cui la dipendenza dall'approvvigionamento di materie prime d'importazione continua ad aumentare, creando rilevanti elementi di instabilità; in aggiunta, la distribuzione e la potenzialità degli impianti non è uniforme sul territorio, come riporta la Tabella 32 (Mangimi&alimenti.it).

Tabella 32. Numero, dislocazione e potenzialità di lavorazione regionale degli stabilimenti per la produzione di mangimi composti, dati riferiti al biennio 2014-2015 (modificato da ASSALZOO, 2016).

Regione	N° stabilimenti		Potenzialità (q/h)	
	2014	2015	2014	2015
Liguria	1	1	28	29
Piemonte/Valle d'Aosta	38	35	4.430	4.439
Lombardia	81	76	8.035	8.091
Trentino Alto Adige	5	5	317	320
Veneto	41	37	6.365	6.375
Friuli Venezia Giulia	7	7	504	505
Emilia Romagna	138	129	9.704	9.694
Toscana	23	20	1.721	1.710
Marche	22	20	1.904	1.907
Umbria	41	36	2.431	2.412
Lazio	14	14	1.653	1.647
Abruzzo/Molise	12	12	1.391	1.389
Campania	12	11	1.633	1.622
Puglia	7	7	859	860
Basilicata	1	1	306	306
Calabria	6	6	334	332
Sicilia	18	15	1.965	1.968
Sardegna	10	8	1.426	1.425
Totale	477	440	44.914	44.584

6.2. Materie prime

Come riportato in precedenza, la conoscenza delle materie prime disponibili nonché la loro composizione analitica ed eventualmente la presenza di sostanze indesiderate (micotossine o fattori anti nutrizionali) risulta fondamentale per formulare una dieta equilibrata, in termini di macro e micro nutrienti, e anche sostenibile dal punto di vista economico.

Sul mercato sono disponibili centinaia di differenti materie prime, ma tutte possono essere classificate in tre categorie: energetiche, proteiche e fibrose.

- Tra le materie prime energetiche troviamo i cereali, per il loro alto contenuto in amido (50-70%), ed i grassi per l'elevato potere energetico (9,3kcal/1gr). Le colture cerealicole che vengono maggiormente utilizzate nella nutrizione animale sono mais, frumento e orzo. I grassi, di origine animale (sego o strutto) o vegetale (oli), hanno sia funzione nutritiva, migliorano l'assorbimento delle vitamine e incrementano la concentrazione energetica delle diete, sia funzione tecnologica in quanto favoriscono la pellettatura e diminuiscono la polverosità del mangime. Tuttavia la loro percentuale di inclusione nelle razioni non deve eccedere per non peggiorare la stabilità ossidativa del mangime e deprimere l'appetibilità dello stesso. Razioni per bovini e suini possono contenere al massimo il 6% di lipidi sulla sostanza secca totale, mentre le diete per avicoli possono presentare valori più elevati (10%/SS).
- I semi di proteaginose e le farine animali costituiscono invece le due principali fonti proteiche. La soia rappresenta la base proteica delle razioni per animali e rappresenta l'alimento vegetale con il più elevato tenore proteico (49g/100g per la farina di estrazione); presenta tuttavia alcune problematiche. Primo fra tutte il costo (420€/ton, dato aggiornato al 20/06/2017 da Granaria Milano), la dipendenza dal mercato estero (USA) e la presenza di fattori anti nutrizionali quali gli inibitori delle proteasi che possono rallentare lo sviluppo corporeo; in alternativa, sono disponibili altre fonti proteiche vegetali quali il girasole o la colza.

Gli alimenti di origine animale (farina di carne e ossa, farina di pesce, latte o siero in polvere), con valori di proteina compresi tra il 50% e l'80%, rappresentano la materia prima più proteica a disposizione. Sussistono tuttavia delle limitazioni nell'utilizzo di tali farine animali trasformate nella nutrizione delle specie allevate; la normativa di riferimento è rappresentata dal Regolamento (UE) n° 56/2013 della Commissione del 16 gennaio 2013 che modifica il precedente regolamento (CE) n° 999/2001.

- Infine le fonti fibrose sono costituite da fieni o sottoprodotti delle lavorazioni industriali (distillers, crusconi, polpe di bietola) che, con la sola eccezione dei ruminanti, non hanno funzione energetica; vengono tuttavia inserite nelle razioni a fini trofici. Le principali funzioni della fibra sono stimolare la masticazione, la produzione di saliva e la secrezione di succhi gastrici, conferire senso di sazietà e normalizzare il transito intestinale (Cerolini *et al.*, 2008).

Sulla base dei fabbisogni degli animali e delle differenti caratteristiche analitiche delle materie prime, è quindi possibile formulare razioni *ad hoc*, bilanciate e sostenibili, grazie anche al supporto informatico di software specifici quali ad esempio CPM Dairy o Supermix. Un esempio di dieta per suini nelle fasi di ingrasso è fornito in Tabella 33.

Tabella 33. Formulazione delle diete per suini in ingrasso.

Ingredienti (% inclusione)	Fase		
	Accrescimento (25-50kg PV)	Magronaggio (50-110kg PV)	Finissaggio (110-160kg PV)
<i>Cereali</i>	30-50	40-60	50-70
<i>Siero di latte</i>	0.5	0	0
<i>Soia</i>	15-20	10-20	10-20
<i>Soia integrale</i>	0-10	0-5	0
<i>Fonti proteiche</i>	0-2.5	0-5	0-5
<i>Sottoprodotti</i>	10-20	10-20	10-25
<i>Olio</i>	0-4	0-2	0
<i>Strutto</i>	0-4	0-4	0-4
<i>NaCl</i>	0.3	0.35	0.3-0.5

Nell'ambito dell'alimentazione animale, c'è un crescente interesse nei confronti dell'utilizzo di alimenti che rispondano alla regola delle 4R ovvero: Ridurre, Riutilizzare, Rivalorizzare e Ricerca.

1. Ridurre la competizione fra alimenti destinati all'uomo e quelli destinati agli animali attraverso l'utilizzo di nuove fonti energetiche e proteiche;
2. Riutilizzare gli "sprechi" alimentari;
3. Rivalorizzare i coprodotti agroalimentari e industriali in alimenti funzionali;
4. Ricerca volta a determinare le caratteristiche degli alimenti per poterli utilizzare in modo efficiente. In tal senso, di grande interesse risultano i sottoprodotti derivanti dalle lavorazioni di "biocarburanti" e prodotti destinati al consumo umano, quali distillers, panelli e farine di estrazione o anche i sottoprodotti ottenuti da lavorazioni industriali. Infine, anche gli insetti, allevati su un substrato di biomasse, possono rappresentare un'ottima fonte proteica per gli animali.

Nel prossimo futuro si renderanno disponibili sempre più alimenti per gli animali allevati a fini alimentari, utilizzabili anche nell'alimentazione dei monogastrici che, come è noto, sono gli animali in maggiore competizione alimentare con l'uomo. L'utilizzo di queste nuove fonti renderà quindi più sostenibile l'allevamento degli animali da reddito da un punto di vista economico, sociale e ambientale (Bontempo *et al.*, 2013).

6.3. Trattamenti

Raramente le materie prime prodotte o acquistate sul mercato vengono inserite tal quali nelle razioni per animali; molto spesso infatti vengono sottoposte a trattamenti meccanici o termici al fine di migliorarne le caratteristiche chimiche, fisiche e nutrizionali, influenzarne l'utilizzazione digestiva, la degradabilità ruminale, la disponibilità di nutrienti, l'appetibilità nonché lo stato igienico-sanitario.

Tra i trattamenti meccanici, la macinazione è senza dubbio il più comune, utilizzato specialmente per i cereali. La riduzione dell'alimento in piccole particelle (2mm-400µm) consente di aumentare la superficie libera e quindi ottimizzare l'interazione tra lo stesso e gli enzimi digestivi degli animali; la macinazione risulta inoltre indispensabile per successivi trattamenti quali l'estrusione o la pellettatura.

La fiocatura comprende sia un trattamento termico (iniezione di vapore ad una temperatura di 80-100 °C per 15-40min) sia meccanico, con il passaggio del prodotto tra due rulli. L'azione combinata di temperatura e schiacciamento provoca la parziale cottura degli amidi (gelatinizzazione), rendendo questa materia prima molto digeribile e quindi destinata ad animali giovani in cui il sistema digestivo non è ancora pienamente funzionante (suinetti in svezzamento).

Le diverse materie prime possono quindi essere processate in molteplici modi, anche combinando tecniche meccaniche e termiche; risulta tuttavia fondamentale considerare che all'aumentare del numero e dell'intensità dei trattamenti corrisponde una progressiva degradazione dei micronutrienti, in particolare vitamine e minerali, e un proporzionale incremento del prezzo finale.

6.4. Controlli e analisi ufficiali

La sicurezza dei mangimi è importante tanto per la salute delle specie allevate, quanto per l'ambiente e infine per la sicurezza dei prodotti di origine animale. Per questo motivo, sul territorio nazionale e internazionale sono in vigore una serie di norme che regolano tutta la filiera mangimistica, dall'elenco delle materie prime utilizzabili, ai requisiti igienico-sanitari per finire con i metodi di analisi ufficiali per il campionamento e la valutazione della composizione chimica, nonché l'eventuale presenza di sostanze indesiderate. Di seguito sono riportate le principali:

- Direttiva 96/25/CE del Consiglio relativa alla circolazione di materie prime per mangimi;

- Direttiva 2002/32/CE relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali;
- Direttiva 82/471/CEE relativa a taluni prodotti impiegati nell'alimentazione degli animali;
- Direttiva 93/74/CEE concernente gli alimenti per animali destinati a particolari fini nutrizionali;
- Direttiva 2001/18/CE sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati;
- Regolamento (CE) n. 1829/2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati;
- Regolamento (CE) n. 1831/2003 sugli additivi destinati all'alimentazione animale;
- Regolamento (CE) 1831/2003/CE che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi.

7. Additivi

Nell' 2003 la Commissione Europea ha adottato diversi provvedimenti normativi per regolamentare il settore dell'alimentazione animale e il più significativo è rappresentato dal Regolamento 1831/2003. Tale Regolamento ha lo scopo di istituire una procedura comunitaria per l'autorizzare, l'immissione sul mercato e l'utilizzo degli additivi per i mangimi e introdurre norme per il controllo e l'etichettatura degli additivi al fine di tutelare la salute umana, animale e l'ambiente.

In passato, in zootecnia l'utilizzo degli antimicrobici, in particolare antibiotici, era una pratica molto comune; la somministrazione di tali sostanze agli animali, a dosi sub-terapeutiche e per tempi prolungati, consentiva di ridurre e/o inibire la proliferazione di microrganismi patogeni, modulando di fatto l'ambiente intestinale a favore di specie benefiche con il risultato finale di un deciso miglioramento delle performance produttive.

Tuttavia, il dosaggio antibiotico a basse concentrazioni ha portato con il passare del tempo alla selezione di ceppi microbici resistenti a uno o più sostanze e ciò ha provocato non solo un peggioramento dello stato di salute degli animali ed il conseguente calo delle performance di crescita, ma soprattutto una perdita di efficacia delle terapie antibiotiche in medicina umana con gravi rischi per la salute pubblica.

L'antibiotico-resistenza è oggi un fenomeno di scala mondiale, responsabile di 25.000 decessi ogni anno in Europa e circa 700.000 in tutto il mondo. L'economista inglese Jim O'Neill ha recentemente pubblicato un report sullo stato dell'arte dell'antibiotico resistenza nel mondo, dove ha stimato che entro il 2050, i decessi legati a tale problematica saranno superiori a quelli legati a forme tumorali. Oltre all'impressionante numero di esiti fatali, questo fenomeno è anche responsabile dell'aumento dei costi della sanità pubblica nonché la diminuzione della produttività in seguito ad assenza dal posto di lavoro; tale documento monetizza infine tali perdite con un valore di 1,5 miliardi di euro all'anno, considerando solo la realtà europea (O'Neill, 2016).

Da un punto di vista generale, a partire dal 1/1/2006 l'Unione Europea ha bandito l'utilizzo degli antibiotici, ad eccezione di coccidiostatici e istomonostatici, a scopo auxinico in alimentazione animale, ponendo le basi per la ricerca e lo sviluppo di sostanze non sintetiche alternative.

7.1. Definizione

La normativa di riferimento (Regolamento 1831/2003) definisce gli additivi come “sostanze, microrganismi o preparati, diversi dai mangimi e dalle premiscele che sono intenzionalmente aggiunti agli alimenti per animali o all'acqua al fine di svolgere una o più tra le funzioni riportate nel medesimo regolamento (art. 5, paragrafo 3).

7.2. Classificazione

In base all'Articolo 6, le categorie degli additivi per mangimi sono:

1. Additivi tecnologici: ogni sostanza aggiunta ai mangimi per scopi tecnologici;
2. Additivi organolettici: ogni sostanza la cui aggiunta ai mangimi migliora o cambia le proprietà organolettiche dei mangimi o le caratteristiche visive degli alimenti derivati da animali;
3. Additivi nutrizionali;
4. Additivi zootecnici: ogni additivo utilizzato per influire positivamente sui parametri produttivi degli animali in buona salute o per influire positivamente sull'ambiente;
5. Coccidiostatici e istomonostatici.

Ogni categoria, eccetto quella dei coccidiostatici e istomonostatici, include diversi “gruppi funzionali”.

1. Additivi tecnologici. Di questa categoria fanno parte i seguenti gruppi funzionali:

- a) Conservanti: sostanze o microrganismi che proteggono le materie prime per mangimi dal deterioramento provocato da microrganismi o da loro metaboliti;
- b) Antiossidanti: sostanze che prolungano il periodo di validità dei mangimi e delle materie prime per mangimi proteggendoli dal deterioramento provocato dall'ossidazione;
- c) Emulsionanti: sostanze che rendono possibile la formazione o il mantenimento di una miscela omogenea di due o più fasi immiscibili nei mangimi;
- d) Stabilizzanti: sostanze che rendono possibile mantenere lo stato fisico-chimico dei mangimi;
- e) Addensanti: sostanze che aumentano la viscosità dei mangimi;
- f) Gelificanti: sostanze che danno consistenza a un mangime tramite la formazione di un gel;
- g) Leganti: sostanze che aumentano la tendenza alla fissazione delle particelle dei mangimi;
- h) Sostanze per il controllo della contaminazione dei radionuclidi: sostanze che inibiscono l'assorbimento di radionuclidi o ne favoriscono l'escrezione;

- i) Anti agglomeranti: sostanze che riducono la tendenza alla fissazione delle singole particelle di un mangime;
- j) Regolatori dell'acidità: sostanze che regolano il pH dei mangimi;
- k) Additivi per l'insilaggio: sostanze, compresi enzimi o microrganismi, da incorporare nei mangimi per migliorare la produzione di insilati;
- l) Denaturanti: sostanze che, se utilizzate per la fabbricazione dei mangimi trasformati, consentono di individuare l'origine degli alimenti o delle materie prime per mangimi;
- m) Sostanze per la riduzione della contaminazione dei mangimi dalle micotossine.

2. Additivi organolettici. Della suddetta categoria fanno parte i seguenti gruppi funzionali:

- a) Coloranti: sostanze che conferiscono o restituiscono colore ai mangimi, sostanze che, se somministrate agli animali, conferiscono colore agli alimenti di origine animale oppure sostanze che influiscono favorevolmente sul colore di pesci o uccelli ornamentali;
- b) Aromatizzanti: sostanze la cui aggiunta ai mangimi ne aumenta l'aroma o l'appetibilità.

3. Additivi nutrizionali. Di questa categoria fanno parte:

- a) Vitamine, provitamine e sostanze ad effetto analogo chimicamente ben definite;
- b) Composti di oligoelementi;
- c) Aminoacidi, loro sali e analoghi;
- d) Urea e suoi derivati.

4. Additivi zootecnici. In questa categoria rientrano:

- a) Promotori della digestione: sostanze che, se somministrate agli animali, aumentano la digeribilità della loro dieta agendo su determinate materie prime per mangimi;
- b) Stabilizzatori della flora intestinale: microrganismi o altre sostanze chimicamente definite che, se somministrati agli animali, esercitano un effetto positivo sulla flora intestinale;
- c) Sostanze che influiscono favorevolmente sull'ambiente;
- d) Altri additivi zootecnici.

Il Regolamento 1831/2003 definisce inoltre nel dettaglio tutte le caratteristiche che gli additivi devono possedere per poter essere autorizzate e quindi immesse nel registro ufficiale e commercializzate. In particolare, devono influenzare in maniera positiva la salute umana o animale o l'ambiente, non devono presentare diciture tali da poter trarre in inganno l'utilizzatore, non devono danneggiare il consumatore influenzando negativamente sulle caratteristiche specifiche dei prodotti di origine animale o traendolo in inganno riguardo a tali caratteristiche. Devono influenzare favorevolmente le caratteristiche dei mangimi, dei prodotti di origine

animale, il colore di pesci e uccelli ornamentali e soddisfare le esigenze nutrizionali degli animali. Infine devono avere un effetto positivo sulle conseguenze ambientali della produzione animale, influenzare favorevolmente la produzione, le prestazioni o il benessere degli animali agendo, sulla flora gastrointestinale o sulla digeribilità degli alimenti per animali (www.ministerosalute.it/alimenti/sanita).

Per una trattazione più esaustiva dei differenti additivi sopra descritti, si rimanda ai successivi capitoli (8, 9 e 10). Inoltre, dato il recente interesse di tali composti in ambito zootecnico, nel migliorare le performance produttive e le caratteristiche qualitative dei prodotti di origine animale, specifiche categorie di emulsionanti, polifenoli e probiotici sono state oggetto di prove sperimentali *in vivo*, riportate nel capitolo 12.

Le specie target selezionate per il presente lavoro di tesi sono state la specie avicola e quella suina. Nell'allevamento del pollo da carne, caratterizzato da cicli produttivi molto brevi (cfr capitolo 2), la corretta formulazione delle diete, nonché l'utilizzo di additivi, risultano pratiche fondamentali per sostenere gli elevati tassi di crescita di questi animali, assicurando l'assunzione e l'utilizzo dell'alimento, l'ottimizzazione dello status ossidativo ed infine la salute delle popolazioni microbiche intestinali.

In aggiunta, per quanto riguarda la specie suina, l'attenzione è stata focalizzata su due momenti particolarmente critici dell'allevamento, ossia il periparto e lo svezzamento dei suinetti, durante i quali è stato somministrato valutato un composto fenolico al fine di valutarne gli effetti benefici.

8. Gli emulsionanti

Come precedentemente riportato, gli emulsionanti sono considerati degli additivi tecnologici e per questo motivo rientrano nella categoria 1 del Regolamento 1831/2003, dove vengono definiti come “sostanze che rendono possibile la formazione o il mantenimento di una miscela omogenea di due o più fasi immiscibili nei mangimi”.

Questi composti si distinguono in emulsionanti di origine naturale come la lecitina di soia o di sintesi come la lisolecitina, la lisofosfatidilcolina o il glicerolo polietilenglicole ricinoleato (Soares and Lopez-Bote, 2002; Zhang *et al.*, 2011).

8.1. La lecitina

Da un punto di vista chimico la lecitina è una miscela di fosfolipidi, di cui la fosfatidilcolina (PC) rappresenta la molecola di maggiore interesse in quanto contenuta in quantità media pari al 14-16 % del totale (Figura 12).

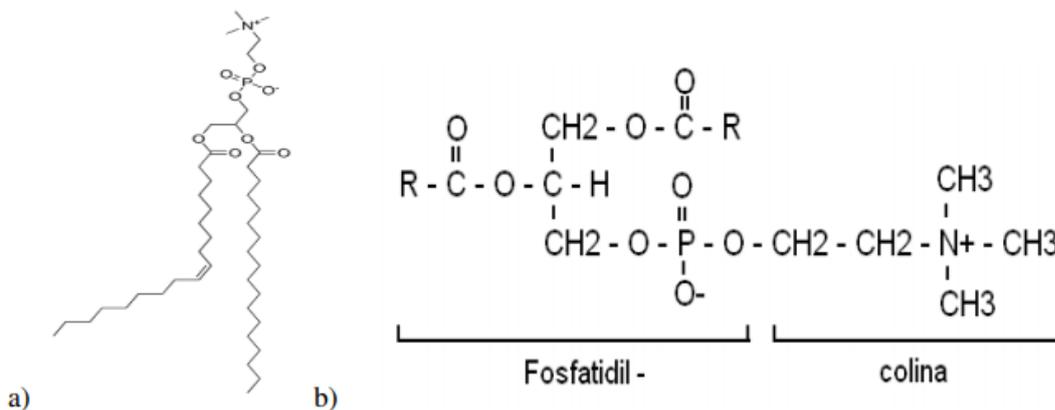


Figura 12. Struttura della lecitina (a) e particolare della suddivisione fra la due parti costituenti (b).

8.1.1. Produzione della lecitina

Industrialmente la lecitina può essere estratta dagli oli vegetali, dal tuorlo d'uovo e dal grasso di pesce; tuttavia la soia rappresenta la matrice più vantaggiosa per l'estrazione della lecitina data la costante disponibilità, benché il suo contenuto sia intorno allo 0,5-0,6%.

La lecitina non si estrae direttamente dal seme ma dall'olio che deve essere sottoposto a differenti passaggi tecnologici, dove il primo fra questi, chiamato degommaggio, prevede la separazione della lecitina mediante centrifugazione.

8.1.2. Benefici sull'organismo

Nell'uomo, la lecitina consente di mantenere i grassi alimentari in sospensione, prevenendo così la formazione di placche a livello vascolare, prevenendo di fatto l'insorgenza di numerose patologie cardio-vascolari. Inoltre, viene anche utilizzata nella terapia delle patologie epatiche dovute ad eccessivo consumo di alcolici grazie alla sua proprietà di rigenerazione delle membrane cellulari (Ki *et al.*, 2014).

8.2. La lisofosfatidilcolina

La fosfatidilcolina (abbreviata come PC) è un emulsionante di origine sintetica ottenuto dalla trimetilazione di una molecola di fosfatidiletanolamina o sintetizzato ex novo a partire da un digliceride e da CDP-colina. La PC rappresenta il fosfolipide più abbondante sul foglietto esterno delle membrane plasmatiche (Kahle *et al.*, 2015).

In zootecnia, l'utilizzo della lisofosfatidilcolina consente di ridurre il diametro delle micelle lipidiche in sede intestinale, garantendo migliori performance, se paragonata con la lecitina di soia (Melegy *et al.*, 2010). Tale additivo risulta inoltre attivo sia nel caso di fonti lipidiche vegetali come l'olio di soia, sia animali, come strutto o grasso di pollo, come riportato da Zhang *et al.* (2011); in tal senso, gli autori hanno osservato un aumento dell'incremento ponderale medio giornaliero (IMPG) di broiler alimentati con 30g/kg di ciascuna fonte lipidica in aggiunta alla lisofosfatidilcolina, rispetto ad animali controllo.

8.3. Il glicerolo polietilenglicole ricinoleato

Questo emulsionante, un estere dell'ossido di etile, trova largo utilizzo nella medicina umana come eccipiente di numerosi farmaci; grazie alla sua natura tensioattiva, consente di migliorare la bagnabilità e quindi la disgregazione del prodotto solido, nonché di stabilizzare i farmaci somministrati in forma liquida (Mullertz *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda invece l'applicazione del glicerolo polietilenglicole ricinoleato in alimentazione animale, questo prodotto costituisce una possibile fonte sintetica per migliorare le performance produttive di polli da carne.

In tal senso, un studio condotto da Roy *et al.* (2010) ha mostrato come una supplementazione di 10g/kg di questo additivo sia in grado di aumentare il peso vivo degli animali. Simili risultati sono stati riscontrati in una recente prova *in vivo* condotta da Kaczmarek *et al.* (2015); gli autori hanno riscontrato migliori performance produttive (IMPG e ICA) e una maggiore digeribilità della frazione lipidica in broiler trattati con glicerolo polietilenglicole ricinoleato (0,04% SS) rispetto al controllo.

Questo emulsionante presente inoltre dei vantaggi tecnologici, in quanto favorisce la miscelazione di sostanze idrofile con materie prime lipofile. L'aggiunta di glicerolo

polietilenglicole ricinoleato, unitamente alle fonti lipidiche dei mangimi, garantisce un effetto legato delle differenti materie prime, migliorando la qualità del pellet e riducendo infine la polverosità del mangime stesso (Sevecom).

L'aggiunta di un additivo emulsionante, di origine naturale o di sintesi, riveste un ruolo di grande importanza nell'alimentazione dei polli da carne; inserito nelle diete di animali a rapido accrescimento consente di ottimizzare l'utilizzazione dei nutrienti, in particolare delle fonti lipidiche, migliorando infine le performance di crescita.

9. I polifenoli

I polifenoli costituiscono uno dei più numerosi gruppi di metaboliti secondari di un elevato numero di piante, se ne contano oltre 8000 composti (Figura 13; Sakakibara *et al.*, 2003); la principale funzione dei polifenoli è di protezione nei confronti dei radicali liberi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS), prodotti durante la fotosintesi (Ebrahimi and Schluesener, 2012). Per questo, tali sostanze vegetali possono essere considerate antiossidanti naturali in grado di agire nella prevenzione dell'ossidazione delle lipoproteine e nell'eliminazione dei radicali liberi.

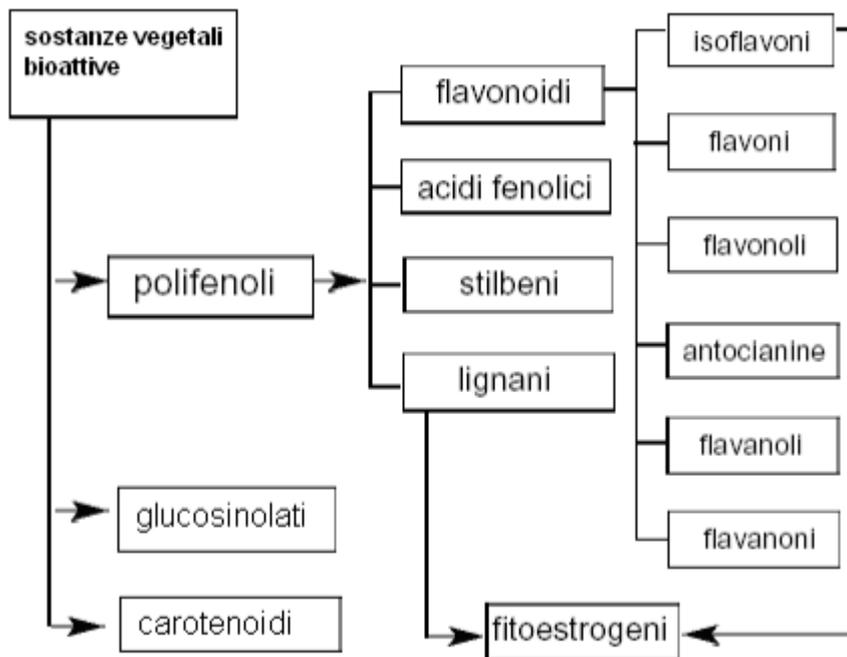


Figura 13. Classificazione delle principali sostanze bioattive presenti nei vegetali.

I polifenoli sono metabolizzati nello stomaco, nell'intestino tenue e crasso e nel fegato (Swanson, 2003) e il loro assorbimento dipende in gran parte dalla loro struttura chimica, ma normalmente è poco marcato. Da ciò è possibile dedurre che questi composti naturali vengono in parte utilizzati dalla flora microbica intestinale, sottraendoli di fatto all'organismo, o in parte eliminati attraverso la bile.

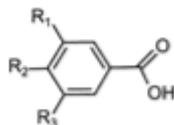
Mediamente, un individuo assume con la dieta 1g di polifenoli al giorno (Lotito and Frei, 2006), dove circa un terzo è rappresentato da acidi fenolici, mentre la rimanente parte è costituita da flavonoidi (soprattutto flavanoli e antocianine). La Tabella 34 riporta le principali fonti alimentari di polifenoli.

Tabella 34. Fonti alimentari di polifenoli.

Polifenoli	Fonte alimentare
<i>Acidi fenolici</i> (Ac. Caffeico; Ac tannico; Ac. Ferulico)	Frutta (mirtilli, fragola) tè, vino rosso, tuberi
<i>Flavonoli</i> (Quercitina)	Foglie di vegetali (broccoli ecc.), cipolla gialla, albicocca
<i>Flavoni</i>	Foglie di vegetali
<i>Isoflavoni</i> (genisteina, daidzeina)	Soia e derivati
<i>Antocianidine</i>	Alimenti color magenta (ciliegie ribes ecc.),vino
<i>Flavanoli</i> (catechine, epicatechine, epigallocatechine)	Tè verde, cioccolato, albicocca
<i>Stilbeni</i> (resveratrolo)	Vino rosso, arachidi

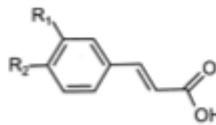
Da un punto di vista chimico, tutti i polifenoli contengono un anello fenolico aromatico con uno o più gruppi ossidrilici (–OH) che derivano dalla L-fenilalanina e dalla tirosina (Petti and Scully 2009); tuttavia la classe dei polifenoli è molto eterogenea e contiene diversi sottogruppi e la classificazione chimica più diffusa risale agli anni '80 del secolo scorso a opera di Jeffrey B. Harborne (Urquiaga and Leighton, 2005). In particolare, si distinguono quattro classi principali che comprendono la maggior parte per polifenoli presenti nel regno vegetale: *flavonoidi*, *acidi fenolici*, *stilbeni* e *lignani* (Figura 14).

Hydroxybenzoic acids



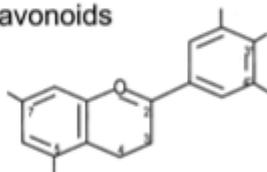
$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

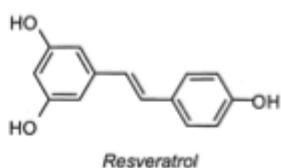


$R_1 = \text{OH}$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Caffeic acid
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Ferulic acid

Flavonoids



Stilbenes



Lignans

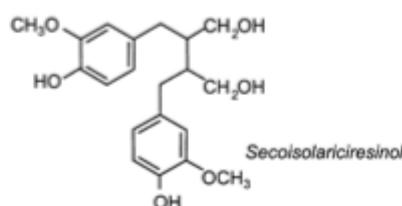


Figura 14. Principali classi di polifenoli con alcuni composti specifici (Manach, 2004).

9.1. Flavonoidi

Nel corso degli anni sono stati individuati oltre 4000 flavonoidi (Cheynier *et al.*, 2005), generalmente suddivisi in sei sottoclassi: flavoni, flavonoli, isoflavoni, flavanoni, antocianine e flavanoli; sulla base del numero, delle specifiche posizioni dei gruppi OH oppure della natura dei gruppi funzionali (Figura 15).

Dal punto di vista chimico sono difenilpropani distinti in varie classi a seconda del grado di ossidazione dell'anello eterociclico.

I *flavanoni* si trovano principalmente negli agrumi, tuttavia, il tè, verde o nero, rappresenta l'alimento più ricco di questi composti; i maggiori componenti di questa sottoclasse sono la naringenina e l'esperitina. I *flavonoli* come il canferolo, la quercitina e l'isoramnetina invece si ritrovano generalmente in tutti gli alimenti, ma in particolar modo nelle spezie, nei frutti di bosco e nel cacao (Andújar *et al.*, 2012). I *flavanoli* comprendono l'epicatechina, la galocatechina, l'epigallocatechina, l'epicatechina gallato e la procianidina. I polifenoli appartenenti alla classe delle *antocianine* (oltre 200) e delle *antocianidine*, rappresentano i pigmenti più comuni nel regno vegetale, sono responsabili dei colori rosso-violetti e si trovano in alcune bacche, nelle uve rosse, nei frutti di bosco, nelle ciliegie e in alcune varietà di patate a polpa pigmentata.

Un'altra classe di flavonoidi è rappresentata dagli *isoflavoni* che sono classificati come fitoestrogeni in quanto molto simili da un punto di vista strutturale agli estrogeni; questi si trovano principalmente nella famiglia delle leguminose.

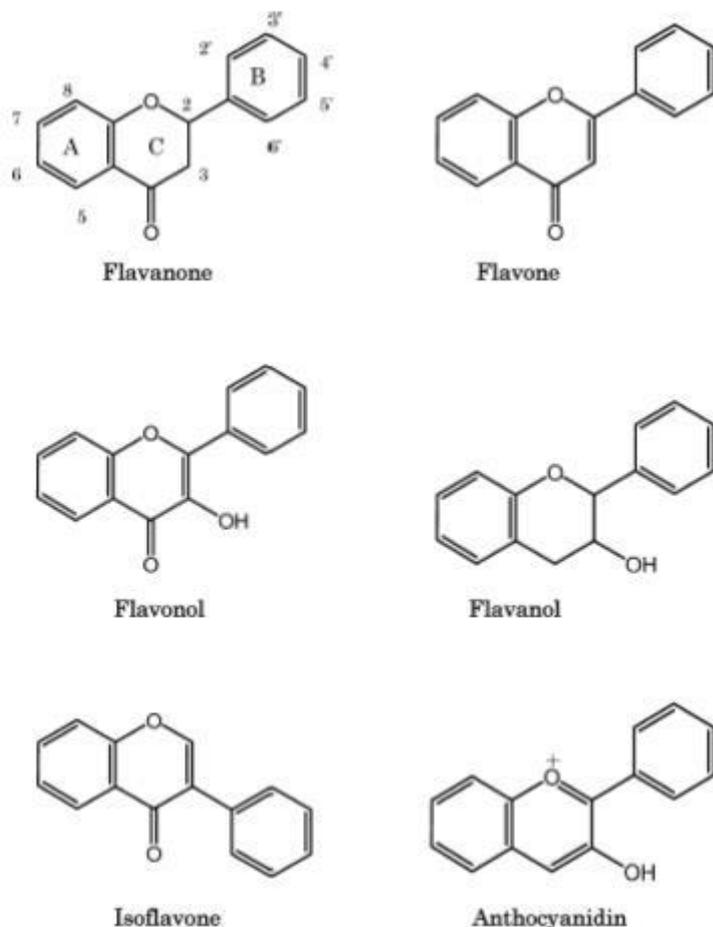


Figura 15. Principali categorie di flavonoidi (Ramassamy, 2006).

9.2. Lignani

Alla classe dei lignani appartengono le lignine, come ad esempio il lariciresinolo; questi composti sono stati ritrovati a concentrazioni elevate nei semi di lino e di sesamo (Tangney and Rasmussen, 2013), nonché negli oli extra vergini di oliva (Scalbert and Williamson, 2000).

9.3. Acidi fenolici

Gli acidi fenolici prevedono un'ulteriore classificazione in derivati dell'acido benzoico e derivati dell'acido cinnamico. I derivati di quest'ultimo, gli acidi idrossannicini si possono trovare in quantità rilevanti nel caffè, nelle noci, nelle prugne e nei mirtilli. Mentre frutta e verdura contengono molti acidi fenolici liberi, mentre nei cereali e in particolare nella crusca spesso sono presenti in forma legata (Kim *et al.*, 2009; Chandrasekara and Shahidi, 2010).

9.4. Stilbeni

La classe degli stilbeni è poco diffusa nel regno vegetale, ma è nota soprattutto per il resveratrolo (1,2 diariletene), la cui fonte principale è rappresentata dal vino rosso; tale sostanza è stata studiata per le sue proprietà antinfiammatorie (Basli *et al.*, 2012).

9.5. I polifenoli nel frutto di *Olea Europaea L.*

L'*Olea europaea L.*, comunemente detta olivo o ulivo, rappresenta uno dei più antichi alberi da frutto da sempre coltivati (Breton *et al.*, 2009); è inoltre considerata una tra le più importanti e diffuse coltivazioni arboree nel bacino del Mediterraneo (Conde *et al.*, 2008). Vi sono opinioni contrastanti riguardo alla sua possibile origine: alcuni studiosi ritengono sia sud caucasica risalente al 1500-3000 A.C, altri invece la considerano una pianta prettamente mediterranea (Riley, 2002). Dal punto di vista agronomico è una pianta sempreverde, appartiene alla famiglia botanica delle Oleaceae (Cabras and Martelli, 2004) ed ha sempre avuto un ruolo di grande importanza nella storia, sia legato alla simbologia religiosa, sia alle necessità mediche e nutrizionali dell'uomo (Raina, 2003). L'oliva è il frutto più estesamente coltivato in tutto il mondo e conta 9.490.000 ettari di superficie coltivata nel 2010 (FAOSTAT, 2012); la sua area di coltivazione si è triplicata negli ultimi 50 anni. La pianta dell'olivo si è ambientata molto bene nel Bacino del Mediterraneo soprattutto nella fascia che comprende Italia, sud della Spagna e della Francia, Grecia e alcuni Paesi mediorientali che si affacciano sul Mediterraneo (Marocco, Tunisia, Algeria, Egitto) (Figura 16).

Attualmente, Spagna, Italia e Grecia rappresentano i leader produttivi a livello mondiale. L'Italia occupa il secondo posto nel mondo, dopo la Spagna, con il 24% della produzione mondiale di olio d'oliva e 1.190.800.000 milioni di ettari di superficie coltivata nel 2010 (FAOSTAT, 2012).

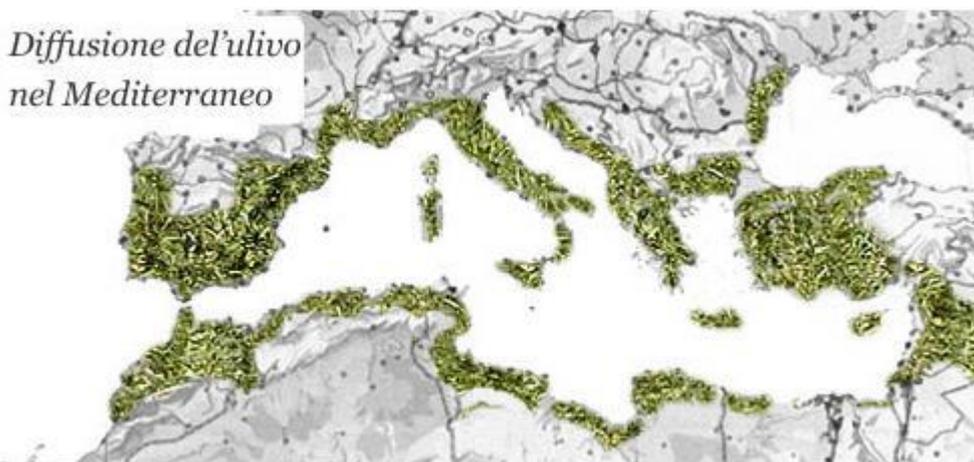


Figura 16. Diffusione territoriale di *Olea europaea L.*

In Italia, la pianta dell'olivo è coltivata sia a scopi economici che ambientali. In particolare, le olive da tavola e l'olio d'oliva, ricchi in acidi grassi monoinsaturi e composti fenolici, sono alimenti che apportano un importante valore nutrizionale aggiunto all'interno della Dieta Mediterranea (Bulotta *et al.*, 2014).

Il frutto dell'oliva è una drupa, cioè un frutto con nocciolo, di peso variabile tra 0,5 e 20 g, costituita dall'epidermide (epicarpo membranoso), dalla polpa (mesocarpo carnoso ricco di olio), dal nocciolo (endocarpo legnoso) ed infine più internamente dal seme (Figura 17). L'epicarpo è chiamato volgarmente buccia e rappresenta circa l'1-3% del peso totale della drupa (Rodríguez *et al.*, 2008). Tra le sue componenti vi sono la clorofilla, i carotenoidi e gli antociani che sono responsabili del colore.

Il mesocarpo, ovvero la polpa, rappresenta il 70-80% del frutto ed è la porzione utilizzata per la produzione dell'olio; l'endocarpo costituisce circa il 18% e il 22% del frutto intero e rappresenta la parte esterna del nocciolo. All'interno del nocciolo vi è la mandorla o seme (2,5-4% del peso).

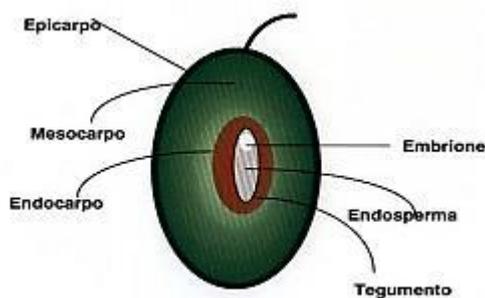


Figura 17. Composizione del frutto dell'oliva.

Esistono numerose varietà coltivate e ciò si traduce in un'elevata variabilità compositiva; tuttavia si possono distinguere le seguenti frazioni: l'olio che rappresenta il 22% dell'intera drupa, l'acqua (50%), le proteine (1,6%), i carboidrati (19,1%), la cellulosa (5,8%) e infine i minerali (1,5%).

I lipidi presenti nella drupa sono costituiti prevalentemente da trigliceridi, ma è possibile trovare basse percentuali di digliceridi, monogliceridi e acidi grassi liberi. Nel frutto si trovano anche limitate quantità di fosfolipidi e glicolipidi (Zamora *et al.*, 2001). L'oliva possiede dei composti idrosolubili quali zuccheri semplici (glucosio, fruttosio e saccarosio), acidi organici (acido citrico, acido malico e acido ossalico) e sostanze azotate, rappresentate soprattutto proteine. Nel frutto è poi presente una frazione insolubile di natura colloidale. I colloidi della drupa comprendono i componenti della parete cellulare o la lamella mediana (cellulose, emicellulose e pectine), proteine strutturali ed enzimatiche e fosfolipidi di membrana l'acido citrico, l'acido malico e l'acido ossalico (Rodríguez *et al.*, 2008) (Grafico 13).

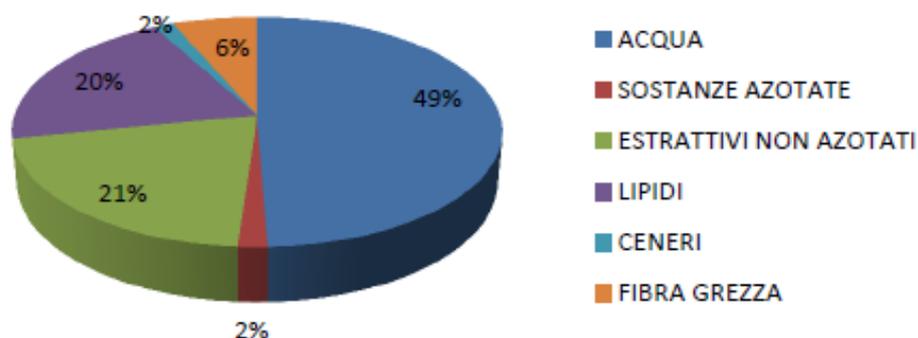


Grafico 13. Composizione della drupa d'oliva.

L'olio d'oliva ebbe un ruolo fondamentale nella storia non solo per l'uso alimentare, ma anche come liquido a cui medici illustri come Ippocrate e Galeno attribuirono proprietà terapeutiche e curative. In passato, queste proprietà sono state attribuite al suo elevato contenuto di acido oleico come fonte di acido grasso monoinsaturo (Cicerale *et al.*, 2010); tuttavia, diversi oli di semi (tra cui semi di girasole, di soia, di colza) contengono elevate quantità di acidi grassi monoinsaturi, ma risultano inefficaci nel modificare in modo benefico i fattori di rischio di malattie croniche (Harper *et al.*, 2006; Aguilera *et al.*, 2004). Tali proprietà benefiche sono quindi da attribuire ad altre sostanze, in particolar modo ai composti fenolici dell'olio d'oliva. Le sostanze fenoliche, presenti in grandi quantità nella buccia e nella polpa (Gucci *et al.*, 2004), sono importanti antiossidanti naturali, in grado di controllare ed eliminare le sostanze reattive dell'ossigeno (ROS), e in particolar modo i radicali liberi, principali responsabili dell'ossidazione a carico degli acidi grassi insaturi. La concentrazione di questi composti fenolici può variare tra l'1% e il 3% del peso della polpa fresca (Silva *et al.*, 2006).

Dal punto di vista qualitativo, all'interno nel frutto dell'olivo sono presenti diverse classi di composti fenolici: gli antociani, i flavonoli, i flavoni, gli acidi fenolici, i fenilalcoli, i secoiridoidi e i derivati dell'acido idrossicinnamico (Garcia-Salas *et al.*, 2010) come riportato in Tabella 35. Tra gli alcoli fenolici è possibile trovare il Tirosole [(p-idrossifenil) etanolo] o p-HPEA e idrossitirosole [(3,4- diidrossifenil) etanolo] o 3,4-DHPEA, tali composti sono presenti nei reflui della lavorazione del frutto (Mulinacci *et al.*, 2001). A tali sostanze sono associate proprietà antimicrobiche, ipoglicemiche, ipolipidiche e ipocolesterolemiche (Romero *et al.*, 2002).

Sono inoltre presenti alcuni flavoni, quali la luteolin-7-glicoside e la luteolin-5-glicoside (Silva *et al.*, 2006; Talhaoui *et al.*, 2015), nonché alcuni acidi fenolici come l'acido caffeico e l'acido ferulico.

I secoiridoidi sono presenti esclusivamente nella famiglia delle Oleaceae, a cui appartiene appunto l'Olea europea (Servili *et al.*, 2004); i principali secoiridoidi del frutto d'oliva sono l'oleuropeina e la demetiloleuropeina e si trovano nel mesocarpo (Raina, 2003). L'oleuropeina contribuisce al sapore amaro delle olive immature e, a seguito di ossidazione, determina il colore scuro del frutto (Raina, 2003). Infine il seme invece contiene il nuzhenide e basse

concentrazioni di oleuropeina e di demetiloleuropeina, (Rodríguez *et al.*, 2008; Servili *et al.*, 2004).

Tabella 35. *Principali composti fenolici presenti nell'oliva (modificato da Garcia-Salas et al., 2010).*

<i>Acidi fenolici:</i>	<i>Acidi fenolici:</i>
acido clorogenico	(3,4-Diidrossifenil) etanolo (3,4-DHPEA)
acido caffeico	(<i>p</i> -Idrossifenil) etanolo (<i>p</i> -HPEA)
acido <i>P</i> -idrossibenzoico	
acido vanillico	<i>Flavoni:</i>
acido siringico	quercetin-3-rutinoside
acido <i>p</i> -cumarico	
acido <i>o</i> -cumarico	<i>Flavonoidi:</i>
acido ferulico	luteolin-7-glucoside
acido benzoico	luteolin-5-glucoside
acido cinnamico	apigenin-7-glucoside
acido gallico	
	<i>Antocianine:</i>
<i>Secoiridoidi:</i>	cyanidin-3-glucoside
oleuropeina	cyanidin-3-rutinoside
dimetiloleuropeina	cyanidin-3-caffeygucoside
lingstroside	cyanidin-3-caffeylatinoside
nuzhenide	delphinidin-3-rhamosylglucoside-7-kyloside
<i>Derivati degli acidi idrossicinnamici:</i>	
verbascoside	

In aggiunta, l'epicarpo, la polpa e il seme contengono discrete concentrazioni di lipidi e acidi grassi, steroli, dialcoli triterpenici e frazioni di idrocarburi; all'interno di queste componenti del frutto dell'oliva è possibile riscontrare la presenza di 56 composti volatili (come la 3-vinilpiridina e la metilvinilpiridina), in particolare se si considerano determinate cultivar come la Lucca e la Mission (Raina, 2003).

9.6. Effetti benefici dei polifenoli sull'organismo

Le attività biologiche dei polifenoli sono molteplici, anche in relazione alla loro tendenza a reagire in forma ossidata con aminoacidi e proteine ed a formare complessi con altre molecole biologiche o sali minerali. La ricerca condotta in umana, supportata da studi in vivo e in vivo, ha dimostrato che i composti fenolici presenti nei vegetali possiedono importanti attività biologiche coinvolte nella prevenzione di malattie cronico-degenerative.

Per stabilire con precisione l'efficacia dei polifenoli nella prevenzione delle malattie e nel miglioramento della salute umana o animale è essenziale determinare la distribuzione di questi composti nella dieta, stimando il loro contenuto in ogni alimento e soprattutto individuare quale classe di polifenoli è la più importante all'interno della dieta. Risulta inoltre necessario

conoscere la biodisponibilità di tali composti e dei loro metaboliti, nelle varie matrici alimentari per valutare l'attività biologica; esistono tuttavia diversi fattori in grado di influenzare direttamente la biodisponibilità o indirettamente diminuendo il contenuto di polifenoli nei prodotti (Tabella 36).

Tabella 36. Fattori che incidono sulla biodisponibilità dei nutrienti (modificato da D'archivio et al., 2010).

<i>Fattori esterni</i>	Fattori ecologico/ambientali (esposizione al sole), disponibilità dell'alimento
<i>Fattori legati alla processazione dell'alimento</i>	Trattamenti termici, liofilizzazione, omogeneizzazione, metodo di cottura, preparazione conservazione
<i>Fattori legati all'alimento</i>	Matrice alimentare; presenza di fattori positivi o negativi che incidono sull'assorbimento
<i>Interazione con altri composti</i>	Legame con le proteina (albumine) o con polifenoli aventi le stesse proprietà
<i>Fattori legati ai polifenoli</i>	Struttura chimica, concentrazione iniziale nell'alimento
<i>Fattori legati all'ospite</i>	Fattori intestinali (flora batterica, attività enzimatica, tempo di transito) Fattori sistemici (sesso età, condizioni patologiche, condizioni fisiologiche e di salute generali)

9.6.1. Effetti neuroprotettivi

Reglodi *et al.* (2015) hanno dimostrato che i polifenoli possiedono proprietà neuroprotettive dovute alle loro azioni antiossidanti e antiinfiammatorie, ma anche per una loro influenza sul mantenimento dell'omeostasi mitocondriale. Danni ossidativi gravi possono provocare disfunzioni cellulari con il successivo instaurarsi di malattie neurodegenerative (Omar, 2010); in tal senso, le membrane mitocondriali, per la presenza del doppio legame carbonio-carbonio (C – C) nelle code lipidiche dei fosfolipidi, sono molto sensibili all'azione ossidante dei radicali liberi.

Bazoti *et al.* (2006) hanno riportato che l'oleuropeina è in grado di ridurre l'aggregazione del peptide β -amiloide, principale componente proteica delle placche senili che si formano durante malattia di Alzheimer. Uno studio sul modello murino, ha evidenziato il ruolo protettivo dei fenoli dell'olio extravergine di oliva sulla perossidazione dei lipidi. Topi alimentati a con olio extravergine di oliva (10%) ricco di fenoli (dose totale polifenoli/d = 6mg/kg) mostravano un miglioramento della memoria assimilabile ai livelli di animali giovani ed una ridotta compromissione della coordinazione motoria. Questi effetti potrebbero essere correlati ai ridotti livelli di perossidazione lipidica nel cervelletto secondo quanto riportato da Pitozzi *et al.* (2012). Un altro studio ha dimostrato che la somministrazione di olio vergine di oliva in topi aumentan i livelli di glutazione nel cervello migliorando l'apprendimento e la memoria (Farr *et al.*, 2012).

9.6.2. Attività antiossidante

Il danno ossidativo è implicato nello sviluppo di molteplici patologie malattie come il cancro e l'arteriosclerosi nonché di molti processi infiammatori di natura cronica. Le sostanze

antiossidanti presenti nella dieta possono proteggere il nostro corpo dagli agenti pro-ossidanti, responsabili dell'insorgenza di tali patologie.

Tra gli antiossidanti più noti, si ricordano la vitamina C, la vitamina E, i carotenoidi, alcuni minerali come lo Zinco e il Selenio, componenti essenziali di sistemi enzimatici endogeni ad azione antiossidante.

Il nuovo regolamento europeo sulle "indicazioni sulla salute negli alimenti" (Reg. UE 432/2012) stabilisce un livello minimo di 5mg di composti fenolici (idrossitirosole e suoi derivati) in 20g di olio extravergine di oliva per garantire il loro effetto antiossidante. L'azione antiossidante dei polifenoli è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche e si può manifestare come:

- reattività "spegnere" (quencer) l'ossigeno singoletto;
- neutralizzazione i radicali liberi (R) donando un atomo di idrogeno (RH) o un elettrone (R-);
- effetto chelante di ioni metallici in soluzioni acquose.

In alcuni studi è stata inoltre riportata la capacità di questi composti di agire come "spazzini" nei confronti degli ioni ferrici, ottenendo così un indice RACI- Relative Antioxidant Capacity Index estremamente elevato (Dekdouk *et al*, 2015). In dettaglio, per esplicitare la loro attività antiossidante i polifenoli devono formare dei radicali fenolici stabili, tramite delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche e alfa eliche (Figura 18).

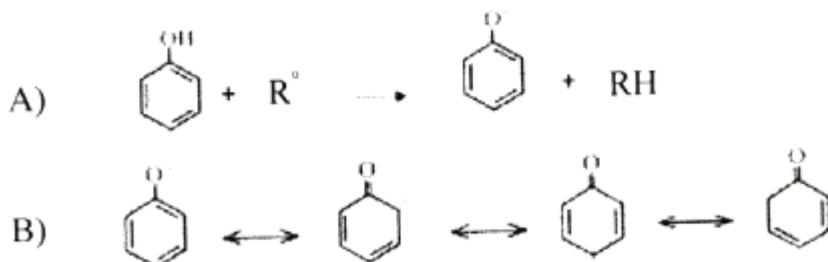


Figura 18. Reazione generica di un composto fenolico con un radicale libero (A); la delocalizzazione dell'elettrone dell'ossigeno sull'anello aromatico contribuisce alla stabilizzazione della nuova specie radicalica formata (B).

Oltre la presenza dei gruppi idrossilici, anche la posizione dei gruppi funzionali del composto risulta fondamentale per espletare l'attività antiossidante (Heim *et al.*, 2002); la configurazione idrossilica dell'anello B, ed in minor parte dell'anello A, dei polifenoli (Figura 19) gioca un importante ruolo nello "scavenging" delle specie reattive dell'ossigeno. Gli idrossili di tale anello cedono uno ione idrogeno o un elettrone ai radicali idrossilici, perossilici e perossinitriti, stabilizzandoli e trasformandoli in un radicale relativamente stabile.

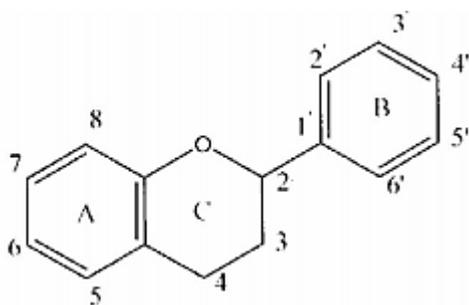


Figura 19. Struttura chimica dei polifenoli.

Oltre a contrastare i radicali liberi, i composti fenolici svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, un'azione antinfiammatoria, antibatterica, immunostimolante, antiallergenica, antivirale, estrogenica ed anticarcinogenica (Waladkhani and Clemens, 2001).

9.6.3. Protezione sul sistema cardiovascolare

Dati epidemiologici evidenziano una relazione positiva tra consumo di vegetali ricchi in polifenoli e la riduzione di patologie cardiovascolari. E' risaputo che le piastrine svolgono un ruolo chiave nello sviluppo di trombosi e sono pertanto coinvolte nello sviluppo di malattie cardiovascolari (Bhatt and Topol, 2003). In un recente studio è stato dimostrato che diversi composti fenolici presenti nell'olio d'oliva, come l'oleuropeina e la luteolina, risultano potenti inibitori dell'aggregazione piastrinica (fino al 75), ostacolando di conseguenza la comparsa di fenomeni trombotici (Dell'Aglio *et al.*, 2008).

Carluccio *et al.* (2003) hanno inoltre evidenziato un'azione di inibizione da parte dei fenoli nei confronti dei leucociti che aderiscono alla parete endoteliale vascolare, elemento fondamentale per la formazione della placca aterosclerotica.

Grazie alla loro abilità di "scavengers", i polifenoli sono in grado di inibire il processo di ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e contribuire di conseguenza alla riduzione della comparsa di malattie cardiovascolari. In dettaglio, i composti fenolici sono in grado di legarsi al colesterolo LDL e ciò potrebbe giustificare l'aumento della resistenza delle LDL all'ossidazione (De la Torre-Carbot *et al.*, 2007; Fito *et al.*, 2005; Vissers *et al.*, 2001; Coni *et al.*, 2000; Patrick and Uzick, 2001). In letteratura tuttavia sono riportati risultati contrastanti; tali prove *in vivo* suggeriscono che l'integrazione di olio di oliva non apporta effetti benefici nella riduzione dell'ossidazione delle LDL (Moschandreas *et al.*, 2002; Vissers *et al.*, 2001; Bonanome *et al.*, 2000).

9.6.4. Attività anti-cancerogena

The European Food Safety Authority (EFSA) ha confermato i benefici derivanti dall'assunzione quotidiana di 5mg di olio d'oliva nella protezione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) nei confronti dei processi ossidativi. In aggiunta, diversi studi epidemiologici

hanno dimostrato un'associazione tra il consumo di olio d'oliva e la riduzione del rischio di cancro a carico del seno (Escrich *et al.*, 2011), prostata (Hodge *et al.*, 2004), polmone, laringe (Bosetti *et al.*, 2002), ovaio (Bosetti *et al.*, 2002) e colon.

La proliferazione cellulare è il principale fattore responsabile della formazione e della progressione tumorale e studi condotti da Fabiani *et al.* (2006, 2009, 2011) e Mateos *et al.* (2013) illustrano che l'idrossitirosolo (HTy), il tirosolo e anche l'idrossitirosolo-acetato interagiscono nella trascrizione di geni coinvolti nell'apoptosi cellulare. Tale interazione sembra in grado di modulare i marker coinvolti nello sviluppo di forme cancerogene quali l'adenocarcinoma delle cellule Caco-2 intestinali umane. Lo studio di Salvini *et al.* (2006) ha dimostrato che l'assunzione di olio extra vergine ricco in composti fenolici riduce la comparsa di danni ossidativi a carico del DNA fino al 30%, l'evento precursore per la carcinogenesi.

9.6.5. Attività anti-infiammatoria

L'idrossitirosolo, abbondantemente presente nel frutto dell'oliva, è dotato di attività antiinfiammatoria, in quanto impedisce la formazione dei mediatori dell'infiammazione, soprattutto citochine e chemochine, nei macrofagi. A questo proposito, le molecole polifenoliche presenti nell'olio d'oliva riescono ad attenuare il processo infiammatorio, responsabile dell'insorgenza di patologie cardiovascolari ed aterogeniche.

Il potenziale anti-infiammatorio dei polifenoli è probabilmente dovuto alla modulazione degli enzimi della cascata dell'acido arachidonico come la prostaglandina ciclo-ossigenasi (COX) (Willenberg *et al.*, 2015), i leucotrieni B4 e l'istamina (Biesalski, 2007). In particolar modo, i leucotrieni B4 (LTB4) sono noti agenti pro-infiammatori e hanno un effetto sui neutrofili, indirizzando le cellule di tessuto danneggiato (Bogani *et al.*, 2007). Questi agenti infiammatori sono infatti responsabili dei caratteristici segni del processo infiammatorio, *dolor, calor e tumor* (Tiziani *et al.*, 2006). Bogani *et al.* (2007) hanno osservato una proporzionalità inversa tra la concentrazione di LTB4 e il tenore di composti fenolici dell'olio di oliva. Recentemente, in uno studio *in vivo*, è stato stabilito un particolare estratto di olio contenente circa il 20% di idrossitirosolo (HT-20) è in grado di inibire il gonfiore infiammatorio e l'iperalgisia nonché di sopprime le citochine pro-infiammatorie (Gong *et al.*, 2009).

9.6.6. Attività anti-microbica e anti-virale

Prove *in vitro* hanno consentito di studiare l'attività antimicrobica contro batteri, virus e protozoi di composti fenolici quali l'oleuropeina, il tirosolo e l'idrossitirosolo. In dettaglio, l'idrossitirosolo e l'oleuropeina hanno dimostrato avere proprietà antibatteriche contro *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, entrambi batteri Gram + e di *Escherichia coli* (Gram -) responsabili di infezioni intestinali e respiratorie (Medina *et al.*, 2006; Leouifoudi *et al.*, 2015). L'oleuropeina inoltre esercita un'attività sia nei confronti di batteri Gram - sia contro Gram +, tra cui *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis* (Cicerale and Russell, 2012). Idrossitirosolo e oleuropeina hanno mostrato effetti citotossici su un gran

numero di ceppi batterici; la presenza dell'oleuropeina in varie parti della pianta di olivo conferisce una resistenza naturale agli attacchi batterici.

L'azione inibitoria nei confronti dei virus è stata dimostrata in particolare per l'idrossitirosolo che può inattivare diverse varianti del virus dell'influenza A, tra cui H1N1, H3N2, H5N1 e sottotipi H9N2 (Yamada *et al.*, 2009). Inoltre sia l'idrossitirosolo sia l'oleuropeina sono stati identificati come di HIV-inibitori, impedendo al virus di entrare nella cellula ospite (Fernández-Bolaños *et al.*, 2012).

9.6.7. Attività sulle ossa

Puel *et al.* (2008) hanno valutato l'effetto dei composti fenolici dell'olio d'oliva sul tessuto osseo e hanno riportato che sia il tirosolo sia l'idrossitirosolo favoriscono un aumento della formazione ossea in modo significativo. In particolare, questi composti potrebbero rappresentare rimedi efficaci per il trattamento dei sintomi dell'osteoporosi. Un altro studio, sempre sul modello murino, ha evidenziato che oleuropeina e idrossitirosolo possono inibire la perdita di densità ossea, stimolando il deposito di calcio in maniera dose-dipendente (Hagiwara *et al.*, 2011).

9.7. Prodotti di scarto dell'estrazione dell'olio d'oliva

Un interessante fonte di polifenoli utilizzabile nell'alimentazione animale deriva dai prodotti di scarto della lavorazione delle olive per l'estrazione dell'olio e del loro possibile reimpiego come additivo.

La trasformazione olivicola applica diverse tecnologie di estrazione dell'olio, tra le quali le più diffuse sono la pressione, la centrifugazione in due o tre fasi (Figura 20) ed il percolamento mediante filtrazione selettiva.

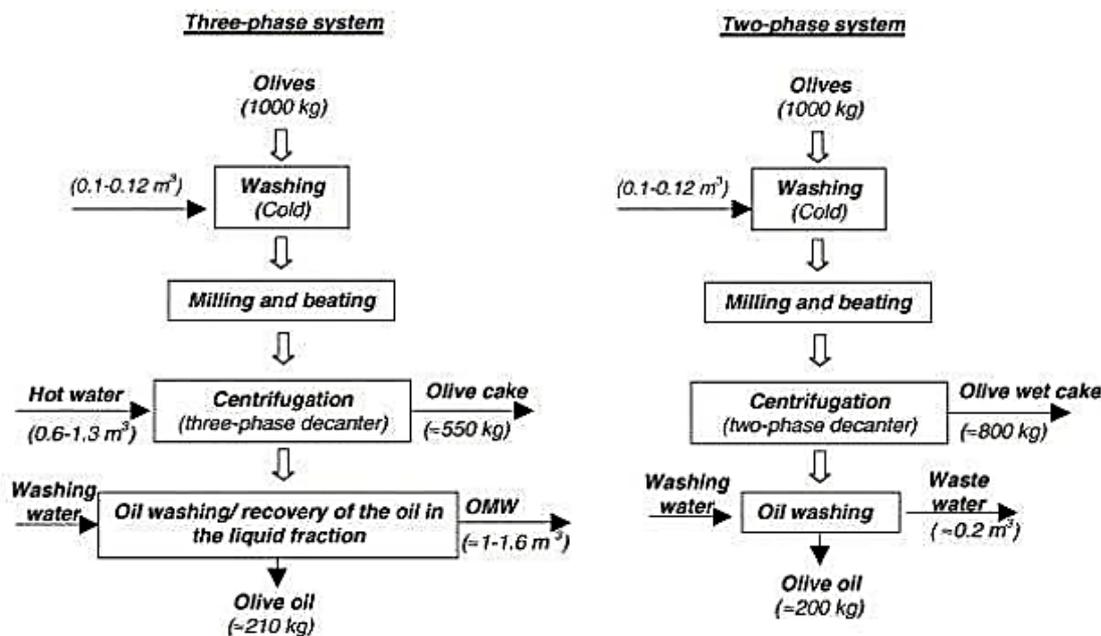


Figura 20. Schema del processo di estrazione a due o tre fasi (Alburquerque et al., 2004).

Indipendentemente dalla tecnica utilizzata, durante il processo produttivo si ottengono degli scarti, il cui smaltimento rappresenta un problema di carattere ambientale. Oltre ai quantitativi prodotti, il vero problema è rappresentato dal fatto che l'olio d'oliva è una produzione stagionale e ne consegue che gli scarti di lavorazione sono concentrati in un ridotto lasso di tempo e non diluiti uniformemente nell'arco dell'anno.

I sottoprodotti della lavorazione delle olive sono rappresentati dalla *sansa* di olive e dalle *acque di vegetazione* ed i principali problemi ambientali relativi lo smaltimento di questi sottoprodotti sono legati ai loro effetti inquinanti sulla fertilità del suolo e delle acque (Piotrowska et al, 2011; Sierra et al., 2001).

Sebbene in passato si pensava che l'utilizzazione agronomica dei reflui dei frantoi oleari potesse servire per reintegrare le perdite di sostanza organica dei suoli sottoposti ad agricoltura intensiva, con il tempo si è scoperto che tali prodotti, benché prive di sostanze pericolose (agenti patogeni, metalli pesanti, virus, etc.), rappresentano un problema per suolo e le acque in quanto ricche di composti organici (zuccheri, acidi organici e proteine), di diversi elementi naturali (potassio, fosforo e calcio), oltre a tannini, lignine e composti fenolici che sono tossici per i microrganismi e piante (Paixao and Anselmo, 2002; Paraskeva and Diamadopoulos, 2006). In tal senso, la tossicità sembra essere legata alla componente fenolica che viene persa in grandi quantità (> 98%) durante l'estrazione meccanica dell'olio di oliva; solo il 2,7% del totale fenolico contenuto del frutto viene rilasciato nella fase oleosa destinato all'alimentazione umana (Rodis et al., 2002) (Grafico 14).

Questi composti vengono quindi ad incidere sulla salubrità del terreno e delle colture, inoltre lo smaltimento delle acque di vegetazione provoca gravi problemi ambientali tra cui l'odore e l'inquinamento idrico in seguito a infiltrazioni sotterranee (Rinaldi *et al.*, 2003).

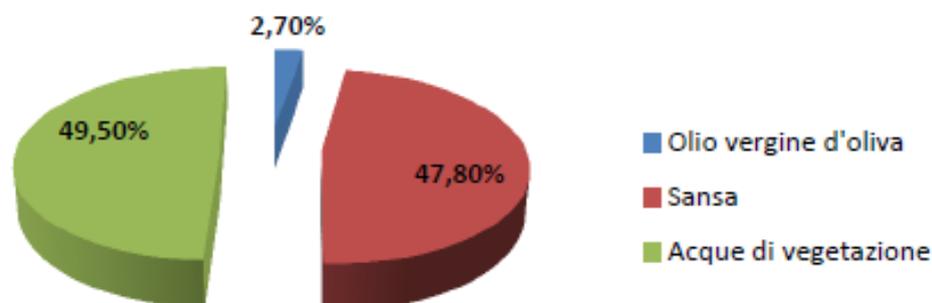


Grafico 14. Suddivisione della componente polifenolica dell'oliva nell'olio, nella sansa e nelle acque di vegetazione.

La concentrazione dei composti fenolici nelle acque di vegetazione sono variabili da 0,5 a 24g/L e sono rappresentati soprattutto da idrossitirosolo, tirosolo, acido vanillico e acido ferulico (Frankel *et al.*, 2013). Diversi autori hanno studiato le proprietà fitotossiche dei rifiuti del frantoio ed è emerso che tali residui hanno un elevato contenuto organico, la cui ossidazione chimica o biologica riduce il tenore di ossigeno nelle acque superficiali (Casa *et al.*, 2003; Obied *et al.*, 2005; Aliotta *et al.*, 2002; Fiorentino *et al.*, 2003; Kotsou *et al.*, 2004).

9.7.1. Valorizzazione dei rifiuti del frantoio e possibile utilizzo in alimentazione animale

Negli allevamenti intensivi gli animali tendono a essere più sensibili a stress esterni che si ripercuotono negativamente sul loro stato di salute e sulle performance produttive, con un conseguente aumento dei costi di produzione e un peggioramento della qualità del prodotto finale. In considerazione delle loro proprietà chimico-fisiche, i polifenoli potrebbero quindi rappresentare un'interessante integrazione nelle diete per animali, al fine di migliorare la salute generale degli stessi, ottimizzare le produzioni, ridurre l'impatto ambientale e offrire al consumatore prodotti di origine animale arricchiti con sostanze naturali benefiche.

Nel corso degli anni l'interesse nel considerare sansa e acque di vegetazione non come un prodotto di scarto da smaltire, ma come un sottoprodotto ricco di sostanze utili da utilizzare, riducendo nel contempo la tossicità ambientale, ha dato l'avvio a tecniche industriali per l'estrazione di questi composti. Tra queste ad esempio, le tecnologie di membrana (Microfiltrazione, Ultrafiltrazione, Nanofiltrazione e Osmosi Inversa) consentono l'estrazione di polifenoli da questi sottoprodotti e ne permettono il loro riutilizzo come fonte antiossidante nei prodotti alimentari, farmaceutici, nell'industria cosmetica o nella mangimistica.

L'interesse scientifico nei confronti dei polifenoli si è fortemente incrementato a partire dagli inizi del 1900; molti studiosi hanno valutato l'effetto di polpe d'oliva nell'alimentazione degli animali sia sulla salute e il benessere animale sia, di conseguenza, sui prodotti di origine animale. Dueñas *et al.* (2015) hanno confermato sia tramite studi *in vivo* sia *in vitro* che diete ricche di polifenoli sono in grado di modificare la popolazione microbica intestinale, riducendo la quantità di potenziali patogeni, in particolare i Gram-negativi della famiglia *Bacteroides spp.*, favorendo invece la proliferazione di batteri considerati benefici come Bifidobatteri e Lattobacilli. In particolare, come suggerisce Duda *et al.* (2015), l'aumento dei *Lactobacillus spp* potrebbe essere dovuta al fatto che tali microrganismi sono in grado di metabolizzare i composti fenolici e di trarre i benefici dalla biodisponibilità di glucosio.

A tale riguardo, risultano utili ulteriori approcci di investigazione genomica e proteomica per riuscire a individuare geni, o eventualmente altri micro-organismi coinvolti nella modulazione del microbiota intestinale da parte di questi composti (Dueñas *et al.*, 2015). Inoltre, è stato dimostrato che componenti bioattivi polifenolici possono avere una funzione inibitoria nei confronti della crescita di molti batteri intestinali tra cui *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli O157:H7*, *Salmonella typhimurium DT104*, *Listeria monocytogenes*. È possibile che l'integrazione con polifenoli nella dieta di animali da carne modifichi il prodotto finale; infatti accumulandosi nei tessuti sono in grado prevenire l'ossidazione dei lipidi insaturi nella carne e contribuire alla conservazione del valore dietetico-nutrizionale (Dal Bosco *et al.*, 2007).

L'utilizzo di concentrati ricchi di polifenoli ad esempio bucce d'oliva secche, sottoprodotti derivati dalle foglie di ulivo e dall'estrazione dell'olio d'oliva nell'alimentazione dei ruminanti potrebbe essere considerato interessante anche per la produzione lattiero-casearia perché in grado di aumentare la stabilità ossidativa di latte e formaggi, ma soprattutto le proprietà antiossidanti dei polifenoli potrebbero essere sfruttate per fronteggiare la condizione di stress ossidativo a cui gli animali ad alta produzione sono sottoposti durante la lattazione.

Sono ancora scarse le informazioni riportate in letteratura circa il passaggio dei polifenoli nel latte, specialmente per quanto riguarda la specie suina; l'assenza di queste informazioni è in parte legata alla complessità del loro processo di assorbimento e alla biodisponibilità dei polifenoli.

10. I probiotici

Negli ultimi anni, il mondo scientifico ha assistito ad un importante aumento degli studi relativi a probiotici e prebiotici; in particolar modo nell'ambito degli alimenti funzionali.

I probiotici sono definiti come microrganismi vivi, privi di patogenicità, in grado di influenzare positivamente l'ospite, migliorandone l'equilibrio microbico intestinale (Gatlin and Peredo, 2012).

Il bersaglio diretto dell'azione di questi alimenti funzionali è rappresentato dal tratto gastro-intestinale e la funzione è quella di promuovere la proliferazione e l'equilibrio della composizione batterica; tuttavia, gli effetti benefici riguardano l'intero organismo.

Il microbiota intestinale è costituito da centinaia di specie batteriche, le cui molteplici attività metaboliche influenzano lo stato di salute dell'ospite; in condizioni di stress psico-fisici, alimentari, ambientali, o in seguito all'assunzione di farmaci, si assiste ad uno sbilanciamento della microflora (disbiosi) che rende l'organismo suscettibile all'attacco di patogeni. In tal senso, l'alimentazione costituisce uno dei principali fattori, di natura esogena, in grado di influenzare la composizione quali/quantitativa della microflora intestinale (Vertuani *et al.*, 2001).

10.1. Benefici

La popolazione batterica intestinale e il suo equilibrio influenzano numerosi aspetti della fisiopatologia dell'ospite, come i processi digestivi, il metabolismo lipidico e la resistenza nei confronti di microrganismi patogeni. In aggiunta, la flora microbica simbiote è in grado di manifestare diverse attività benefiche su organi e tessuti, indipendentemente dalle modalità e vie di somministrazione. Quest'ultimo effetto potrebbe essere dovuto dalla capacità dei probiotici di implementare l'immunocompetenza della mucosa intestinale e di regolare la permeabilità della parete intestinale, che in situazioni patologiche, può provocare l'introduzione di patogeni nel circolo sanguigno (Schrezenmeir and de Vrese, 2001).

Il presupposto alla base dell'attività di un probiotico è la resistenza all'attacco degli acidi a livello gastrico, che consente al pool batterico di conservare la vitalità, condizione fondamentale per l'espletamento della loro azione nell'intestino crasso.

Attualmente i probiotici vengono prevalentemente consumati come latticini, quali yogurt e latte fermentato, o attraverso l'assunzione di preparati liofilizzati. Le preparazioni probiotiche presenti sul mercato, contengono miscele prevalentemente costituite dai generi *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaris*) *Bifidobacterium* (*B. bifidum*) e *Streptococcus* (*S. termophilus*), in quanto costituiscono i componenti più rappresentativi della microflora intestinale. Il notevole interesse rivolto a questo argomento è confermato dalla letteratura scientifica riguardante le potenzialità terapeutiche di questi prodotti (de Roos and Katan, 2000).

Proprietà detossificanti

L'intestino rappresenta un organo centrale nel processo di detossificazione dell'organismo, sia come barriera meccanica che immunologica; per questo motivo, i probiotici vengono considerati agenti detossificanti in grado di contrastare l'azione patogena delle tossine attraverso la degradazione di amine cancerogene oppure attraverso la diminuzione dell'attività di enzimi cancerogeni, quali ad esempio la β -glucuronidasi, l'azoreduttasi o la nitroreduttasi (Jin *et al.*, 2000).

Miglioramento dell'intolleranza al lattosio

L'intolleranza al lattosio è un problema che colpisce circa il 70% della popolazione mondiale ed è determinato da una bassa attività dell'enzima β -galattosidasi a livello della mucosa intestinale, che rende il lattosio non digeribile. I probiotici, ed in particolare i lattobacilli, presentano un'elevata attività β -galattosidasi, responsabile della conversione del lattosio in glucosio e galattosio, facilmente digeribili e metabolizzabili da parte dell'organismo.

Uno studio clinico, condotto su soggetti intolleranti al lattosio, ha riportato una significativa riduzione della sintomatologia provocata dall'intolleranza in seguito all'assunzione di yogurt contenenti elevata quantità di probiotici (de Vrese *et al.*, 2001).

Immunomodulazione

Uno sviluppo interessante degli ultimi anni ha riguardato l'attività dei probiotici a livello immunitario, nello specifico sull'immunità umorale, cellulo-mediata e aspecifica (Erickson and Hubbard, 2000;).

Per quanto riguarda la risposta di tipo umorale, numerosi studi scientifici evidenziano che un trattamento con probiotici del tipo *L. Casei* e *L. acidophilus* determinano un aumento della sintesi di IgA, che migliora la funzione di barriera dell'intestino. Un aspetto interessante della modulazione del sistema immunitario da parte dei probiotici, è la loro capacità di influenzare la risposta mediata dalle cellule T nell'epitelio intestinale attraverso la produzione di citochine. Inoltre è stato evidenziato che i lactobacilli sono in grado di stimolare l'attività dei macrofagi verso differenti specie di batteri (Isolauri *et al.*, 2001). Gli autori ritengono che l'effetto sia determinato dall'assorbimento di un antigene solubile attraverso le pareti intestinali o dalla traslocazione dei lattobacilli nel flusso sanguigno.

Attività ipocolesterolemizzante

L'azione ipocolesterolemizzante dei probiotici è oggetto di controversie, in quanto esistono recenti studi che confermano la capacità dei probiotici di ridurre il colesterolo ematico (Agerholm-Larsen *et al.*, 2000; Taranto *et al.*, 2000); tuttavia, la letteratura riporta anche lavori che non hanno evidenziato alcun effetto significativo (de Roos and Katan, 2000).

Attività antiinfettiva naturale

Un'importante applicazione dei probiotici avviene nella prevenzione delle infezioni opportunistiche, conseguenti all'utilizzo di antibiotici. Durante le terapie antibiotiche, una parte considerevole della microflora intestinale viene distrutta e questa situazione può provocare l'instaurarsi di condizioni favorevoli allo sviluppo di organismi patogeni, quali *Candida albicans* e *Clostridium difficile*, che possono portare ad infezioni, sepsi, coliti e diarrea. Numerosi studi confermano che l'assunzione di probiotici in concomitanza ad una terapia antibiotica sia in grado di ridurre l'incidenza di infezioni opportunistiche e di ripristinare in tempi più rapidi l'assetto fisiologico della microflora intestinale (Vertuani *et al.*, 2001).

Studi *in vitro* hanno evidenziato che i lattobacilli sono in grado di produrre sostanze ad attività antibiotico-simile nei confronti di microrganismi patogeni. Numerosi lavori riportano l'attività antimicrobica dei probiotici contro la *Candida albicans*, grazie all'azione di sostanze tossiche rilasciate dai lattobacilli, quali l'acido lattico e il perossido di idrogeno (Kohler *et al.*, 2012). Inoltre, è stato dimostrato che l'utilizzo di probiotici sia in grado di ridurre la severità e la durata delle forme diarroiche di origine virale nei bambini (Davidson and Butler, 2000).

Attività chemiopreventiva

Allo stato attuale delle conoscenze, l'unica azione di carattere chemioprotettivo riportata riguarda l'attività preventiva dei probiotici sulla riduzione del rischio di sviluppo del cancro al colon.

Gli studi sono stati condotti su modelli animali e hanno evidenziato la diminuzione di marker tumorali specifici in seguito alla somministrazione di lattobacilli e bifidobatteri, previo trattamento con cancerogeni chimici (Hirayama and Rafter, 2000). Gli autori sostengono che tale attività protettiva sia data dalla capacità dei lattobacilli di sopprimere la crescita di quelle specie batteriche in grado di convertire i pro-cancerogeni in cancerogeni; questa proprietà potrebbe quindi determinare la riduzione della concentrazione di sostanze cancerogene nell'intestino. E' inoltre riportata un'attività di sequestro di composti potenzialmente mutageni a livello intestinale da parte dei lattobacilli, diminuendo così il rischio di assorbimento di tali sostanze (de Roos and Katan, 2000).

Sull'uomo non esistono ancora evidenze sperimentali dirette, tuttavia i presupposti per considerare i probiotici potenzialmente utili nella prevenzione delle patologie neoplastiche incoraggiano il proseguimento delle ricerche.

10.2. Tecnologia e utilizzazione

In commercio esistono diversi prodotti derivati del latte che contengono ceppi probiotici selezionati, ma dal momento che contengono microrganismi vivi e hanno rapida degradabilità, sono importanti le modalità di conservazione e di assunzione. Vanno consumati il più possibile freschi di produzione e appena tolti dal frigorifero, per garantire la massima concentrazione di

batteri vitali. Per ovviare a questi ‘inconvenienti’, la ricerca ha consentito di selezionare ceppi probiotici di eccellente qualità, in termini di stabilità e sicurezza, e disponibili come liofilizzati utili per la preparazione di formulati. In aggiunta, l’impiego di queste tecnologie hanno consentito di ottenere fermenti resistenti ai succhi gastrici e biliari, permettendo così l’assunzione di dosaggi più ridotti, con consistenti vantaggi economici per l’utente (Vertuani *et al.*, 2001).

10.3. Utilizzo in zootecnia

Come riportato nei precedenti capitoli, il Regolamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio rappresenta la vigente normativa in tema di additivi destinati all'alimentazione animale e, in accordo con la classificazione riportata nell'Articolo 6, i probiotici rientrano tra gli additivi zootecnici, grazie al loro effetto benefico a livello di modulazione della flora intestinale.

L’utilizzo di tali additivi nella pratica zootecnica risulta particolarmente interessante in quanto sono organismi o sostanze generalmente presenti in natura e quindi caratterizzati dalla totale assenza di rischi per l’animale, il consumatore e l’ambiente; la Tabella 37 riporta i probiotici più utilizzati in alimentazione animale.

I probiotici sono bioregolatori della flora del tratto digerente e il loro utilizzo ottimizza i processi di digestione ed assorbimento dei nutrienti, con il conseguente miglioramento delle prestazioni zootecniche (efficienza alimentare, velocità di accrescimento, ecc.).

In alimentazione animale vengono impiegati a questo scopo sia batteri sia lieviti vivi e i risultati migliori si hanno in corrispondenza di fasi produttive particolari riconducibili a:

- periodi “critici” della vita dell’animale: le prime fasi produttive o lo svezzamento che rappresenta il momento della colonizzazione intestinale;
- stress ambientale: condizioni igienico-sanitarie non favorevoli caratterizzate da un’elevata carica microbica, sbalzi di umidità e temperatura o brusche variazioni della dieta.

I probiotici contribuiscono quindi ad evitare il rischio di residui nei prodotti zootecnici e nell’ambiente e lo sviluppo di farmacoresistenza, migliorando così la qualità dei prodotti, l’impatto ambientale e la salute del consumatore.

Questi additivi hanno però dei limiti; non si riscontrano risposte zootecniche univoche, ma estremamente variabili sulla base del momento di utilizzo e dell’ambiente di produzione, la stabilità nei mangimi (trattamenti tecnologici, presenza di altri additivi o farmaci), i costi dei prodotti ed infine la gestione del loro impiego.

Tabella 37. Classi di probiotici maggiormente utilizzati in alimentazione animale.

Probiotici	
Lactobacilli	<i>L.acidophilus, L.casei, L.delbrueckii subsp. Bulgaricus, L.reuteri, L.brevis, L.cellobiosus, L.fermentum, L.plantarum</i>
Cocci gram-positivi	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris, Streptococcus salivarius subsp.thermophilus, Enterococcus faecium, S.intermedius</i>
Bifidobacteria	<i>B.bifidum, B.adolescentis, B.animalis, B.infantis, B.longum, B.thermophilum</i>
Miceti	<i>Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus niger, A. oryzae</i>

11. Scopo dell'elaborato

La sicurezza dei mangimi destinati alle specie di interesse zootecnico è fondamentale per la loro salute, l'ambiente e la sicurezza dei prodotti alimentari di origine animale destinati al consumatore. La scelta del tipo di mangime dipende da una serie di fattori, tra cui la specie e l'età degli animali, l'indirizzo produttivo (carne, latte o uova), la disponibilità e il valore nutritivo dei mangimi; da un punto di vista generale, tutti i mangimi sono composti da foraggi (fieno, paglia e insilati) e concentrati (granaglie e fonti lipidiche), in genere costituiti da miscele di ingredienti tra cui gli additivi.

Gli additivi svolgono un ruolo determinante nella moderna zootecnia e costituiscono uno dei temi principali del quadro normativo dell'UE; si tratta di prodotti che migliorano le caratteristiche dei mangimi, ad esempio per renderli più appetibili o più digeribili da parte dell'animale. La legislazione europea in materia di alimentazione animale contiene norme sulla circolazione e l'utilizzo di materie prime per mangimi, requisiti d'igiene alimentare, norme sulle sostanze indesiderabili negli alimenti per animali, disposizioni sugli alimenti e i mangimi geneticamente modificati e condizioni d'impiego degli additivi destinati all'alimentazione animale.

All'interno di questo scenario, il presente lavoro si propone di illustrare come sia possibile attraverso una corretta nutrizione animale ottenere da un lato ottimali condizioni di benessere delle specie allevate, assicurando nel contempo un adeguato livello produttivo, parametri che concorrono a garantire la sostenibilità e la redditività delle aziende zootecniche, e dall'altro migliorare le caratteristiche qualitative dei prodotti di origine animale con il fine ultimo di offrire al consumatore alimenti che rispecchino i requisiti di sicurezza e salubrità e presentino inoltre un ottimo valore nutrizionale.

Sono stati effettuati quattro differenti studi *in vivo* per valutare gli effetti positivi della somministrazione di additivi nell'alimentazione animale sui principali parametri di interesse zootecnico.

I. La prima prova sperimentale prevedeva l'integrazione di glicerolo polietilenglicole ricinoleato, un agente emulsionante di origine sintetica, nell'allevamento del pollo da carne. La somministrazione di tale additivo nelle prime fasi dell'allevamento avicolo risulta fondamentale per sopperire all'inefficiente funzionalità enzimatica digestiva e massimizzare l'utilizzo delle fonti lipidiche presenti nelle diete, garantendo quindi migliori accrescimenti. Il presente studio si proponeva quindi di valutarne gli effetti dell'integrazione dell'emulsionante attraverso l'alimento sulle performance di crescita, sul profilo biochimico plasmatico e sulle caratteristiche delle carni avicole. Per poter meglio comprendere i meccanismi di azione a livello molecolare, sono stati scelti ed analizzati

alcuni geni coinvolti nel metabolismo lipidico al fine di determinare se l'aggiunta dell'additivo potesse modificare l'espressione genica a livello epatico.

- II. La seconda prova sperimentale ha valutato gli effetti della somministrazione di un estratto di oliva ad elevato tenore di polifenoli sulle performance di crescita di polli da carne. L'additivo in oggetto è stato estratto dai tessuti del frutto dell'oliva (*Olea europaea*) attraverso un processo ecosostenibile che utilizza tecnologie di membrana e cromatografia liquida di assorbimento su resina. Durante lo studio sono stati analizzati i principali parametri qualitativi delle carni avicole, le popolazioni microbiche intestinali e l'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi; inoltre, a partire da campioni di tessuto epatico, è stata effettuata l'estrazione e la quantificazione dei polifenoli al fine di stabilire un possibile meccanismo di accumulo di tali composti in sede epatica. A conclusione di questo studio, è stato deciso di approfondire il ruolo dell'estratto di oliva ad elevato tenore di polifenoli nella specie suina, ed in particolare in due fasi critiche dell'allevamento di questa specie, ossia il periparto e lo svezzamento. In tal senso, dopo aver opportunamente calibrato la dose del prodotto sulla base del differente peso vivo degli animali, è stata messa a punto la III prova sperimentale.
- III. La terza prova sperimentale ha previsto l'utilizzo dello stesso additivo, oggetto della precedente sulla specie avicola, all'interno del ciclo produttivo del suino. Nello specifico, lo studio è stato suddiviso in due fasi; durante la prima fase, il prodotto è stato somministrato alle scrofe, da due settimane prima del parto e per l'intera durata della lattazione, al fine di valutare gli effetti sulle performance riproduttive e sulla condizione corporea delle stesse e delle nidiate. Durante questa fase, grande attenzione è stata posta sul latte delle scrofe come vettore del composto somministrato o di alcune sue frazioni ai suinetti; per questo motivo, sono state effettuate analisi specifiche per determinare la concentrazione di polifenoli totali e l'attività antiossidante. La seconda fase coinvolgeva invece i suinetti, a cui è stato somministrato lo stesso prodotto per studiare gli effetti a medio-lungo termine dell'integrazione dell'estratto di oliva sulle performance di crescita e lo stato di salute degli stessi.
- IV. L'ultima prova sperimentale è stata effettuata su polli da carne e si proponeva di studiare gli effetti della supplementazione di un probiotico sui parametri produttivi, sulle popolazioni microbiche intestinali e sulle principali caratteristiche delle carni avicole. L'integrazione con probiotici è una pratica ormai consolidata nell'allevamento avicolo; tuttavia il prodotto in esame era caratterizzato da un particolare processo di sintesi rispetto ai classici additivi. L'additivo era infatti costituito da una combinazione di due ceppi di lattobacilli (*L. farmaciminus* e *L. rhamnosus*) trattati termicamente e sintetizzati a partire da un substrato di latte fermentato.

Parte sperimentale

12. I prova sperimentale: Valutazione dell'integrazione di un emulsionante sintetico nell'allevamento del pollo da carne

12.1. Introduzione

Le moderne tecniche di allevamento prevedono l'impiego di ibridi commerciali con elevate performance di crescita ed un ciclo produttivo molto ridotto. Risultano quindi di fondamentale importanza formulazioni dietetiche con alte concentrazioni di energia, al fine di garantire un corretto apporto calorico. Inoltre, dato il limite fisiologico dei polli commerciali di sintetizzare le lipasi nei primi giorni di vita, l'industria mangimistica ha rivolto notevole attenzione all'impiego di emulsionanti come additivi per le diete di questi animali.

In tal senso, gli emulsionanti rientrano nel Regolamento Europeo 1831/2003, che definisce l'utilizzo degli additivi in alimentazione animale, dove vengono definiti come "sostanze che rendono possibile la formazione o il mantenimento di una miscela omogenea di due o più fasi immiscibili nei mangimi".

Gli emulsionanti svolgono un importante ruolo nella digestione dei lipidi; normalmente, negli individui adulti, i lipidi della dieta vengono idrolizzati dalle lipasi pancreatiche ed emulsionati dai sali biliari in sede duodenale al fine di renderli solubili e consentirne infine il corretto assorbimento da parte dell'enterocita.

Nello specifico, l'azione delle lipasi permette di scindere la massa lipidica in piccole particelle, che verranno poi a legarsi con i sali biliari. Questi sono delle molecole anfipatiche, formate da una parte polare idrofila e una apolare lipofila, in grado di creare una miscela stabile tra le goccioline lipidiche neoformate ed i liquidi intestinali, garantendo un'ottimale assorbimento.

Addizionando alla dieta sostanze emulsionanti, si garantisce quindi una migliore fisiologia digestiva dei grassi, assicurando un maggior utilizzo delle fonti lipidiche a scopi energetici da parte dell'animale.

Se questa pratica garantisce da una parte la corretta digestione dei lipidi negli animali adulti, risulta di estrema importanza negli individui giovani in cui il metabolismo di tali nutrienti non è ancora totalmente funzionante.

Da un punto di vista fisiologico, l'introduzione di fonti alimentari nella dieta dei polli da carne avviene parallelamente, e concorre, allo sviluppo morfologico del tratto gastro-enterico con particolare riferimento alla formazione del corredo enzimatico (Al-Marzooqi and Leeson, 2000).

Nello specifico, la concentrazione e la secrezione delle lipasi nei sali biliari dei pulcini durante la prima settimana di vita risulta limitata e non completamente adeguata alla digestione dei lipidi (Sklan and Noy, 2000).

Tuttavia, nella pratica zootecnica, le formulazioni dei mangimi per i broiler prevedono l'inclusione di fonti lipidiche, strutto o grasso avicolo per quanto riguarda le fonti animali e olio di soia per quelle vegetali, al fine di incrementare il valore energetico della razione e dunque supportare in maniera efficace gli elevati ritmi di crescita degli animali.

Per ottimizzare l'utilizzazione di tali alimenti da parte dei polli da carne ed evitare quindi che i grassi non vengano metabolizzati, è prevista l'integrazione di emulsionanti, di origine naturale come la lecitina di soia o di sintesi come la lisolecitina, la lisofosfatidilcolina o il glicerolo polietilenglicole ricinoleato (Soares and Lopez-Bote, 2002; Zhang *et al.*, 2011).

Come riportato nel capitolo 8, gli emulsionanti normalmente usati nelle formulazioni delle diete per polli da carne si possono suddividere in due gruppi:

- naturali: prodotti endogeni come la bile o prodotti vegetali come la lecitina di soia;
- sintetici: lisolecitina, lisofosfatidilcolina e glicerolo polietilene ricinoleato.

L'aggiunta di un additivo emulsionante, di origine naturale o di sintesi, riveste un ruolo di grande importanza nell'alimentazione dei polli da carne; inserito nelle diete di animali a rapido accrescimento consente di aumentare la digeribilità di grassi e minerali, migliorando il peso vivo, l'indice di conversione alimentare, la metabolizzazione degli alimenti e la ritenzione dei minerali (Roy *et al.*, 2010).

L'emulsionante oggetto di studio AVI-MUL TOP (AMT) è un prodotto attualmente in commercio, prodotto dalla SEVECOM S.P.A. (Milano) e registrato come additivo tecnologico nel "Registro Comunità europea additivi per mangimi "ai sensi del regolamento (UE) n° 1831/2003.

AVI-MUL TOP GP10 è un acido oleico vegetale bi-distillato emulsionato con E484, in dettaglio, la formulazione comprendeva 45% di acido oleico bidistillato di origine vegetale emulsionato, 45% di olio di ricino etossilato, appartenente alla famiglia dei gliceril-polietilenglicole ricinoleato e il rimanente 10% di propandiolo, utilizzato come solvente.

La Figura 21 evidenzia la struttura del ricinoleato dell'olio di ricino, in cui è possibile notare la fase idrofilica all'esterno, la fase idrofobica all'interno e il surfactante, responsabile della formazione del film.

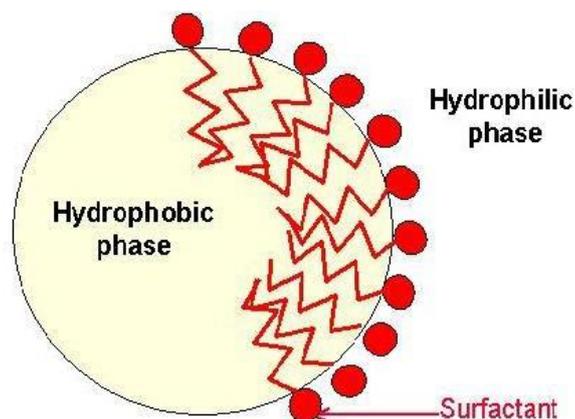


Figura 21. Struttura del ricinoleato di ricino

Il gliceril polietilenglicol ricinoleato (E484) o "olio di ricino di polietilenglicole (PEG X)" si ottiene miscelando l'ossido di etilene, da 6,5 a 200moli, con una mole di olio di ricino in condizioni controllate. I principali composti che si formano dalla reazione sono esteri tri-ricinoleati di glicerolo etossilato; dalla reazione è possibile riscontrare la presenza di ridotte quantità di ricinoleati poliossietilenici, gliceroli etossilati e glicoli polietilenici.

L'olio di ricino è un trigliceride estratto dai semi della pianta *Ricinus communis* ed è principalmente composto da acido ricinoleico (>85%) con quantità minori di acido palmitico, oleico, linoleico, linolenico, diidroossistearico e aracidico. In Tabella 38 sono riportate le specifiche tecniche dell'additivo utilizzato.

Tabella 38. Caratteristiche tecniche dell'additivo emulsionante utilizzato

Parametro	Range
Valore di saponificazione	16 - 162mg KOH/g
pH	5.5 - 7.5
Acidità	0 - 2mg KOH/g
Umidità	0 - 3%

L'additivo può essere incorporato direttamente nel mangime o attraverso premiscele. Ad oggi non sono presenti livelli di inclusione minimi o massimi raccomandati, tuttavia la concentrazione tipicamente utilizzata è compresa tra 10 e 20g di E484/kg di mangime. (European Union Reference Laboratory for Feed Additives, 2013).

Il prodotto oggetto della prova *in vivo* presenta le seguenti proprietà:

- migliora le proprietà di miscelazione di sostanze idrofile e lipofile;
- modifica la tensione superficiale di grassi e oli;
- migliora la penetrazione dei grassi nel pellet e previene l'adesione del pellet al silos durante lo stoccaggio;
- migliora l'assunzione dei grassi specialmente nelle prime fasi di crescita degli animali;

- riduce significativamente il malassorbimento e gli episodi di diarrea indotti dalla dieta;
- riduce la corrosione dovuta ai metalli presenti negli impianti di lavorazione;
- aiuta ad ottenere dei pellet gommosi ed elastici che sono preferiti dagli animali giovani;
- migliora la miscelazione dei diversi componenti della dieta liquida;
- riduce il consumo di energia e i costi di produzione;
- contribuisce all'ottenimento di "performance" più omogenee;
- riduce la polverosità del mangime;
- è un prodotto tecnologico molto versatile;
- aumenta la "shelf life" del mangime (SEVECOM).

La prova sperimentale è stata condotta al fine di valutare l'effetto dell'aggiunta di un emulsionante (ricinoleato dell'olio di ricino) nella dieta basale di broiler sulle performance di crescita e sul profilo biochimico plasmatico, con l'obiettivo di valutare gli effetti di tale integrazione alimentare sull'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico epatico.

12.2. Materiali e metodi

La seguente prova sperimentale è stata condotta da Ottobre a Novembre 2015 presso il Centro Zootecnico Didattico Sperimentale (CZDS) dell'Università degli Studi di Milano, in Lodi, previa revisione e approvazione del protocollo sperimentale da parte del Comitato Etico di Ateneo.

12.2.1. Animali e stabulazione

Per l'espletamento della seguente prova *in vivo* sono stati utilizzati 1200 pulcini broiler ROSS 308, equamente suddivisi tra maschi e femmine, provenienti dall'incubatoio dell'Allevamento "Pollo Monteverde", (Ospitaletto, BS) a un giorno d'età, già vaccinati contro la malattia di Marek, di Newcastle e contro la bronchite infettiva direttamente in incubatoio, prima dell'invio al CZDS.

All'arrivo al Centro Zootecnico, definito come giorno 0 della prova sperimentale, è stata effettuata una valutazione dello stato generale di salute degli animali, al fine di escludere dalla prova i soggetti che si presentavano sottopeso, ipovitali o con evidenti problemi articolari, dunque tutti i pulcini sono stati pesati e assegnati in maniera random ad uno dei quattro gruppi sperimentali.

Ogni gruppo era costituito da 12 recinti (repliche), delle dimensioni di 2,5m x 1,00m, e permetteva la stabulazione di 25 animali ciascuno, per un totale di 300 pulcini per gruppo (Figura 22).

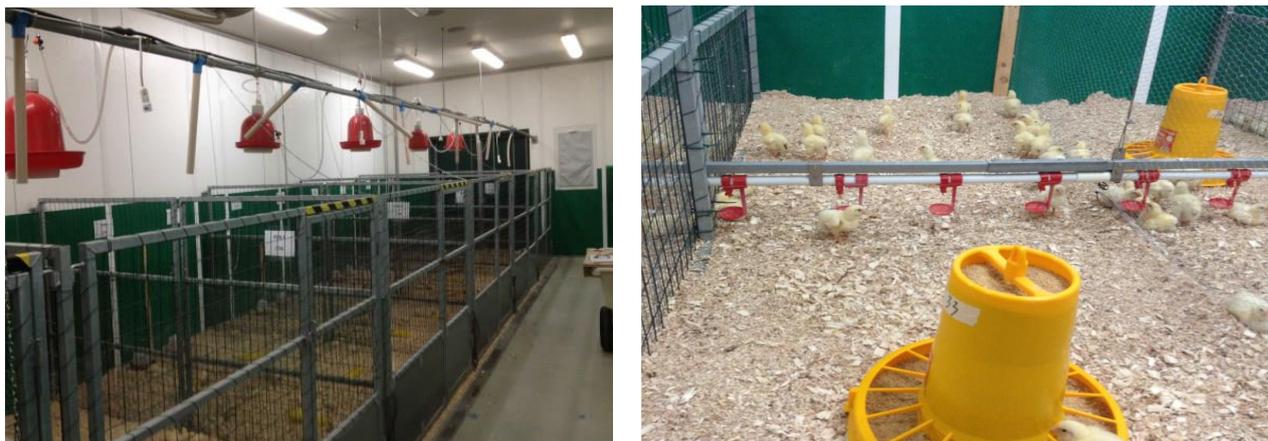


Figura 22. Stanza utilizzata per la prova sperimentale (a sinistra), particolare delle gabbie con mangiatoia a tramoggia e abbeveratoi (a destra).

Il disegno sperimentale scelto per la prova prevedeva un disegno multifattoriale 2 x 2 che permetteva di confrontare il trattamento alimentare (dieta controllo vs dieta integrata con l'emulsionante) e sesso (maschi vs femmine).

Il trattamento alimentare prevedeva dunque una dieta standard di controllo (CTR) e una dieta addizionata con l'emulsionante (AMT), il cui tasso di inclusione era caratterizzato da dosaggi decrescenti con il progredire dell'età degli animali. Nello specifico è stata stabilita l'integrazione di 1g/kg di emulsionante dal giorno 0 al giorno 12, 0,75g/kg dal giorno 12 al giorno 22 ed infine di 0.5g/kg dal giorno 22 al termine della prova.

L'additivo oggetto della prova è stato aggiunto in forma liquida durante la fase di miscelazione del mangime e successivamente la miscela è stata sottoposta a pellettatura a una temperatura di 85°C.

Le diete sono state formulate presso il Gruppo Veronesi S.p.A in accordo con le linee guida del National Research Council (NRC, 1994) al fine di soddisfare a pieno i fabbisogni nutrizionali degli animali durante le differenti fasi di crescita; il programma alimentare prevedeva la suddivisione secondo le 3 fasi sotto riportate:

- 0-12d (Starter);
- 13-22d (Grower);
- 23-42d (Finisher).

In Tabella 39 e Tabella 40 sono indicati rispettivamente la composizione delle diete e la loro analisi chimiche. I mangimi prevedevano l'integrazione di fonti lipidiche di origine animale, grasso di avicoli e strutto in parti uguali, e di origine vegetale, olio di semi di soia, e sono stati somministrati in forma sbriciolata per quanto riguarda le prime due fasi (Starter e Grower) e in pellet per l'ultima fase (Finisher).

Tabella 39. Composizione delle diete sperimentali.

Ingredienti (% SS)	Starter¹	Grower²	Finisher³
<i>Mais</i>	45.17	37.31	30.28
<i>Farina di soia, 49% CP</i>	32.50	25.00	25.50
<i>Fruento</i>	15.00	15.00	20.00
<i>Sorgo</i>	0.00	10.00	15.00
<i>Olio di soia</i>	3.00	5.00	0.00
<i>Grassi animali</i>	0.00	4.00	6.00
<i>Cloruro di sodio</i>	0.40	0.35	0.25
<i>Carbonato di calcio</i>	1.20	1.00	0.95
<i>Fosfato dicalcico 18%</i>	1.50	1.20	1.00
<i>DL-Metionina</i>	0.34	0.30	0.25
<i>L-Treonina</i>	0.11	0.09	0.04
<i>L-Lisina HCl</i>	0.28	0.25	0.23
<i>Premix⁴</i>	0.50	0.50	0.50
<i>AMT</i>	-/0.10	-/0.075	-/0.05
<i>Colina HCl 75%</i>	0.12	0.10	0.09
<i>Xilanasi</i>	0	0	0.04

¹ Starter = dal giorno 0 al giorno 12.

² Grower = dal giorno 12 al giorno 22.

³ Finisher = dal giorno 22 al termine della prova (37giorni per le femmine, 44 per i maschi).

⁴ Contenente: vitamina A, 11 250 IU; vitamina D₃, 5 000 IU; vitamina E, 60mg; MnSO₄·1H₂O, 308mg; ZnSO₄·1H₂O, 246mg; FeSO₄·1H₂O, 136mg; CuSO₄·5H₂O, 39mg; KI, 2.4mg; Na₂SeO₃, 657μg; 6-Phytase EC 3.1.3.26, 750 FTU; Endo-1, 4-beta-xylanase EC 3.2.1.8, 2 250 U.

⁵ AMT: 1g Avi-Mul Top/kg per starter, 0,75g Avi-Mul Top /kg per grower, 0,5g Avi-Mul Top /kg per finisher.

Tabella 40. Analisi chimica dei mangimi somministrati.

Composizione chimica	Starter¹	Grower²	Finisher³
<i>Energia metabolizzabile (MJ/kg)</i>	12.77	13.19	13.65
<i>Proteina grezza (%)</i>	21.80	20.20	19.0
<i>Estratto etereo (%)</i>	5.20	6.70	8.20
<i>Fibra grezza</i>	2.68	2.87	2.57
<i>Calcio (%)</i>	0.92	0.80	0.70
<i>Fosforo (%)</i>	0.65	0.60	0.54
<i>Lisina (%)</i>	1.33	1.22	1.12
<i>Met+Cys (%)</i>	0.96	0.90	0.79
<i>Treonina (%)</i>	0.89	0.80	0.71
<i>Acido oleico (%)</i>	1.26	2.22	3.06
<i>Acido linoleico (%)</i>	2.71	1.87	1.56
<i>Acido linolenico (%)</i>	0.24	0.15	0.13

¹ Starter = dal giorno 0 al giorno 12.

² Grower = dal giorno 12 al giorno 22.

³ Finisher = dal giorno 22 al termine della prova (37giorni per le femmine, 44 per i maschi).

Tutti i recinti prevedevano sistemi automatici di alimentazione a catena e di distribuzione dell'acqua con abbeveratoi a goccia; inoltre sul fondo dei recinti è stato distribuito uno strato di lettiera costituito da trucioli di legno bianco.

Per quanto riguarda la gestione del microclima, in tutte le stanze è stato applicato lo stesso programma di condizionamento ambientale; nello specifico, il fotoperiodo iniziale, dal giorno 0 al giorno 7, è stato di 24h di luce, successivamente modificato in 23 ore di luce e 1 ora di buio a partire dal giorno 7 al termine della prova. La temperatura delle stanze è stata mantenuta a 35 °C dall'arrivo dei pulcini fino al giorno 3, dunque ridotta di 2,5 °C ogni settimana fino ad una temperatura minima di 21 °C.

Per tutta la durata dello studio gli animali avevano libero accesso a mangiatoie ed abbeveratoi e il consumo di alimento e acqua è stato *ad libitum*.

La prova ha avuto una durata complessiva di 37 giorni per le femmine e 44 giorni per i soggetti maschi. Al termine del periodo tutti gli animali sono stati inviati presso l'impianto di macellazione "Società Avicola Val Tidone" di Castel san Giovanni, Piacenza.

12.2.2. Controlli e prelievi

Nel corso della prova sono stati effettuati i seguenti controlli:

12.2.2.1. Peso

Tutti gli animali sono stati pesati all'arrivo presso il CZDS (d0) e nei giorni 12, 22, 37 e 44 (solo maschi) prima del trasferimento al macello; a tale riguardo, tutti i soggetti di ogni recinto venivano pesati insieme e dal valore ottenuto veniva calcolato il peso medio.

Dalla rilevazione dei pesi ai diversi controlli è stato quindi calcolato l'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG) ai diversi periodi. La determinazione dell'IPMG prevedeva la seguente formula:

$$(\text{peso T1}-\text{peso T0})/n^{\circ} \text{ di giorni}$$

Due volte al giorno era inoltre previsto il conteggio degli animali e la rimozione dei soggetti deceduti per cause naturali, che venivano successivamente pesati e decurtati dal totale dei soggetti per tarare correttamente il peso del box.

12.2.2.2. Consumo di alimento

Il consumo di alimento è stato rilevato per ciascuna replica con la stessa cadenza della rilevazione dei pesi (d0, 12, 22, 37 e 44). Giornalmente venivano registrate le quantità di mangime aggiunte alle mangiatoie e, alle cadenze previste per la registrazione del peso, veniva calcolato il residuo.

Dai dati relativi all'assunzione media giornaliera e all'incremento ponderale medio giornaliero è stato possibile calcolare l'indice di conversione alimentare (ICA), che costituisce il rapporto

tra la crescita dei soggetti e la quantità di alimento consumato. Tale parametro rappresenta un ottimo indicatore dell'efficienza produttiva degli animali e più in generale dell'allevamento.

12.2.2.3. Prelievi e campionamenti alla macellazione

A 37 giorni (44 per i maschi) un animale per box, il cui peso era simile al peso medio dell'intero box, è stato selezionato e sacrificato tramite recisione della vena giugulare.

Prima del dissanguamento, tutti i soggetti sono stati storditi per immersione in vasche di stordimento (125 Hz, 80 mA/soggetto, 5 s). Campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti eparina per l'analisi del profilo lipidico plasmatico e immediatamente centrifugati a 3000 giri x 10 minuti ad una temperatura di 4 °C. Le aliquote plasmatiche così ottenute sono state conservate a -20 °C fino allo svolgimento delle analisi.

Sono state inoltre prelevate porzioni di tessuto epatico del peso di 50 – 100gr, prontamente suddivise in provette, immerse in azoto liquido e conservate a -80 °C fino allo svolgimento delle analisi.

La resa della carcassa è stata ottenuta dividendo il peso della carcassa eviscerata per il peso vivo dell'animale. In aggiunta, il petto è stato rimosso e pesato, grazie al quale si è provveduti al calcolo della resa del petto in percentuale sul peso eviscerato. Il petto dei soggetti è stato dunque conservato in buste di plastica a temperatura di refrigerazione per effettuare le analisi qualitative della carne.

12.2.2.4. Valutazione della qualità della carne

Per la valutazione della qualità della carne sono stati analizzati i seguenti parametri:

pH

La valutazione per pH del petto è stata effettuata mediante l'inserimento di un elettrodo a vetro ad una profondità di 2,5cm a cuore del prodotto 24 h dopo la macellazione (Ingold, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

Colore

L'analisi del colore ha previsto l'utilizzo di un colorimetro CR-300 Chroma Meter (Minolta, Osaka) che è stato applicato sulla superficie del petto degli animali, prelevato in fase di macellazione, e inoltre di un altro taglio anatomico. Nello specifico, sono stati determinati i parametri L* (luminosità), a* (indice di "rosso") e b* (indice di "giallo") per singolo campione in accordo con la scala di valutazione CIE.

Capacità di ritenzione idrica

La capacità (o potere) di ritenzione idrica, abbreviata con la sigla WHC dall'acronimo inglese water holding capacity, è stata determinata sui campioni di petto applicando la metodica messa a punto da Jauregui *et al.* (1981) con alcune modifiche.

In breve, 1.5 ± 0.3 g di carne magra sono stati inseriti in un imbuto pre-pesato, tarato (W1) e composto da quattro strati di carta da filtro di I grado (Whatman International, Maidstone, UK). Successivamente l'imbuto con il campione è stato pesato (W2) e centrifugato a 15.000giri/min per 15 minuti a 4 °C. Il campione è stato infine rimosso dall'imbuto e nuovamente pesato (W3). Il WHC è stato calcolato come perdita di acqua dal campione espresso in percentuale, applicando la seguente formula:

$$(W3-W1)/(W2-W1)*100$$

Dove W3-W1 rappresenta il peso dell'acqua assorbita dalla carta, mentre W2-W1 il peso iniziale del campione di carne.

Ogni campione di petto è stato pesato, sigillato in un sacchetto da cottura in plastica, immerso in bagnetto termostato regolato alla temperatura di 85 °C e cotto fino al raggiungimento di 80 °C a cuore. Per il monitoraggio della temperatura interna durante le fasi di cottura dei diversi campioni sono stati applicati dei termometri da cottura inseriti nella porzione più spessa di ogni petto.

Dopo la cottura, i campioni ancora sigillati nelle buste di plastica sono stati raffreddati per immersione in acqua e ghiaccio per 30 minuti. Ogni pezzo è stato quindi rimosso dal relativo sacchetto ed è stata calcolata la perdita di cottura per differenza rispetto al peso inizialmente registrato. I petti sono stati rigenerati a 20 °C per 30 minuti per equilibrare la temperatura interna e sei aliquote sono state ottenute dal centro di ogni muscolo parallelamente alle fibre.

Da ultimo, è stata determinata la tenerezza dei campioni cotti, espressa come forza di taglio da una macchina universale di prova Instron (Modello 5 542, Instron Engineering Corp., Canton, MA, U.S.A.). L'analisi è stata effettuata su 6 aliquote (1,27cm di diametro) per ciascun campione. Le aliquote sono state tagliate parallele all'orientamento longitudinale delle fibre muscolari ed è stata misurata e registrata la forza di taglio del picco (velocità della lama Warner-Bratzler 200mm/min); i valori medi sono stati espressi in Newton (N).

12.2.2.5. Analisi microbiologiche del cieco

In fase di macellazione il contenuto cecale di ogni soggetto è stato raccolto, ogni campione è stato collocato in una provetta sterile e immediatamente inviata al laboratorio per l'analisi microbiologica. Tre campioni appartenenti allo stesso trattamento sono stati riuniti, collocati in sacchi di plastica sterili e mantenuti ad una temperatura di refrigerazione durante il trasporto al laboratorio, dove le analisi sono state eseguite nello stesso giorno.

Il contenuto cecale di ogni campione è stato raccolto in condizioni asettiche, previo isolamento del tessuto intestinale ed disinfezione esterna, quindi utilizzato per le analisi microbiologiche. Aliquote di tre soggetti sono state casualmente selezionate (10 campioni di cieco di maschi e 10 di femmine). Da uno a tre grammi di ciascun campione sono stati diluiti 1:10 con soluzione salina (NaCl 0,85%, tryptone 0,1%) e omogeneizzati per 40s utilizzando il Vortex (MRC Lab, Londra, Regno Unito).

Per la conta di *Lactobacilli* le diluizioni seriali a fattore 10 sono state seminate per spatolamento su terreni MRS agar precedentemente incubati a 37 °C per 48h in vasi anaerobici (Anaerobar, Oxoid, Basingstoke, Regno Unito) con un kit Anaerogen (Oxoid), mentre per la conta *Escherichia coli* (ISO 16 649-2) le diluizioni sono state seminate su terreni agar TBX (Oxoid) incubati aerobicamente a 44 °C per 24 ore.

Infine, per la rilevazione di *Salmonella spp*, altre aliquote di contenuto cecale (1 – 3g) sono state diluite 1:10 con acqua peptonica tamponata (Oxoid) e incubate a 37 °C in accordo con la metodica ISO 6 579. Dai dati ottenuti, è stato calcolato il rapporto *Lactobacilli/E. Coli* come differenza logaritmica tra i due parametri.

12.2.2.6. Valutazione del profilo metabolico plasmatico

Le concentrazioni dei parametri plasmatici presi in esame sono state misurate con uno spettrofotometro automatizzato (ILAB 300 plus, Instrumentation Laboratory S.p.a., Milano, Italia) con kit di analisi commerciali secondo le istruzioni del produttore.

I campioni di plasma sono stati analizzati per colesterolo, HDL, glucosio, proteine totali e urea. La concentrazione delle LDL è stata invece ottenuta per sottrazione delle HDL dal colesterolo totale (colesterolo-HDL).

Per la misurazione di acidi grassi non esterificati (NEFA) sono stati invece utilizzati kit da Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Co. Antrim, Regno Unito.

12.2.2.7. Determinazione del contenuto lipidico epatico e rapporto lipidi totali/DNA

L'estrazione dei lipidi totali è stata effettuata utilizzando il metodo Folch (Folch *et al.*, 1957) con alcune modifiche. In breve, i campioni di fegato (\pm 1g) sono stati scongelati e omogeneizzati in una soluzione satura di cloroformio: metanolo (2:1, v/v) per due minuti. L'omogenato è stato filtrato, messo in imbuti separatori e miscelato con una soluzione salina contenente KCl 0,88%. Dopo la separazione nelle due fasi, la frazione lipidica contenente il cloroformio (precipitato) è stata evaporata usando un evaporatore rotativo ed infine pesata.

I campioni di tessuto epatico sono stati sottoposti a estrazione del DNA totale utilizzando il kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma Aldrich).

Successivamente è stata determinata la qualità di DNA estratto mediante elettroforesi su gel di agarosio e analisi spettrofotometrica, leggendo l'assorbanza a 260nm e 280nm. Il rapporto

A260/A280 è stato quindi utilizzato per stimare la purezza della preparazione degli acidi nucleici, in quanto le proteine, principale fonte di contaminazione durante le fasi di estrazione, assorbono a una lunghezza d'onda pari a 280nm.

12.2.2.8. Estrazione RNA totale e valutazione dell'espressione dei principali geni coinvolti nel metabolismo lipidico

L'RNA totale è stato estratto dai campioni epatici mediante l'utilizzo di un kit commerciale (SV Total RNA Isolation System. Promega). Successivamente, è stata valutata l'integrità dell'RNA estratto mediante gel elettroforesi e la quantità e la qualità mediante spettrofotometro (Synergy HTX) leggendo l'assorbanza a 260 e 280nm.

Per la quantificazione dell'mRNA epatico dei geni Apo A-I e Apo B, l'RNA totale estratto è stato retrotrascritto utilizzando il kit di sintesi cDNA iScript (Biorad). Al fine di valutare la specificità dei primer utilizzati (Tabella 41) sono state allestite due mastermix specifiche per i geni Apo A-I e Apo B, partendo da un pool costituito da cDNA che sono stati amplificati mediante PCR qualitativa (Biorad).

In dettaglio, l'analisi quantitativa del mRNA è stata effettuata utilizzando la chimica del SYBR green come riportato da Jiang *et al.* (2014). In dettaglio, la real-time PCR è stata effettuata in 20µl totali costituiti da 10µl di Maxima SybrGreen/ROX qPCR master mix 2X (ThermoScientific), 0,75µl di ciascun primer (300nM), 1µl di cDNA retrotrascritto diluito 10X e 7.5µl di ddH₂O. I campioni sono stati dunque amplificati con termociclatore Strategene Mx 3000p adottando il seguente profilo termico:

- fase di denaturazione: 95 °C per 10 minuti
 - denaturazione: 95 °C per 20 secondi
 - appaiamento: 63 °C per 60 secondi
 - estensione: 72 °C per 60 secondi
- } 40 cicli

La quantificazione del mRNA è stata effettuata con il metodo del doppio delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak and Schmittgen, 2001) normalizzando i valori per i livelli di espressione dei geni housekeeping 18s rRNA o GAPDH.

Tabella 41. Sequenze dei primers utilizzati

Geni	Primer	Sequenza	Riferimento	Product size, bp
<i>Apolipoproteina A-I (Apo A-I)</i>	Forward Reverse	5'GTGACCCTCGCTGTGCTCTT3' 5'CACTCAGCGTGTCCAGGTTGT3'	Jiang <i>et al.</i> , 2014	217
<i>Apolipoproteina B (Apo B)</i>	Forward Reverse	5'GACTTGGTTACACGCCTCA3' 5'TAACTGCCTGTTATGCTC3'	Zhang <i>et al.</i> , 2007	196
<i>18s rRNA</i>	Forward Reverse	5'GCGGCTTTGGTGA CTCTA3' 5'CTGCCTTCCTTGGATGTG3'	Ocon-Grove <i>et al.</i> , 2008	194
<i>GAPDH</i>	Forward Reverse	TGCTAAGGCTGTGGGGAAAG CAGCAGCCTTCACTACCCTC		

bp = paia di basi

12.3. Analisi statistica

I dati sono stati analizzati come un modello completamente randomizzato con un disegno sperimentale fattoriale 2×2 utilizzando ANOVA GLM e software SAS v. 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Il modello statistico comprendeva gli effetti dei trattamenti alimentari (CTR o AMT), del sesso (maschi o femmine) e della loro interazione. I valori di probabilità $< 0,05$ sono stati considerati significativi. Il box rappresentava l'unità sperimentale per le performance di crescita, mentre i singoli soggetti sono stati considerati le unità sperimentali per la resa della carcassa, la qualità della carne, L'analisi microbiologica del cieco, il profilo lipidico plasmatico e l'espressione di Apo A-I e Apo B. I confronti multipli tra i diversi trattamenti sono stati effettuati utilizzando il test di Tukey.

12.4. Risultati

12.4.1. Performance di crescita e resa alla macellazione

Gli effetti della supplementazione dell'emulsionante oggetto della prova sul peso vivo (PV), l'incremento medio ponderale giornaliero (IMPG), l'assunzione media giornaliera (FI), l'indice di conversione alimentare (ICA) e infine il tasso di mortalità di maschi e femmine sono riportati in Tabella 42.

In dettaglio, gli animali trattati con AMT hanno mostrato un maggiore peso vivo al giorno 12 ($P=0.02$) e un migliore incremento ponderale dal giorno 0 al giorno 12 ($P=0.02$) rispetto al gruppo controllo. L'assunzione di alimento ha mostrato una tendenza alla significatività ($P=0.06$) dal giorno 12 al giorno 22 nel gruppo che prevedeva l'integrazione dell'emulsionante rispetto al controllo. L'ICA relativo all'intero periodo (0-44 giorni) dei maschi trattati ha riportato una differenza significativa rispetto agli animali controllo ($P=0.02$).

Non è stata osservata invece alcuna interazione significativa tra dieta e sesso.

I maschi hanno presentato un maggiore peso vivo al giorno 0 ($P<0.05$), 12, 22 e 37 ($P<0.01$) rispetto alle femmine. Risultati statisticamente significativi sono stati riscontrati relativamente all'IMPG, all'assunzione alimentare e all'ICA degli animali maschi in confronto alle femmine durante tutta la durata della prova ($P<0.01$ dal giorno 0 al giorno 12, dal giorno 12 al giorno 22 e infine dal giorno 22 al giorno 37).

Sebbene in assenza di significatività, le femmine hanno mostrato un tasso di mortalità inferiore rispetto ai soggetti maschi ($P=0.07$).

Tabella 42. Effetti di Avi-Mul Top sui parametri produttivi di maschi e femmine (37 e 44 giorni).

Item	Femmine		Maschi		SEM	P-value		
	CTR ¹	AMT ²	CTR ¹	AMT ²		D ³	G ⁴	D x G ⁴
<i>N° animali</i>	15	15	15	15				
<i>PV⁶ (g)</i>								
d 0	40.54	40.39	40.89	40.97	0.18	0.84	0.01	0.55
d 12	368.2	370.1	378.0 ^b	387.6 ^a	2.50	0.02	<0.01	0.13
d 22	984	986	1 070 ^b	1 092 ^a	8.00	0.12	<0.01	0.16
d 37	2 333	2 338	2 642	2 693	24.00	0.23	<0.01	0.33
d 44	--	--	3 411	3 475	28.00	0.12	-	-
<i>d 0 to 12</i>								
IMPG ⁷ (g/d)	27.30	27.47	28.09 ^b	28.88 ^a	0.21	0.02	<0.01	0.14
FI ⁸ (g/d)	31.68	31.61	32.28	32.72	0.31	0.55	<0.01	0.42
ICA ⁹	1.16	1.15	1.15	1.13	0.01	0.19	0.14	0.74
<i>d 12 to 22</i>								
IMPG ⁷ (g/d)	61.62	61.54	69.15	70.49	0.63	0.32	<0.01	0.27
FI ⁸ (g/d)	83.53	84.43	92.29 ^b	94.45 ^a	0.79	0.06	<0.01	0.43
ICA ⁹	1.36	1.37	1.33	1.34	0.01	0.14	<0.01	0.44
<i>d 22 to 37</i>								
IMPG ⁷ (g/d)	89.90	90.21	104.8	106.7	1.30	0.42	<0.01	0.54
FI ⁸ (g/d)	149.1	148.6	169.4	168.5	2.00	0.74	<0.01	0.91
ICA ⁹	1.66	1.65	1.62 ^a	1.58 ^b	0.02	0.23	<0.01	0.48
<i>d 0 to 37</i>								
IMPG ⁷ (g/d)	62.00	62.10	70.30	71.70	0.60	0.23	<0.01	0.33
FI ⁸ (g/d)	93.30	93.30	104.1	104.4	1.00	0.83	<0.01	0.87
ICA ⁹	1.51	1.50	1.48 ^a	1.46 ^b	0.01	0.22	<0.01	0.34
<i>d 0 to 44</i>								
IMPG ⁷ (g/d)	-	-	76.60	78.06	0.64	0.12	-	-
FI ⁸ (g/d)	-	-	120.2	120.7	0.90	0.74	-	-
ICA ⁹	-	-	1.57 ^a	1.55 ^b	0.01	0.02	-	-
<i>Mortalità (%)</i>	1.33	0.33	2.00	2.33	0.72	0.64	0.07	0.36

¹ CTR = dieta basale senza integrazione di emulsionante.

² AMT = CTR + Avi-Mul Top (1g Avi-Mul Top/kg per starter, 0,75g Avi-Mul Top /kg per grower, 0,5g Avi-Mul Top /kg per finisher).

³ D = effetto dieta.

⁴ G = effetto sesso.

⁵ D x G = interazione dieta-sesso

⁶ PV = peso vivo.

⁷ IMPG = incremento ponderale medio giornaliero.

⁸ FI = consumo di alimento.

⁹ ICA = indice di conversione alimentare.

^{a,b} Valori statisticamente significativi P<0.05.

La Tabella 43 riporta i risultati relativi alla resa in fase di macellazione. L'integrazione di AMT nella dieta ha mostrato un significativo aumento della resa rispetto al gruppo controllo ($P=0.02$). Non sono state osservate differenze statistiche tra le interazioni dieta e sesso ($P>0.05$), tuttavia i soggetti maschi hanno riportato una maggiore resa alla macellazione se confrontati con le femmine ($P<0.01$).

Tabella 43. Effetto di Avi-Mul Top sulla resa alla macellazione di femmine e maschi (37 e 44 giorni).

Item	Femmine		Maschi		SEM	P-value		
	CTR ¹	AMT ²	CTR ¹	AMT ²		D ³	G ⁴	D x G ⁵
<i>N° animali</i>	15	15	15	15				
<i>Resa (%)</i>	73.62	73.96	75.14 ^b	76.09 ^a	0.26	0.02	<0.01	0.24
<i>Petto (%)</i>	32.97	33.58	31.96	32.67	0.52	0.21	0.07	0.92

¹ CTR = dieta basale senza integrazione di emulsionante.

² AMT = CTR + Avi-Mul Top (1g Avi-Mul Top/kg per starter, 0,75g Avi-Mul Top /kg per grower, 0,5g Avi-Mul Top /kg per finisher).

³ D = effetto dieta.

⁴ G = effetto sesso.

⁵ D x G = interazione dieta-sesso

^{a,b} Valori statisticamente significativi $P<0.05$.

12.4.2. Qualità della carne e analisi microbiologiche del cieco

I risultati relativi all'integrazione di AMT sulla qualità della carne in maschi e femmine sono riportati in Tabella 44.

Il gruppo trattato con l'emulsionante ha mostrato un significativo incremento dell'indice b* (giallo) ($P<0.01$) e una riduzione delle perdite in cottura ($P=0.03$).

Nei soggetti maschi sono state registrate differenze statistiche relativamente all'indice a* (rosso) ($P=0.04$) e alla perdita in cottura percentuale ($P<0.01$) rispetto alle femmine; inoltre, la forza di taglio dei maschi ha mostrato una tendente riduzione ($P=0.07$), se confrontata con le femmine.

E' stata riscontrata un'interazione significativa tra dieta e sesso nel caso delle perdite in cottura ($P=0.049$).

Per quanto riguarda invece le analisi microbiologiche del cieco, la conta di *E. coli* e *Lactobacilli* non ha mostrato risultati statisticamente significativi ($P>0.05$; Tabella 44).

Tabella 44. Effetto di Avi-Mul Top sulle caratteristiche della carne e sulla conta microbica del cieco (\log_{10} cfu/g) in femmine e maschi (37 e 44 giorni).

Item	Femmine		Maschi		SEM	P-value		
	CTR ¹	AMT ²	CTR ¹	AMT ²		D ³	G ⁴	D x G ⁵
<i>N° animali</i>	15	15	15	15				
<i>pH₂₄</i>	6.08	6.10	6.18	6.12	0.04	0.64	0.17	0.32
<i>Colore</i>								
<i>L*</i> (luminosità)	52.28	54.70	54.77	54.11	0.86	0.30	0.27	0.08
<i>a*</i> (indice rosso)	-1.72	-0.30	-0.12	-0.14	0.42	0.10	0.04	0.09
<i>b*</i> (indice giallo)	6.60	8.05	6.64	8.58	0.44	<0.01	0.53	0.58
<i>WHC⁶</i> (%)	34.89	33.21	36.07	35.27	1.01	0.22	0.12	0.66
<i>Perdite in cottura</i> (%)	25.05 ^a	19.86 ^b	26.64 ^a	26.45 ^a	1.24	0.03	<0.01	0.05
<i>Forza di taglio</i> (N)	14.75	16.75	17.25	18.89	1.25	0.15	0.07	0.89
<i>E. coli</i>	7.62	7.65	7.34	7.60	0.16	0.39	0.33	0.49
<i>Lactobacilli</i>	8.21	7.96	8.10	7.98	0.24	0.45	0.86	0.78

¹ CTR = dieta basale senza integrazione di emulsionante.

² AMT = CTR + Avi-Mul Top (1g Avi-Mul Top/kg per starter, 0,75g Avi-Mul Top /kg per grower, 0,5g Avi-Mul Top /kg per finisher).

³ D = effetto dieta.

⁴ G = effetto sesso.

⁵ D x G = interazione dieta-sesso

⁶ WHC = water-holding capacity, capacità di ritenzione idrica.

^{a,b} Valori statisticamente significativi $P < 0.05$.

12.4.3. Profilo metabolico plasmatico

La Tabella 45 mostra gli effetti dell'aggiunta di emulsionante sul profilo plasmatico dei principali metaboliti coinvolti nel metabolismo lipidico.

Il gruppo trattato con AMT ha mostrato un maggior contenuto plasmatico di colesterolo, HDL e LDL se comparato con il controllo ($P < 0.01$, $P = 0.02$ e $P < 0.01$, rispettivamente).

Non è stata registrata nessuna interazione significativa ($P > 0.05$) tra dieta e sesso; tuttavia, la concentrazione di colesterolo, LDL e glucosio plasmatici dei maschi è risultata statisticamente maggiore rispetto ai soggetti femmina ($P = 0.02$, $P = 0.04$ e $P < 0.01$). In aggiunta, è stato osservato un minore contenuto plasmatico di proteine nei maschi rispetto alle femmine ($P = 0.013$).

Tabella 45. Effetti di Avi-Mul Top (AMT) sui principali metaboliti ematici in femmine e maschi.

Item	Dieta		SEM	Sesso		SEM	P-value		
	CTR ¹	AMT ²		Femmine	Maschi		D ³	G ⁴	G × D ⁵
<i>N° soggetti</i>									
<i>Colesterolo (mg/dl)</i>	119 ^b	129 ^a	2	120 ^b	128 ^a	2.00	<0.01	0.02	0.90
<i>HDL⁶ (mg/dl)</i>	73.44 ^b	78.70 ^a	1.53	74.00	78.14	1.53	0.02	0.06	0.30
<i>LDL⁷ (mg/dl)</i>	45.57 ^b	50.77 ^a	1.35	46.20 ^b	50.13 ^a	1.35	<0.01	0.04	0.34
<i>NEFA⁸ (mmol/l)</i>	0.78	0.77	0.09	0.82	0.73	0.09	0.95	0.46	0.20
<i>Glucosio (mg/dl)</i>	244	243	3	230 ^b	256 ^a	3.00	0.87	<0.01	0.86
<i>Proteine totali (g/dl)</i>	2.99	3.06	0.05	3.12 ^a	2.93 ^b	0.05	0.37	0.01	0.88
<i>Trigliceridi (mg/dl)</i>	46.71	52.58	3.07	62.37 ^a	36.91 ^b	3.07	0.18	<0.01	0.10
<i>Urea (mg/dl)</i>	5.28	4.67	0.26	4.82	5.14	0.26	0.10	0.37	0.47

¹ CTR = dieta basale senza integrazione di emulsionante.

² AMT = CTR + Avi-Mul Top (1g Avi-Mul Top/kg per starter, 0,75g Avi-Mul Top /kg per grower, 0,5g Avi-Mul Top /kg per finisher).

³ D = effetto dieta.

⁴ G = effetto sesso.

⁵ D × G = interazione dieta-sesso

⁶ HDL = lipoproteine ad alta densità.

⁷ LDL = lipoproteine a bassa densità.

⁸ NEFA = acidi grassi non esterificati.

^{a,b} Valori statisticamente significativi P<0.05.

12.4.5. Contenuto lipidi totali, rapporto lipidi totali/DNA nel fegato ed espressione dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico

In Tabella 46 sono riportati i dati relativi alla percentuale di lipidi totali e DNA e il rapporto lipidi tot/DNA nei campioni di fegato provenienti da soggetti maschi e femmina, trattati e controllo. L'aggiunta dell'additivo emulsionante non ha alterato il tenore lipidico epatico (controllo vs AMT; $P > 0.05$); tuttavia, le femmine hanno mostrato un maggior contenuto di lipidi a livello epatico rispetto ai maschi (9.49 % vs 6.54 %; $P < 0.01$).

Le ulteriori indagini effettuate hanno valutato il rapporto lipidi totali/DNA quale indicatore di accumulo dei lipidi nel fegato; nei soggetti femmina il rapporto lipidi totali/DNA si è rivelato più basso nei soggetti trattati rispetto ai controlli, nei soggetti maschi invece non sono state evidenziate delle variazioni.

Tabella 46. Risultati della % di lipidi totali e il rapporto lipidi tot/ DNA nei campioni epatici di soggetti maschi.

Item	Femmine		Maschi		SEM	P-value		
	CTR	AMT	CTR	AMT		D ₁	G ₂	D x G ₃
Lipidi totali %	9.49	9.67	6.54	7.39	0.79	0.52	<0.01	0.67
DNA totale %	0.16	0.18	0.20	0.17	0.02	0.80	0.43	0.18
Lipidi Tot/DNA	89.39	57.67	37.24	44.79	17.41	0.49	0.07	0.27

¹D = effetto dieta.

²G = effetto sesso

³D x G = interazione dieta-sesso

Prima di procedere con l'analisi quantitativa, è stata valutata l'integrità dell'RNA totale estratto dai campioni epatici per rilevare la presenza e l'integrità delle bande corrispondenti a 18s e 28s (Figura 23) e la qualità mediante valutazione spettrofotometrica della ratio abs260/abs280. In tutti i campioni estratti, la ratio era compresa tra 1.8 e 2.

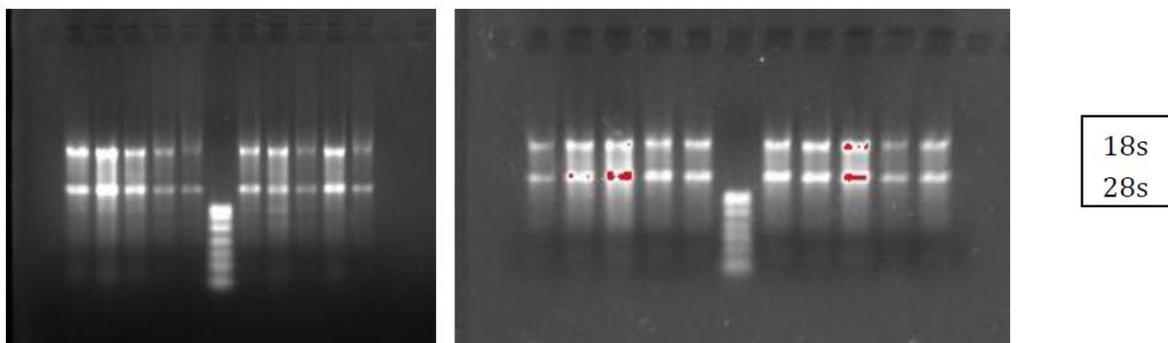


Figura 23. Risultato dell'RNA estratto nei soggetti maschi (a sinistra) e femmine (a destra).

La specificità dei primer per l'amplificazione dei geni Apo A-I e Apo B è riportata in Figura 4. La presenza di un'unica banda di 217pb e di 196pb conferma la specificità di amplificazione dei primer utilizzati nel corso del presente studio (Figura 24). In parallelo è stata testata la specificità dei primer dei geni housekeeping (18s e GAPDH) (dati non mostrati).

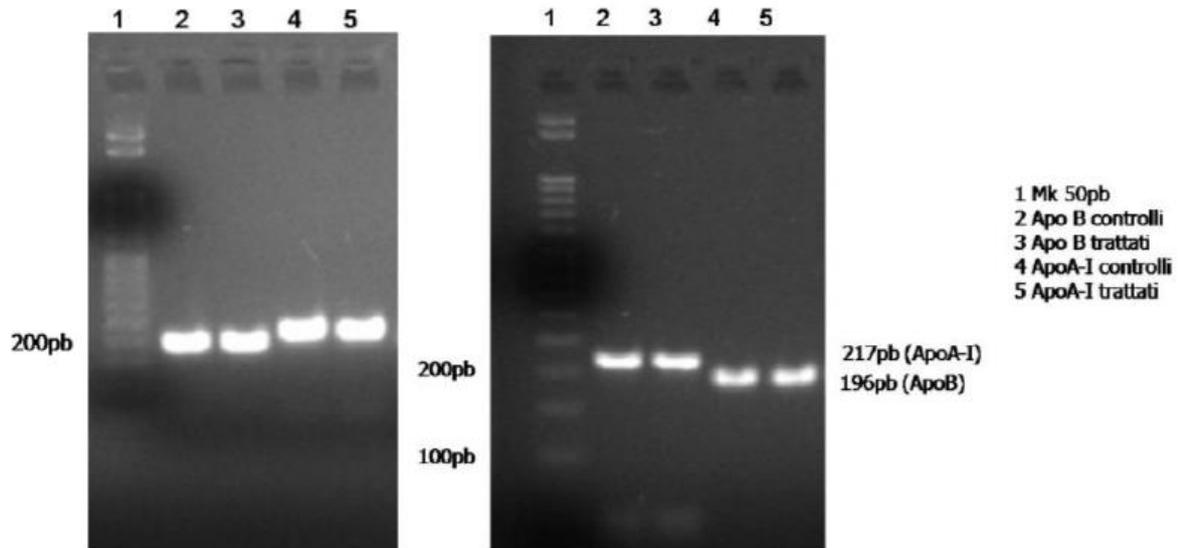


Figura 24. Amplificazione del cDNA nei soggetti maschi (dx) e femmine (sx), controlli (sx) e trattati (dx), con particolare riferimento ai due geni di interesse (Apo A-I e Apo B).

Il Grafico 15 mette a confronto i livelli di espressione dei geni legati ad Apo A-I e Apo B nei maschi. Come si evince dalla figura, l'aggiunta dell'emulsionante nella dieta non influisce significativamente ($P > 0.05$) sull'espressione genica delle apolipoproteine; è però stata riscontrata una tendenza alla down-regolazione. Il Grafico 16 rappresenta invece i livelli di espressione dei geni legati all'apolipoproteina A-I e B nelle femmine. L'aggiunta di emulsionante nella dieta non modifica il livello di espressione di Apo A-I ($P > 0.05$), mentre induce una significativa up-regulation dell'espressione del gene per Apo B ($P = 0.0056$).

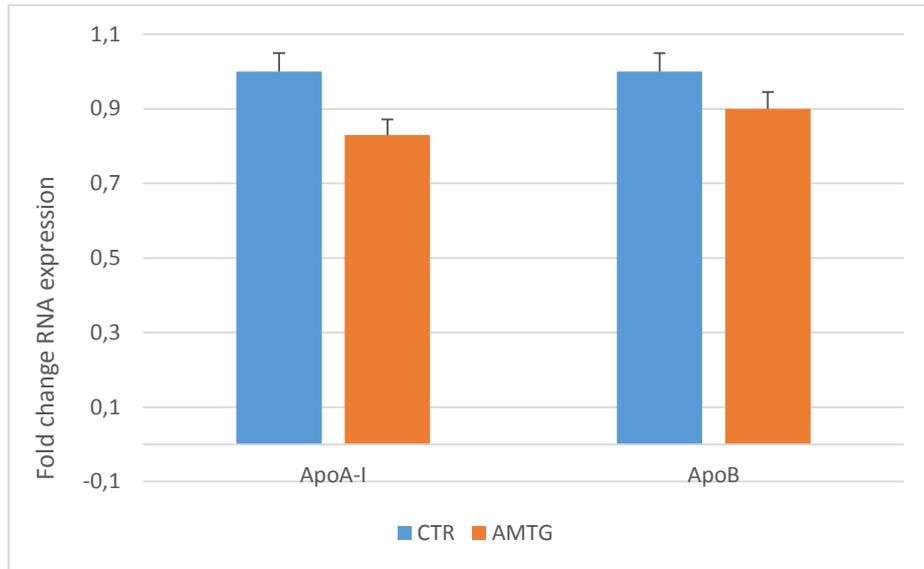


Grafico 15. Espressione dei geni ApoA1 e Apo-B nei soggetti maschi.

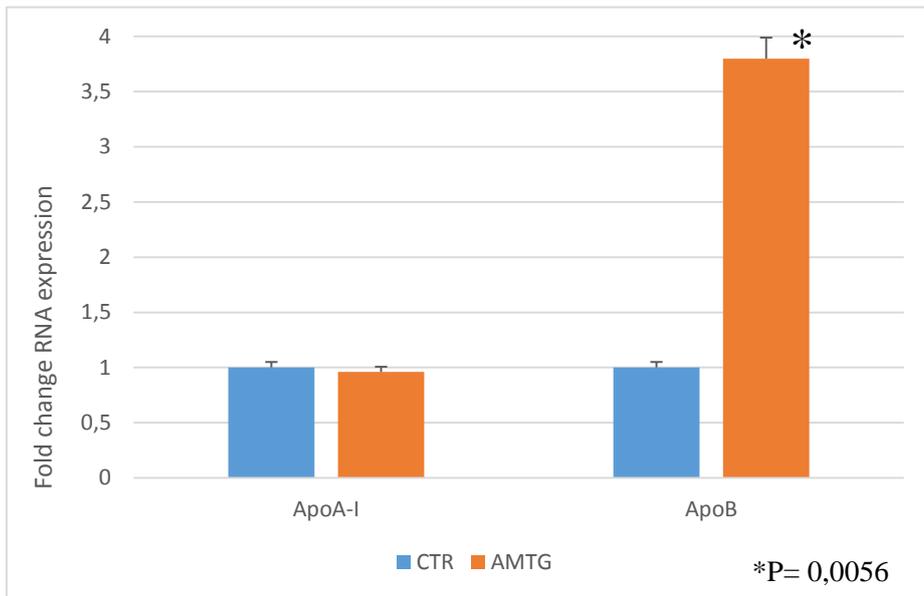


Grafico 16. Espressione dei geni ApoA1 e Apo-B nelle femmine.

12.5. Discussione

Dai risultati ottenuti in merito alle performance produttive, è possibile dedurre che l'integrazione di un additivo emulsionante è in grado di migliorare i principali parametri di crescita (PV, IMPG, FI e ICA) degli animali trattati rispetto ai controlli, nonostante il breve ciclo produttivo.

In particolar modo, i risultati più significativi sono stati riscontrati tra i maschi e le femmine, probabilmente dovuti ad un maggior consumo di alimento da parte dei primi. In accordo con quanto riportato in letteratura, non sono state osservate differenze significative tra il gruppo trattato e il controllo durante lo svolgimento della prova (Roy *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2013).

Nel presente lavoro, l'emulsionante AVI MUL-TOP è stato aggiunto al mangime sperimentale prima del processo di pellettatura, ciò potrebbe aver incrementato il tenore di umidità, ridotto il consumo di energia per la formazione del pellet e migliorato la qualità dello stesso, ottimizzando nel contempo l'assunzione da parte degli animali e le relative performance produttive.

Uno studio effettuato da Dierick e Decuyper (2004) ha riportato che l'aggiunta dell'emulsionante sarebbe in grado di migliorare la digeribilità dei principali nutrienti; tale condizione potrebbe ridurre la viscosità del contenuto intestinale, incrementare la velocità di transito e aumentare di conseguenza l'assunzione di alimento (Lázaro *et al.*, 2004).

In questo studio, il miglioramento delle performance di crescita degli animali potrebbe trovare spiegazione nella capacità del ricinoleato dell'olio di ricino di emulsionare gli acidi grassi presenti nella dieta, rendendolo maggiormente metabolizzabili da parte degli animali (Xing *et al.*, 2004).

Come precedentemente anticipato, femmine e maschi sono stati sacrificati in tempi differenti, rispettivamente 37 giorni per le femmine e 44 per i maschi. Questa pratica è largamente utilizzata nell'allevamento italiano del pollo da carne con l'obiettivo di massimizzare le caratteristiche genetiche dei due sessi. E' possibile dunque ipotizzare che questo intervallo di tempo sia in parte responsabile dei migliori risultati produttivi riscontrati nei maschi, provocati da un maggior consumo di alimento e quindi di additivo.

Per quanto riguarda le caratteristiche della carne, Scheuermann *et al.* (2003) ha osservato che nei broiler lo sviluppo del petto avviene principalmente alla fine della crescita morfologica. I nostri risultati sono in accordo con tale teoria; infatti, il maggior accrescimento riportato nella fase finale nel gruppo trattato con emulsionante potrebbe essere giustificato dal tardivo sviluppo del muscolo pettorale che ha contribuito all'aumento della resa alla macellazione.

Il colore della carne è la prima caratteristica che il consumatore valuta al momento dell'acquisto del prodotto. Nel presente studio, l'aggiunta dell'emulsionante ha influenzato alcuni indici colorimetrici della carne; in particolare, l'aumento dell'indice di giallo (b^*) nel petto degli animali trattati con AMT potrebbe essere dovuto ad una maggiore concentrazione di lipidi e di pigmenti liposolubili, come ad esempio le xantofille, nel taglio anatomico considerato.

L'emulsionante di sintesi utilizzato nella seguente prova sperimentale non ha mostrato un impatto diretto sulla microflora intestinale; non è stata infatti osservata alcuna differenza sulla conta di *E. coli* e *Lactobacilli* tra il gruppo trattato con AMT e il controllo ($P > 0.05$), tra i soggetti maschi e femmina e considerando le interazioni tra i due.

In letteratura, pochi autori hanno studiato l'effetto dell'integrazione di un additivo emulsionante sui parametri ematici legati al metabolismo lipidico nella specie avicola; tali risultati non sono tuttavia univoci. Roy *et al.* (2010) ha riscontrato che animali trattati con emulsionante presentavano un minor contenuto di colesterolo e LDL a livello sierico; secondo gli autori, i dati ottenuti potevano indicare un maggior tasso di rimozione dei lipidi dal tessuto epatico. Al contrario, una prova *in vivo* condotta da Wang *et al.* (2016) ha mostrato un incremento del contenuto ematico di colesterolo e di LDL in polli che hanno ricevuto un emulsionante, ma una riduzione delle HDL. Dall'articolo risulta fondamentale conoscere la tipologia di grasso (animale o vegetale) addizionato nella dieta e il corrispettivo livello di inclusione.

E' tuttavia evidente che i meccanismi di regolazione del colesterolo ematico presentano un quadro molto complesso, caratterizzati da un'elevata multifattorialità in cui parametri come l'uptake delle HDL da parte del fegato e/o il metabolismo post-assorbimento dei lipidi giocano un ruolo chiave; in tal senso, saranno necessari studi più approfonditi per far luce sull'effetto del ricinoleato dell'olio di ricino sulla modificazione dei parametri lipidici ematici.

E' noto che il fegato rappresenta il principale sito di lipogenesi nelle specie avicole; inoltre, tutti i lipidi accumulati nell'adipe provengono di fatto dal fegato o dalla dieta. Nei soggetti adulti, la sintesi e la secrezione delle lipoproteine avvengono rispettivamente nel fegato e nell'intestino e fattori di natura farmacologica, alimentare e fisiologica possono modificare la concentrazione di apolipoproteina A-I (ApoA-I) e conseguentemente di HDL a livello plasmatico (Jiang *et al.*, 2013).

L'ApoA-I e l'apolipoproteina B (ApoB) costituiscono le principali frazioni proteiche delle HDL e delle LDL, rispettivamente. In accordo con lo studio effettuato da Jiang *et al.* (2013), è stata valutata l'espressione dei geni legati a ApoA-I e ApoB, al fine di investigare l'effetto dell'aggiunta degli emulsionanti nella dieta, quali modulatori del metabolismo epatico.

Come riportato in precedenza, è stato riscontrato un significativo aumento di espressione dei geni legati alle ApoB nelle femmine e tale risultato potrebbe giustificare un maggior trasporto

dei lipidi nei diversi tessuti evitando un eccessivo accumulo nel fegato, tali risultati sono confermati dai parametri epatici riportati (lipidi totali e rapporto lipidi/DNA). Inoltre, l'osservato aumento dell'espressione dei geni può essere correlato al maggior contenuto plasmatico di LDL, in quanto le apolipoproteine regolano l'uptake cellulare delle lipoproteine a bassa densità a livello epatico (Willnow, 1999).

Considerando l'intervallo di tempo trascorso tra il sacrificio delle femmine e quello dei maschi (37 e 44 giorni), è lecito ipotizzare che l'età/momento di macellazione potrebbe modificare la risposta lipidica ed epatica all'integrazione di AMT e giustificare conseguentemente l'assenza di modulazione nei soggetti maschi, come suggerito peraltro da Wang *et al.* (2016).

12.6. Conclusioni

Dai risultati ottenuti da questo studio è possibile dedurre che, sebbene il sesso e l'età degli animali possano rappresentare importanti fonti di variabilità, la somministrazione di AVIMULTOP risulta in grado di modificare il metabolismo lipidico epatico nel suo complesso nonché l'espressione dei geni per le apolipoproteine; tale additivo di sintesi rappresenta inoltre un importante strumento per ottimizzare l'utilizzazione dei grassi alimentari in animali a rapida crescita con significative ripercussioni sulle produzioni finali.

13. II prova sperimentale: Effetto dell'integrazione di un estratto di *Olea Europaea* nell'allevamento del pollo da carne

13.1. Introduzione

L'impiego di estratti vegetali naturali in zootecnia, ed in particolare in avicoltura, rappresenta un importante oggetto di studio; a partire dal bando degli antibiotici utilizzati come promotori di crescita, in vigore dal 1/1/2006, l'attenzione della ricerca in campo nutrizionale si è orientata sullo studio di estratti vegetali come soluzioni alternative agli auxinici.

La composizione chimica, come anche la modalità di azione, di tali estratti naturali è estremamente varia, tuttavia i polifenoli costituiscono una delle tipologie più interessanti e più studiate nell'allevamento del pollo da carne.

La presente prova si propone di valutare gli effetti della somministrazione di un estratto di oliva con un elevato tenore di polifenoli sulle performance di crescita, sulle popolazioni microbiche intestinali e sulle principali caratteristiche delle carni avicole.

Il prodotto oggetto della tesi è stato estratto da tessuti del frutto dell'oliva (*Olea Europaea*) attraverso un processo ecosostenibile che utilizza tecnologie di membrana e cromatografia liquida di assorbimento su resina ed è caratterizzato da un contenuto di polifenoli totali pari a 25mg/g in GAE (acido gallico equivalente).

Al fine di valutare gli effetti dei polifenoli, 2 diversi dosaggi dell'estratto di oliva (rispettivamente 1g/kg e 5g/kg) sono stati messi a confronto con una dieta di controllo e un'altra dieta integrata con 200 UI/kg di Vitamina E, pari a 10 volte il contenuto previsto nelle diete controllo e integrate con polifenoli.

13.2. Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta da Ottobre a Novembre 2015 presso il Centro Zootecnico Didattico Sperimentale (CZDS) del Polo Veterinario di Lodi, previa richiesta e ottenimento del parere positivo del Comitato Etico di Ateneo.

13.2.1. Animali e stabulazione

Per l'espletamento della prova sono stati utilizzati 720 pulcini ROSS 308 di 1 giorno di età, tutti di sesso femminile, provenienti dall'incubatoio dell'Allevamento "Pollo Monteverde", Ospitaletto (Brescia). All'arrivo presso il CZDS i soggetti erano già vaccinati contro le principali patologie avicole (malattia di Marek, Newcastle e bronchite infettiva).

I pulcini, del peso vivo medio di 45g, sono stati alloggiati in 3 stanze costituite da 12 recinti (repliche) delle dimensioni di 1.25m x 2.00m e contenenti 20 soggetti ciascuno.

I recinti erano dotati di lettiera in truciolo di legno bianco, di abbeveratoi per la somministrazione dell'acqua e di mangiatoie a tramoggia conformi alla crescita degli animali. La somministrazione di acqua e alimento è stata *ad libitum* per tutta la durata della prova sperimentale.

Per quanto riguarda la gestione del microclima, dall'arrivo dei pulcini fino al giorno 7 era previsto un fotoperiodo di 23 ore di luce e 1 ora di buio, mentre dal giorno 8 al termine della prova (giorno 35) il rapporto tra ore di luce e di buio era di 20:4. Durante la prima settimana la temperatura era stata impostata a 35°C; successivamente ridotta di 2,5 °C alla settimana fino ai 24 °C al termine della prova.

I pulcini sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali, ciascuno dei quali prevedeva 12 recinti secondo lo schema sotto riportato:

- 1) CTR (Controllo): Dieta Basale (DB);
- 2) T1: DB integrata con 200 I.U./kg di vitamina E;
- 3) T2: DB integrata con 1g/kg di Ethifenol (Ethivet s.r.l, Bergamo);
- 4) T3: DB integrata con 5g/kg di Ethifenol.

L'Ethifenol consisteva in un estratto naturale di polpa di oliva (*Olea europea L.*) in polvere idrosolubile, estratto con tecnologie sostenibili che usano l'acqua come unico solvente di estrazione (US Patent N. 8,815,815). Il prodotto presentava una quantità totale di polifenoli pari a 25 mg/g in GAE (Equivalenti dell'acido gallico).

L'alimentazione prevedeva un classico programma a 3 fasi:

- 1) Dall'arrivo al giorno 10: avviamento o starter;
- 2) Dal giorno 11 al giorno 20: accrescimento o grower;
- 3) Dal giorno 21 al termine della prova (35 d): finissaggio o finisher.

I mangimi Starter e Grower si presentavano in forma sbriciolata, per consentire un'ottimale assunzione in relazione alle dimensioni degli animali; mentre il mangime finisher era in forma pellettata. In Tabella 47 e Tabella 48 sono riportati gli ingredienti e le caratteristiche chimiche dei mangimi utilizzati.

Al termine della prova (35 d), tutti gli animali sono stati inviati presso lo stabilimento "Avicola Val Tidone" (Castel San Giovanni, Piacenza) e processati in accordo con le normative vigenti.

Tabella 47. Composizione delle diete sperimentali.

Ingredienti (%SS)	Starter¹	Grower²	Finisher³
<i>Mais</i>	55.05	57.40	61.67
<i>Soia f.e. 48%</i>	37.30	34.10	29.20
<i>Olio di soia</i>	3.00	4.30	5.30
<i>Fosfato bicalcico</i>	2.50	2.50	2.10
<i>Carbonato di calcio</i>	0.70	0.45	0.50
<i>Minerali e Vitamine⁴</i>	0.50	0.50	0.50
<i>NaCl</i>	0.40	0.40	0.40
<i>DL-Metionina</i>	0.32	0.18	0.16
<i>L-Lisina HCL</i>	0.23	0.17	0.17
<i>Vitamina E⁵</i>			
<i>Ethiphenol⁶</i>			

1 Starter = dal giorno 0 al giorno 12.

2 Grower = dal giorno 12 al giorno 22.

3 Finisher = dal giorno 22 al termine della prova (d 35).

4 Integrazione per kg: Vitamina A, 10.000 IU; Vitamina D3, 2.000 IU; Vitamina E, 20mg; MnSO₄·1H₂O, 60mg; ZnSO₄·1H₂O, 94.25mg; FeSO₄·1H₂O, 50mg; CuSO₄·5H₂O, 5mg; KI, 1mg; Na₂SeO₃, 150µg;

5 Vitamina E; Vitamina E, 20mg; 200 U.I/kg in aggiunta solo in T1;

6 Ethifenol; CTR, T1, 0 gr; T2, 1 gr/kg; T3, 5gr/kg.

Tabella 48. Analisi chimica delle diete somministrate agli animali (% SS).

Analisi chimica, % tal quale	Starter¹	Grower²	Finisher³
<i>EM, kcal/kg</i>	3003.36	3100.26	3200.48
<i>Proteina Grezza</i>	22.63	21.16	19.14
<i>Lisina (%) DigStd</i>	1.28	1.16	1.04
<i>Metionina+Cistina (%) DigStd</i>	0.91	0.74	0.68
<i>Metionina (%) DigStd</i>	0.62	0.46	0.42
<i>Lisina (%) totale</i>	1.40	1.27	1.13
<i>Metionina+Cistina (%) totale</i>	1.00	0.83	0.76
<i>Metionina (%) totale</i>	0.64	0.49	0.44

1 Starter = dal giorno 0 al giorno 12.

2 Grower = dal giorno 12 al giorno 22.

3 Finisher = dal giorno 22 al termine della prova (d 35).

13.2.2. Controlli e prelievi

Nel corso della seguente prova *in vivo* sono stati effettuati e seguenti controlli:

13.2.2.1. Peso vivo

Tutti gli animali sono stati pesati all'arrivo (d 0), al giorno 10, 20 e 35 prima del trasferimento all'impianto di macellazione; a tale riguardo tutti i soggetti di ogni recinto venivano pesati contemporaneamente e dal valore ottenuto veniva calcolato il peso medio.

Dalla rilevazione dei pesi ai diversi controlli è stato quindi calcolato l'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG) ai diversi periodi. La determinazione dell'IPMG prevedeva la seguente formula:

$$(\text{peso T1}-\text{peso T0})/\text{n}^{\circ} \text{ di giorni}$$

Due volte al giorno era inoltre previsto il conteggio degli animali e la rimozione dei soggetti deceduti in seguito a cause naturali, che venivano successivamente pesati e decurtati dal totale dei soggetti per tarare correttamente il peso del box.

13.2.2.2. Consumo di alimento

Il consumo di alimento (feed intake, FI) è stato rilevato per ciascuna replica (recinto) con la stessa cadenza della rilevazione dei pesi (giorno 10, 20 e 35). Giornalmente venivano registrate le quantità di mangime aggiunte alle mangiatoie e, alle cadenze previste per la registrazione del peso, veniva calcolato il residuo.

Inoltre, all'inizio della prova è stato inoltre prelevato un campione di mangime di ciascuna fase e trattamento per le analisi sulla composizione chimica.

Dalla correlazione tra l'incremento medio ponderale giornaliero (IPMG) e il consumo di alimento (FI), è stato possibile calcolare l'indice di conversione alimentare (ICA) degli animali, parametro di grande rilevanza nella pratica zootecnica.

13.2.2.3. Prelievi e campionamenti alla macellazione

Al termine della prova, prima dell'invio all'impianto di macellazione, un animale per recinto, il cui peso era simile al peso medio del box, è stato prelevato e sacrificato per le successive analisi. Prima del dissanguamento, tutti i soggetti sono stati storditi per immersione in vasche di stordimento (125 Hz, 80 mA/soggetto, 5 s).

Campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti eparina per l'analisi del profilo lipidico plasmatico e immediatamente centrifugati a 3000 giri x 10 minuti ad una temperatura di 4 °C. Le aliquote plasmatiche così ottenute sono state conservate a -20 °C fino allo svolgimento delle analisi. Sono state inoltre prelevate porzioni di tessuto epatico del peso di 50 – 100 gr, prontamente suddivise in provette, immerse in azoto liquido e conservate a -80 °C fino allo svolgimento delle successive analisi.

Dai 36 soggetti è stato inoltre estratto l'intero tratto intestinale e immediatamente inviato in laboratorio in contenitori sterili e refrigerati per le successive analisi microbiologiche; inoltre sono stati prelevati campioni di pelle, grasso e carne (petto e coscia) anch'essi prontamente inviati in laboratorio per le analisi fisico-chimiche e per la quantificazione del contenuto di polifenoli totali.

Tutte le carcasse sono state pesate dopo eviscerazione al fine di poter calcolare la resa totale nonché il peso del petto in percentuale.

13.2.2.4. Valutazione della qualità della carne

Sui campioni di carne prelevati al macello sono state effettuate le seguenti determinazioni:

pH

Il pH è stato valutato mediante 3 rilevazioni su ciascun campione del petto a 24 h e 9 giorni dopo la macellazione; il valore considerato era la media aritmetica delle 3 rilevazioni.

Colore

Il colore della carne è stato determinato a 24h mediante colorimetro CR-200 Chroma Meter (Minolta, Osaka), individuando 6 punti scelti casualmente sui campioni di petto, coscia, grasso e pelle.

In particolare, sono stati determinati i parametri L* (luminosità), a* (indice di "rosso") e b* (indice di "giallo") per singolo campione.

Stabilità ossidativa

Questo parametro ha previsto l'analisi mediante determinazione di TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), prodotti dalla perossidazione lipidica. A tale riguardo, a 5g di carne macinata sono stati aggiunti 25ml di una soluzione di acido tricloroacetico al 20% e in 20ml di acqua distillata. Il tutto è stato agitato con una bacchetta di vetro e lasciato riposare per un'ora a temperatura ambiente. Dopo il campione è stato centrifugato a 2000 rpm per 10 min, dal surnatante sono stati prelevati 5ml e aggiunti 5ml di una soluzione 0,02M di acido 2-tiobarbiturico. Le provette sono state poste a bagnomaria a 95 °C per 20 min; Dopo aver raffreddato le provette per 10 minuti sotto acqua corrente si è letta l'assorbanza dei campioni contro il bianco alla lunghezza d'onda di 532nm in cuvette con 1 cm di cammino ottico tramite spettrofotometro.

L'assorbanza è stata moltiplicata per una costante di distillazione Kd determinata sperimentalmente dalla curva di taratura.

13.2.2.5. Analisi microbiologiche del contenuto cecale

Dal tratto intestinale di ciascun soggetto sono state prelevate 3 aliquote di 1g del contenuto cecale.

La prima aliquota è stata diluita in 9ml di acqua peptonata e omogeneizzata mediante agitatore Vortex per 40 secondi. Successivamente, sono state effettuate diluizioni seriali 1:10 sui seguenti terreni di coltura:

- 1) M.R.S agar per il conteggio dei lattobacilli incubati a 30 °C per 48 ore in condizioni di anaerobiosi (Anaerobar, Oxoid, Basingstoke).
- 2) APT agar (Biolife) per il conteggio dei batteri lattici etero fermentanti, incubati a 30 °C per 48 ore in condizioni di anaerobiosi.
- 3) TBX agar incubato a 37 °C per 24 ore (Oxoid) per il conteggio di *Escherichia coli*.
- 4) VRB agar incubato a 37 °C per 24 ore (Oxoid) per l'individuazione e la conta di coliformi e in VRBG agar incubato a 37°C per 24 ore (Oxoid) per verificare la presenza e il conteggio di *Enterobacteriaceae*. Sabouraud Dextrose Agar (Scharlab, Barcellona) incubato a 30 °C per 48 ore per la ricerca di Lieviti e muffe. Slanetz-Bartley agar incubato a 37 °C per 48 ore per la ricerca di Enterococchi. mCCDA (Oxoid) per la ricerca di *Campylobacter* spp incubato a 37 °C per 4 ore e successivamente a 42 °C per 44 ore in microaerofilia.

La seconda aliquota è stata diluita 1:10 con Buffered Peptone Water, successivamente incubata a 37 °C per 24 h per la valutazione della presenza di *Salmonella* spp. Dopo l'incubazione, 2 aliquote, rispettivamente di 0.1 e 1mL sono state trasferite in di brodi selettivi Rappaport Vassiliadis broth (9mL) e Muller Kauffman Tetrationsato Novobiocina broth (9mL), successivamente incubati a 42 e 37 °C per 24 ore. Infine aliquote di 0.1mL da ciascun brodo sono state seminate per striscio su Brilliant Green Agar e Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar), incubati a 37 °C per 24 ore. Al termine del periodo di incubazione è stata verificata la morfologia delle colonie eventualmente cresciute.

La terza aliquota è stata trasferita in 9ml di Bolton broth per valutare la presenza di *Campylobacter* spp il brodo è stato incubato a 37 °C per 4 ore e successivamente a 42 °C per 44 ore. Quindi, un'aliquota di 0.1mL è stata seminata su terreno mCCDA, incubato come descritto sopra. Al fine di migliorare la sensibilità di analisi, una seconda aliquota, di 0.4ml è stata seminata su una piastra di agar sangue (Columbia agar, Oxoid + 5% di sangue defibrinato di montone), sulla quale era stata posta una membrana acetato di cellulosa (Sigma Aldrich Italia, Milano) con pori di 0.45µ. Dopo 45 minuti, la membrana è stata rimossa, e l'inoculo è stato strisciato sul terreno. Le piastre sono state quindi incubate a 42 °C per 48 ore. L'identificazione delle colonie tipiche è stata effettuata mediante colorazione di Gram, test della catalasi, prove di crescita in aerobiosi e a bassa temperatura (25 °C).

13.2.2.6. Estrazione e quantificazione del contenuto di polifenoli a livello epatico

La determinazione del contenuto di polifenoli è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Attard (2013), basato sul metodo di Folin-Ciocalteu. Questo metodo si basa sulla riduzione chimica del reattivo di Folin da parte dei composti fenolici presenti, in ambiente alcalino.

La fase iniziale consisteva nella macerazione di 1gr di campione in metanolo (6ml) per 48 ore a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ al fine di massimizzare l'estrazione della componente fenolica in esso presente. Successivamente, il campione veniva sottoposto a centrifugazione (3500 giri per 10 minuti a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) per consentire la separazione tra il surnatante, prelevato per il successivo passaggio, e il pellet cellulare sottostante che veniva scartato.

Successivamente, era prevista l'aggiunta di 2,5ml del reagente Folin-Ciocalteu (FC) e di 2ml di carbonato di sodio (10,589g in 100ml di acqua distillata) in 0,5ml di campione, per un volume totale di reazione pari a 5ml. La presenza del carbonato di sodio nella reazione rende l'ambiente alcalino, condizione ideale per la riduzione dei costituenti del Folin-Ciocalteu (acido fosfotungstico $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ e acido fosfomolibdico $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) in una miscela di ossidi di tungsteno e di molibdeno (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}) di colore blu da parte dei polifenoli presenti nel campione.

Si tratta in particolare di una reazione colorimetrica diretta; ovvero, all'aumentare del tasso di riduzione di questi ossidi, il colore della reazione assume una tonalità blu sempre più intensa, indice di una maggiore concentrazione di composti fenolici nel campione.

Il campione veniva quindi incubato in ambiente buio per evitare la denaturazione del reattivo di Folin per 20 minuti a temperatura ambiente prima della lettura in triplicato allo spettrofotometro, ad una lunghezza d'onda pari a 730nm. Prima della lettura è stata effettuata una scansione UV in un range di 200-800nm al fine di stabilire il picco massimo di assorbimento della componente fenolica (730nm).

Il risultato finale, corrispondente alla media tra le diverse rilevazioni ed espresso in assorbanza, è stato espresso in equivalenti di acido gallico (Claudine *et al*; 2005). Attraverso la lettura dell'assorbanza degli standard, si è costruita una retta di calibrazione ($y = ax + b$ e $R^2 \geq 0.99$), ottenuta inserendo nell'asse delle ordinate la concentrazione espressa in acido gallico ($\mu\text{g/ml}$) e sull'asse delle ascisse il valore di assorbanza degli standard. La risoluzione dell'equazione della retta ha permesso la quantificazione del contenuto in polifenoli totali del campione (espressa in acido gallico eq.), poi trasformato in valore di concentrazione applicando l'equazione della retta calcolata a partire dalla curva standard.

Per la preparazione della curva standard, sono stati pesati 0.240g di acido gallico al quale sono stati aggiunti 250ml di acqua distillata al fine di ottenere una soluzione madre di concentrazione pari a $960\mu\text{g/ml}$. A partire da tale soluzione, sono state allestite le diluizioni seriali 1:2 per ottenere le seguenti concentrazioni di acido gallico: 480, 240, 120, 60, 30 e $0\mu\text{g/ml}$. La lettura

degli standard così ottenuti prevedeva lo stesso protocollo sopra riportato per quanto riguarda i campioni.

13.2.2.7. Estrazione dell'RNA e valutazione dell'espressione dei principali geni coinvolti nel metabolismo lipidico

L'RNA totale è stato estratto dai campioni epatici mediante l'utilizzo di un kit commerciale (SV Total RNA Isolation System Promega). Successivamente, è stata valutata l'integrità dell'RNA estratto mediante gel elettroforesi e la quantità e la qualità mediante spettrofotometro (Synergy HTX) leggendo l'assorbanza a 260 e 280nm.

Per la valutazione dell'espressione dei geni correlati al metabolismo lipidico, l'RNA totale estratto è stato retroscritto utilizzando il kit di sintesi cDNA iScript (Biorad). Al fine di valutare la specificità dei primer utilizzati (Tabella 49) sono state allestite specifiche mastermix per PPAR α , CPT-1, ACOX, ATGL, ACACA e FASN, partendo da un pool costituito da cDNA amplificati mediante PCR qualitativa (Biorad).

Tabella 49. Sequenze dei primers utilizzati.

Geni	Primers	
	Forward	Reverse
<i>PPARα</i>	TGC TGT GGA GAT CGT CCT	CTG TGA CAA GTT GCC GGA
<i>CPT-1</i>	TTC TGC CTT TAT GTC GTT TCC A	TTC TGC CTT TAT GTC GTT TCC A
<i>ACOX</i>	GAG CAT CTG AGG CAC ACT G	CAC CTG AGT AAT TTG GGC GT
<i>ATGL</i>	CCT TCA CTG TCA GAT TGT TGG A	TGG TAC TCC TCC CAC TTC AG
<i>ACACA</i>	TGC CCA AGA GCG TAT ACA G	CAA CTA CTC CTA CAG GTA TTC CTC
<i>FASN</i>	AGC ATA CAC TCA GAG CTA CAG	ATT GAC ACG AGC CTC CAG

L'analisi quantitativa del mRNA è stata effettuata utilizzando la chimica del SYBR green. In dettaglio, la real-time PCR è stata effettuata in 20 μ l totali costituiti da 10 μ l di SYBR green Sensi FASTTM SYBR no-ROX kit 2X, 0,8 μ l di ciascun primer (400nM), 1 μ l di cDNA retroscritto e 7,4 μ l di H₂O. I campioni sono stati amplificati con termociclatore (7500, Applied BioSystem) adottando il profilo termico indicato:

- fase di denaturazione: 95 °C per 10 minuti
 - denaturazione: 95 °C per 20 secondi
 - appaiamento: 63 °C per 60 secondi
 - estensione: 72 °C per 60 secondi
- } 40 cicli

È stato utilizzato il metodo comparativo CT (Livak e Schmittgen, 2001), determinando le variazioni di ripiegamento nell'espressione genica, calcolate come $2^{-\Delta\Delta CT}$. Infine i valori quantitativi sono stati normalizzati a livelli di mRNA β -actin o geni GAPDH.

13.3. Analisi statistica

Le performance di crescita sono state analizzate mediante analisi della varianza con supporto del programma statistico SAS versione 9.2, includendo nel modello gli effetti del trattamento, il periodo e l'interazione trattamento x tempo. Per quanto riguarda le analisi microbiologiche, la resa alla macellazione e la qualità della carne è stata adottata la procedura GLM. Per quanto riguarda invece le analisi microbiologiche, la resa alla macellazione e la qualità della carne è stata adottata la procedura GLM, dove il recinto rappresenta l'unità sperimentale per quanto riguarda le performance di crescita, mentre il singolo soggetto rappresenta l'unità sperimentale per i parametri microbiologici e per la qualità della carne.

13.4. Risultati

13.4.1. Performance di crescita e resa alla macellazione

I risultati relativi alle performance di crescita degli animali sono riportati in Tabella 50. La somministrazione delle diete integrate con polifenoli non ha evidenziato differenze significative ($P>0.05$) sul peso corporeo, sull'incremento ponderale medio giornaliero e sull'assunzione di alimento; tuttavia è possibile osservare un leggero aumento del peso al termine della prova nei gruppi che ricevevano l'estratto di oliva sia rispetto agli altri gruppi sperimentali.

E' stata invece osservata una leggera tendenza alla significatività dell'interazione periodo x trattamento per quanto riguarda l'ICA ($P=0.09$). Tale trend trova conferma in alcune differenze significative nelle diverse fasi tra i gruppi; in particolare, nel periodo 11-20d, l'ICA dei soggetti Ctr è risultato più elevato rispetto al gruppo T1 che riceveva la dieta integrata con Vitamina E (1,407 vs 1,329; $P=0.03$). Analogamente, nel periodo 21-35 d, i polli alimentati con la dieta con elevato tenore di Vitamina E hanno fatto registrare un indice di conversione alimentare più elevato rispetto ai soggetti che ricevevano la dieta integrata con 1 g/kg di estratto di oliva (1,768 vs 1,671; $P=0.01$).

Analizzando l'intero periodo produttivo, i broiler alimentati con il mangime integrato con polifenoli hanno fatto registrare ICA inferiori rispetto agli altri 2 gruppi con una differenza statisticamente significativa tra il gruppo Ctr e il gruppo T2 (1,596 vs 1,545; $P=0.01$) e una tendenza tra il gruppo Vitamina E (T1) e il gruppo T2 (1,581 vs 1,545; $P=0.08$).

Non sono state inoltre osservate differenze per quanto riguarda i rilievi alla macellazione, resa della carcassa e percentuale del peso dei petti ($P>0.05$; Tabella 50).

Tabella 50. Effetti della somministrazione di polifenoli e vitamina E sulle performance di crescita e sulle rese alla macellazione dei broiler.

Item	Trattamento (T)				SEM	P-value		
	CTR	T1	T2	T3		T	tempo	Txtempo
<i>PV</i> ¹ (g)								
d 0	45.1	45.0	44.9	45.1	14.46	0.190	<.0001	0.514
d 10	283.5	270.5	276.8	278.4				
d 20	798.1	784.0	787.8	807.4				
d 35	1963.1	1941.7	1998.2	1999.5				
<i>FI</i> (g/d)								
d 0 to 10	29.64	28.94	29.33	29.40	1.85	0.773	<.0001	0.756
d 11 to 20	72.84	68.18	70.42	72.07				
d 21 to 35	133.09	134.91	134.67	135.13				
d 0 to 35	87.44	85.16	86.21	86.96	1.49	0.459		
<i>IMPG</i> (g/d)								
d 0 to 10	23.68	22.55	23.18	23.32	1.11	0.244	<.0001	0.443
d 11 to 20	51.78	51.35	51.10	52.90				
d 21 to 35	77.66	76.53 ^b	80.69 ^a	79.48				
d 0 to 35	54.80	53.92	55.81	55.84	1.10	0.268		
<i>ICA</i>								
d 0 to 10	1.251	1.285	1.266	1.261	0.02	0.645	<.0001	0.090
d 11 to 20	1.407 ^a	1.329 ^b	1.380	1.364				
d 21 to 35	1.716	1.768 ^a	1.671 ^b	1.701				
d 0 to 35	1.596 ^a	1.581	1.545 ^b	1.557	0.02	0.070		
<i>Mortalità</i> ⁵ (%)	2.22	2.22	0.00	0.56				
<i>Carcass yield</i> ⁶								
<i>Resa</i> (%)	72.18	71.93	71.72	71.87	0.47	0.809		
<i>Petto</i> (%)	26.73	27.87	26.78	27.54	0.75	0.360		

CTR = dieta base senza supplementazioni;

T1 = CTR+VIT E (200 I.U. /kg dal giorno 0 a 35),

T2 = CTR + polifenoli (1g/kg Ethifenol. Dal giorno 0 a 35),

T3 = CTR + polifenoli (5g/kg Ethifenol dal giorno 0 a 35);

¹ PV = peso vivo.

² IMPG = incremento ponderale medio giornaliero.

³ FI = consumo di alimento.

⁴ ICA = indice di conversione alimentare.

⁵ La percentuale di mortalità è stata calcolata dividendo il numero dei soggetti morti per trattamento per il numero dei soggetti totali dello stesso trattamento;

⁶ La percentuale di resa è stata calcolata dividendo il peso della carcassa eviscerata con il peso vivo e la resa del muscolo pettorale è stata calcolata come percentuale del peso eviscerato.

a,b Valori statisticamente significativi P<0.05.

13.4.2. Analisi microbiologica del cieco

Nel presente studio, le diete arricchite con polifenoli o Vitamina E non hanno evidenziato differenze significative ($P>0.05$) tra le popolazioni microbiche indagate a livello cecale, riportate in Tabella 51. Analogamente, non è stata riscontrata la presenza di *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. in alcun campione analizzato; inoltre, non sono state osservate differenze statisticamente significative ($P>0.05$) nei rapporti calcolati tra le diverse popolazioni (*Lactobacilli/E. coli*; *Lactobacilli/Enterobacteriaceae*; *Lactobacilli/Coliformi*; *LAB/Coliformi*; *LAB/Enterobacteriaceae*).

Tabella 51. Effetti della somministrazione di polifenoli e vitamina E sulle analisi microbiologiche del cieco.

Item	Trattamento				SEM	P-value
	CTR	T1	T2	T3		
<i>Batteri acido lattici</i>						
(log CFU/g)	8.36	8.17	8.39	8.20	0.36	0.894
<i>Lactobacilli</i>						
(log CFU/g)	8.89	8.70	8.90	8.56	0.23	0.426
<i>Enterococchi</i>						
(log CFU/g)	7.40	7.24	7.18	7.53	0.29	0.601
<i>Enterobacteriaceae</i>						
(log CFU/g)	7.89	7.84	8.01	8.04	0.34	0.921
<i>Coliformi</i>						
(log CFU/g)	7.91	7.86	7.96	8.01	0.32	0.971
<i>Escherichia coli</i>						
(log CFU/g)	7.61	7.78	7.76	7.77	0.36	0.956
<i>Yeasts</i>						
(log CFU/g)	7.43	7.37	7.05	7.23	0.33	0.700
<i>Clostridia</i>						
(log CFU/g)	2.93	3.62	4.22	3.04	0.72	0.556
<i>Salmonella spp.</i>						
(log CFU/g)	assente	assente	assente	assente		
<i>Campylobacter spp.</i>						
(log CFU/g)	assente	assente	assente	assente		
<i>Lactobacilli/E. coli</i>	1.28	0.92	1.14	0.79	0.33	0.465
<i>Lactobacilli/Enterobacteriaceae</i>	1.00	0.86	0.89	0.52	0.33	0.519
<i>LAB/E. coli</i>	0.75	0.39	0.63	0.42	0.25	0.394
<i>LAB/Enterobacteriaceae</i>	0.47	0.34	0.38	0.13	0.18	0.309
<i>Lactobacilli/Coliformi</i>	0.98	0.84	0.94	0.55	0.32	0.542
<i>LAB/Coliformi</i>	0.45	0.31	0.43	0.19	0.17	0.403

CTR = dieta base senza supplementazioni;

T1 = CTR+VIT E (200 I.U. /kg dal giorno 0 a 35),

T2 = CTR + polifenoli (1g/kg Ethifenol. Dal giorno 0 a 35),

T3 = CTR + polifenoli (5g/kg Ethifenol dal giorno 0 a 35).

13.4.3. Qualità della carne

In Tabella 52 sono riportati i risultati relativi alla qualità della carne. L'integrazione con polifenoli e Vitamina E non hanno influenzato il pH del muscolo *pectoralis* nonché il colore valutato in corrispondenza di petto, pelle, coscia e grasso sia direttamente alla macellazione che dopo 9 giorni ($P>0.05$).

La stabilità ossidativa, misurata a livello di petto attraverso la determinazione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), è invece risultata più elevata solo nel gruppo degli animali alimentati con Vitamina E, 9 giorni dopo la macellazione (Tabella 52).

Come è noto, la presenza nelle carni di sostanze reattive all'acido tiobarbiturico è valutata al fine di verificare il grado di ossidazione dei lipidi. A tale riguardo, è utile ricordare che i grassi utilizzati nella formulazione delle diete erano costituiti da olii vegetali ad elevato grado di insaturazione al fine di confermare gli effetti antiossidanti della Vitamina E e dei polifenoli. La formazione di TBARS aumenta in relazione al periodo di incubazione ($P<0.0001$). Tuttavia, solo nei petti degli animali che avevano ricevuto la dieta integrata con Vitamina E sono stati evidenziati valori di TBARS inferiori rispetto agli altri gruppi 9 giorni dopo la macellazione ($P<0,05$).

Infine, il trattamento con Vitamina E e polifenoli non ha evidenziato differenze statisticamente significative ($P>0.05$) sul colore delle carni, ad eccezione del parametro b^* relativo alla pelle ($P=0.003$); inoltre, è possibile osservare una tendenza alla significatività per quanto concerne l'interazione trattamento x periodo per quanto riguarda l'indice di giallo (b^*) del muscolo pettorale ($P=0.064$).

Tabella 52. Effetti della somministrazione di polifenoli e vitamina E su pH, colore e ossidazione della carne.

Item	Tempo	Trattamento (T)				SEM	P-value			
		CTR	T1	T2	T3		T	tempo	Txtempo	
<i>TBARS</i>	0d	0.15	0.15	0.14	0.15	0.03	0.160	<.0001	0.075	
	9d	0.30	0.20	0.35	0.32					
<i>pH</i>	0d	6.27	6.26	6.25	6.17	0.03	0.455	0.768	0.349	
	9d	6.23	6.27	6.23	6.23					
<i>Colore</i>										
<i>Petto</i>	<i>L</i>	0d	53.97	55.22	56.53	55.92	0.97	0.508	<.0001	0.064
		9d	58.05	60.07	57.01	57.68				
	<i>a</i>	0d	-0.42	-0.43	-0.57	-0.87	0.35	0.548	<.0001	0.468
		9d	-1.74	-2.10	-1.18	-1.84				
	<i>b</i>	0d	10.21	10.34	10.77	9.62	0.76	0.379	<.0001	0.209
		9d	13.49	13.84	11.58	11.94				
<i>Pelle</i>	<i>L</i>	0d	71.11	71.17	70.65	71.33	0.76	0.620	0.0001	0.959
		9d	68.75	68.60	68.06	69.46				
	<i>a</i>	0d	-2.04	-1.41	-0.77	-1.74	0.39	0.214	0.198	0.630
		9d	-1.15	-1.22	-0.87	-1.26				
	<i>b</i>	0d	20.84	19.20	17.91	18.23	0.82	0.003	<.0001	0.544
		9d	22.46	23.01	20.26	20.08				
<i>Coscia</i>	<i>L</i>	0d	52.02	52.28	53.72	52.80	0.58	0.178	<.0001	0.252
		9d	55.44	57.09	56.22	56.04				
	<i>a</i>	0d	0.55	0.88	0.33	0.70	0.32	0.567	0.062	0.595
		9d	0.58	0.04	-0.06	0.20				
	<i>b</i>	0d	8.44	8.19	8.91	8.40	0.50	0.397	<.0001	0.124
		9d	11.83	11.44	10.35	10.18				
<i>Grasso</i>	<i>L</i>	9d	74.13	74.88	75.01	72.78	0.96	0.310		
		<i>a</i>	9d	-0.26	-0.03	0.12				
	<i>b</i>	9d	22.78	22.65	22.21	21.64	0.72	0.649		

CTR = dieta base senza supplementazioni;

T1 = CTR+VIT E (200 I.U. /kg dal giorno 0 a 35),

T2 = CTR + polifenoli (1g/kg Ethifenol. Dal giorno 0 a 35),

T3 = CTR + polifenoli (5g/kg Ethifenol dal giorno 0 a 35);

13.4.4. Quantificazione dei polifenoli e livello epatico

La Tabella 53 riporta i valori di assorbanza e le relative concentrazioni degli standard precedentemente preparati, utilizzati per il calcolo della curva standard (Grafico 17).

Tabella 53. Valori di assorbanza e relative concentrazioni degli standard utilizzati per la quantificazione del contenuto di polifenoli

Concentrazione (ug/ml)	Assorbanza
0	0,0556
30	0,3718
60	0,6883
120	1,2842
240	2,3582
480	4,2864

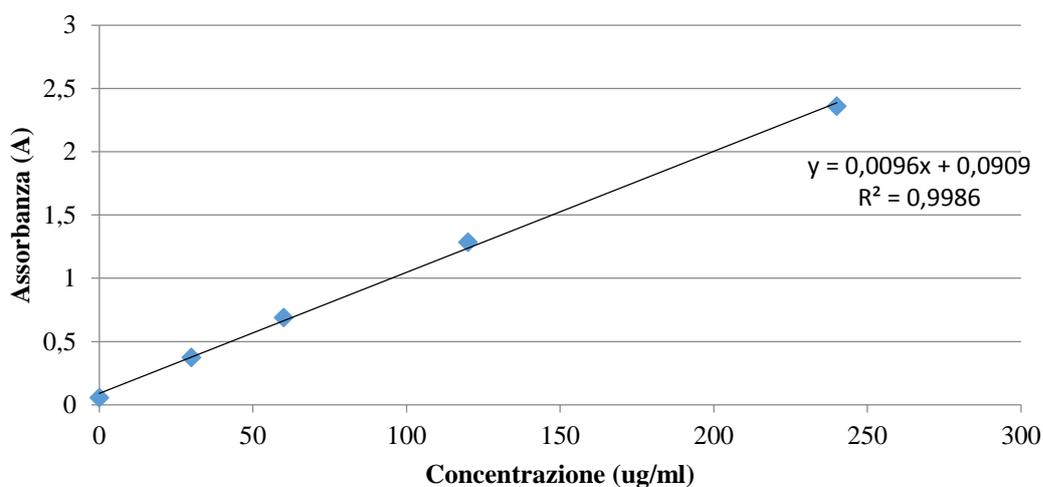


Grafico 17. Curva standard per la determinazione del contenuto di polifenoli

La Tabella 54 mostra i risultati relativi alla quantificazione dei polifenoli nel tessuto epatico.

Tabella 54. Contenuto di polifenoli totali nei campioni epatici analizzati.

Gruppo	mg polifenoli/mg tot
C	0,088 ± 0,035
T2	0,089 ± 0,051
T3	0,096 ± 0,050

Come è possibile notare dalla Tabella 54, non sono state osservate differenze significative ($P > 0.05$) tra il gruppo controllo e i gruppi integrati con polifenoli; tuttavia è possibile osservare una tendenza all'aumento della concentrazione epatica di polifenoli ($C < T2 < T3$) che rispecchia il livello di integrazione.

13.4.5. Estrazione dell'RNA e valutazione dell'espressione dei principali geni coinvolti nel metabolismo lipidico

Prima di procedere con l'analisi quantitativa, è stata valutata l'integrità dell'RNA totale estratto dai campioni epatici per rilevare la presenza e l'integrità delle bande corrispondenti a 18s e 28s (Figura 25) e la qualità mediante valutazione spettrofotometrica della ratio abs260/abs280. In tutti i campioni estratti, la ratio era compresa tra 1.8 e 2.

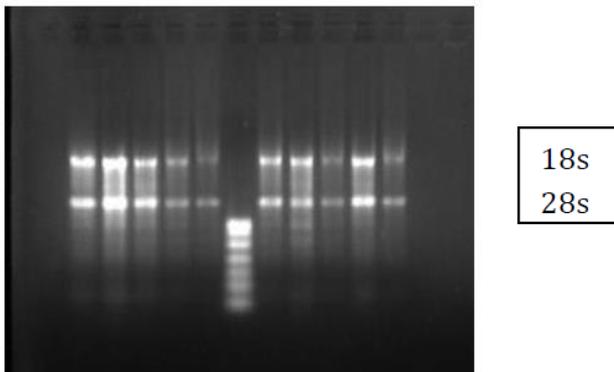


Figura 25. Risultato dell'RNA estratto suddiviso nelle due bande specifiche 18s e 28s.

La specificità dei primer per l'amplificazione dei geni PPAR α , CPT-1, ACOX, ATGL, ACACA e FASN, nonché dei primer dei geni housekeeping (mRNA β -actin o geni GAPDH) è stata testata (dati non mostrati).

Il Grafico 18 mette a confronto i livelli di espressione dei geni coinvolti con il metabolismo lipidico presi in considerazione. Come si evince, la somministrazione dell'estratto di oliva con un elevato tenore di polifenoli non influisce in maniera significativa ($P>0.05$) sull'espressione genica. Tuttavia, analizzando i risultati più nel dettaglio, è possibile notare una tendenza alla down-regolazione dei geni PPAR α , ATGL e ACACA in relazione al livello di integrazione dell'additivo.

Al contrario, per quanto riguarda i geni CPT-1 e ACOX, il gruppo T2 presentava il maggior livello di espressione, seguito dal gruppo controllo e infine dagli animali T3.

Infine, è stato osservato che l'espressione del gene FASN nel gruppo T2 era inferiore al gruppo T3 e al controllo ($T2<T3<C$).

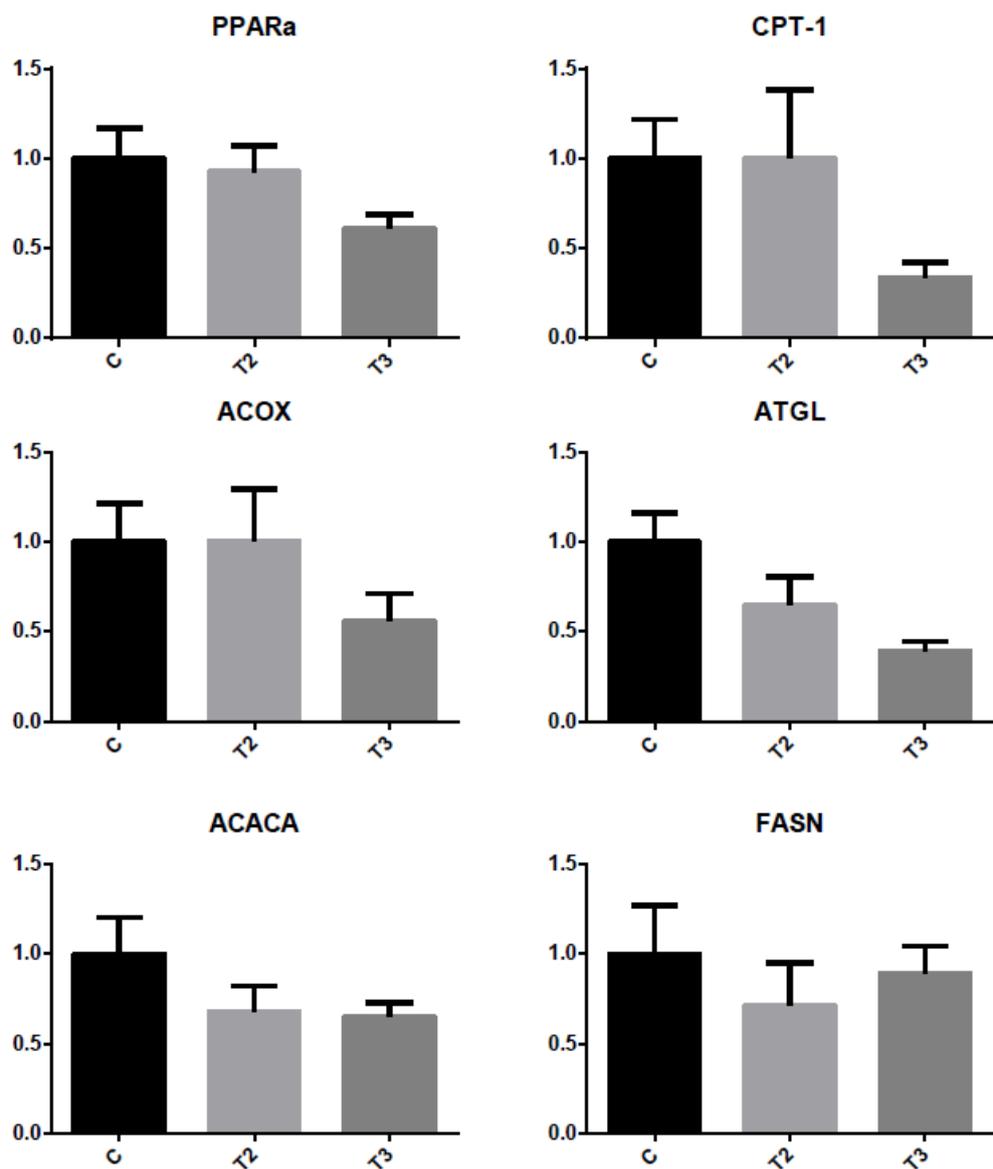


Grafico 18. Risultati dell'espressione dei geni coinvolti con il metabolismo lipidico nei differenti gruppi sperimentali.

13.5. Discussione

I risultati relativi alle performance produttive appaiono interessanti considerando il breve ciclo produttivo dei polli da carne. King *et al.* (2014), a seguito della somministrazione ai broiler di un estratto di olive contenente 8,82% di polifenoli e 2,5% idrossitirosolo attraverso l'acqua di bevanda per un periodo di 6 settimane, non ha osservato differenze significative negli incrementi ponderali e nell'assunzione alimentare. Analogamente, studi effettuati da Paiva-Martins *et al.* (2009) e da Botsoglou *et al.* (2010) non hanno evidenziato variazioni significative nelle performance produttive rispettivamente di suini e tacchini alimentati con diete integrate con foglie di olive.

Secondo una prova *in vivo* condotta da Wang *et al.* (2011), una dieta integrata con Vitamina E potrebbe al contrario favorire un maggior sviluppo della massa muscolare degli animali, riducendo nel contempo il grasso addominale con favorevoli ripercussioni sulla resa, tuttavia nel presente lavoro, non sono state osservate differenze significative ($P > 0.05$) alla macellazione; dati confermati da Kim *et al.*, 2010.

Analizzando i dati relativi alla mortalità, sebbene in assenza di significatività statistica, i risultati hanno evidenziato come gli animali trattati con polifenoli presentavano percentuali inferiori (0 e 0,56% rispettivamente per T2 e T3) rispetto agli altri due gruppi sperimentali (2,2%); tali risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura. Uno studio condotto da Cao *et al.* (2005) ha riportato una riduzione della mortalità in broiler alimentati con una dieta integrata con polifenoli estratti dal tè verde tra i 28 e i 42 giorni del ciclo produttivo (1.21% vs 3.2% nel gruppo controllo).

E' interessante notare che gli stessi autori riportano un'analogia riduzione della mortalità anche in soggetti che invece ricevevano una dieta integrata con prebiotici (Frutto-oligosaccaridi, FOS = 1.86%); l'integrazione di additivi nella pratica zootecnica sembrerebbe quindi in grado di migliorare i principali parametri produttivi dei polli da carne, anche grazie al miglioramento dello stato di salute.

L'interesse legato all'impiego di estratti vegetali ricchi in polifenoli nelle diete per il miglioramento della qualità della carne è prevalentemente dovuto all'attività antiossidante.

In tal senso, l'utilizzo degli antiossidanti sarebbe in grado di proteggere la carne dall'ossidazione, migliorandone il colore, la shelf-life, il valore nutritivo e le caratteristiche sensoriali (Goni *et al.*, 2007). Inoltre, non è da trascurare il fatto che alcune molecole prodotte dall'ossidazione lipidica rappresentano un rischio per la salute umana per la loro azione mutagena e aterogena.

Considerata la potenziale efficacia delle componenti fenoliche, in particolare idrossitirosolo, nella neutralizzazione dei radicali liberi, si può ipotizzare l'efficacia dei polifenoli nel ritardare

l'ossidazione dei lipidi nelle carni avicole. La carne di pollo contiene infatti circa 1,00 - 6,5% di grassi, con una percentuale di acidi grassi polinsaturi del 30% o anche superiori nel caso di diete contenenti solo olio vegetale come fonte lipidica; l'integrazione delle diete con antiossidanti diventa quindi utile al fine di ritardare il rischio di ossidazione dei lipidi durante la lavorazione e la conservazione delle carni.

Una ricerca condotta da Eid *et al.* (2003) ha riportato che la maggior parte delle perdite negli allevamenti avicoli intensivi, sia in termini di crescita che di mortalità, sono dovute a disordini intestinali e alterazioni della salute dell'intestino provocati da squilibri delle popolazioni microbiche. Negli ultimi anni la ricerca di prodotti naturali in grado di sostituire le sostanze di sintesi si è fortemente ampliata; in particolare, molti studi si stanno concentrando sugli estratti di olive contenenti importanti composti fenolici come oleuropeina, idrossitirosolo e tirosolo (Briante *et al.*, 2002). Tali polifenoli sono efficaci agenti antiossidanti in grado di agire sia come "scavenging" delle specie reattive all'ossigeno e all'azoto, sia bloccando le reazioni a cascata indotte dai ROS. Queste molecole risultano quindi efficaci nel prevenire o contenere lo stress ossidativo e di migliorare lo stato di salute dell'animale grazie alle loro attività antiinfiammatorie, antivirali e antibatteriche (Pereira *et al.*, 2006; Proestos *et al.*, 2005; Rauha *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2004; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

In particolare, estratti di foglie di olive hanno evidenziato attività antibatteriche nei confronti di diverse specie batteriche sia Gram + sia Gram - quali *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* (Pereira *et al.*, 2007). Secondo Giavais *et al.* (2012), i polifenoli estratti da sottoprodotti della lavorazione delle olive potrebbero stimolare la proliferazione di batteri produttori di acido lattico, da cui si evince una loro possibile applicazione nelle diete per gli animali al fine di orientare l'equilibrio microbico più favorevole per la salute dell'intestino. Altri autori hanno invece osservato effetti antibatterici da parte di polifenoli estratti dalle acque di vegetazione derivanti dalla lavorazione delle olive, solo nei confronti di *Staphylococcus aureus* e ad elevate concentrazioni (5mg/mL), mentre nessuna o scarsa attività è stata osservata nei confronti di *Escherichia coli* e *Streptococcus fecalis* (Leouifoudi *et al.*, 2015). Uno studio condotto da Yangui *et al.* (2010) ha osservato una buona attività antimicrobica da parte dell'idrossitirosolo e del tirosolo solo nei confronti di batteri Gram +; queste osservazioni sono peraltro confermate anche da altri studi che riportano azioni antibatteriche sui Gram + da parte di flavonoidi come la quercetina (Shan *et al.*, 2007) e la luteolina (Askun *et al.*, 2009). Secondo tali autori gli effetti antibatterici degli estratti naturali sono meno evidenti nei confronti dei batteri Gram -, come ad esempio *Escherichia coli*, rispetto a quelli Gram + a causa della presenza di uno strato lipopolisaccaridico sulla membrana cellulare dei primi che li rende particolarmente resistenti ai principi naturali antibatterici.

Molti studi *in vitro* sono in grado di dimostrare gli effetti antibatterici dei principi attivi di sostanze naturali, tuttavia non sempre i risultati confermano quanto osservato in laboratorio, quando queste attività vengono verificate *in vivo*. Tali risultati non trovano conferma con quanto dimostrato da altri autori (Cao *et al.*, 2005), i quali hanno osservato una significativa riduzione delle popolazioni microbiche del cieco di polli da carne alimentati con diete integrate con polifenoli estratti da tè verde. Lo studio condotto da Cao *et al.* (2005) riporta invece una riduzione della concentrazione di acidi grassi volatili e di altri prodotti della fermentazione batterica, quali fenolo, cresolo, indolo, anche a conferma della riduzione del numero delle popolazioni microbiche cecali.

La discrepanza tra questi risultati e quelli ottenuti nella prova sperimentale riportata può essere dovuta anche alle diverse condizioni ambientali. E' possibile infatti che gli effetti derivanti dall'azione dei polifenoli possono risultare più evidenti quando gli animali sono sottoposti a maggiori condizioni di stress (carica microbica ambientale, affollamento, qualità della dieta, ecc.).

In aggiunta, è interessante notare come l'azione antibatterica esercitata dai polifenoli risulti aspecifica in relazione alla concentrazione di polifenoli nella dieta, alla resistenza dei microrganismi intestinali, alla qualità della dieta e alle condizioni ambientali. Viceversa, nel caso dei prebiotici quali frutto-oligosaccaridi, mannano-oligosaccaridi, inulina ecc. si osserva un'azione selettiva di stimolo proliferativo nei confronti dei batteri commensali che, aumentando di numero nel tratto intestinale, esercitano un'azione competitiva nei confronti dei batteri potenzialmente patogeni. Potrebbe dunque risultare interessante una loro contemporanea presenza nella dieta al fine di migliorare la salute dell'intestino. Per quanto riguarda invece l'effetto di protezione delle membrane cellulari dai fenomeni di perossidazione lipidica esercitata dalla Vitamina E, tale attività è stata ampiamente confermata (Raiola *et al.*, 2015; Surai e Fisinin, 2010; Surai, 2002).

I dati relativi all'effetto dell'integrazione di polifenoli sulla qualità della carne non trovano riscontro in letteratura; non sono infatti riportati dati inerenti il colore delle carni a seguito del trattamento con polifenoli. I risultati ottenuti nel gruppo T1 sono invece sovrapponibili ad altri studi che hanno valutato l'integrazione di vitamina E nella dieta di broiler (Hu *et al.*, 2015; Simitzis *et al.*, 2011; Goliomytis *et al.*, 2015).

Le diete integrate con diversi livelli di estratti di olive non hanno influenzato la stabilità ossidativa delle carni, diversamente da quanto riportato in letteratura; alcuni studi hanno riportato che estratti vegetali ricchi in polifenoli determinano nelle carni avicole gli stessi effetti antiossidanti di una dieta arricchita con vitamina E (Leouifoudi *et al.*, 2015; Brenes *et al.*, 2007).

In accordo con quanto trovato nel presente lavoro, King *et al.* (2014) non ha evidenziato differenze nella stabilità ossidativa delle carni avicole a seguito della somministrazione di un estratto di polpa di oliva (contenuto di idrossitiroso 2,5%) sia nella fase *in vivo* che nel corso di uno studio *in vitro*. Per contro, altri autori hanno invece osservato un aumento della stabilità ossidativa nelle carni provenienti da suini e tacchini alimentati con foglie di olive (Paiva-Martins *et al.*, 2009; Botsoglou *et al.*, 2010). Questi autori attribuiscono i ridotti livelli di perossidi alla più elevata concentrazione di α -tocoferolo nel grasso delle carni dei suini alimentati con foglie di olive, pertanto non è da escludere un possibile effetto sinergico tra Vitamina E e idrossitiroso.

Anche altri autori hanno osservato una riduzione dell'ossidazione di lipidi nelle carni di tacchini alimentati con foglie di olive in ragione di 10g/kg di alimento, tuttavia i livelli di stabilità ossidativa risultavano inferiori rispetto a quello osservato con diete integrate con α -tocoferil-acetato (300mg/kg) (Medina *et al.*, 2009).

In una ricerca che ha previsto l'impiego di estratti vegetali titolati in verbascoside è stata invece riportata una riduzione della perossidazione dei lipidi, quando tale composto veniva impiegato in ragione di 2,5mg/kg, mentre dosaggi superiori (5mg/kg) non hanno evidenziato differenze rispetto al gruppo di controllo (De Marco *et al.*, 2015). Smet *et al.* (2008) ha osservato valori di TBARS più elevati nelle carni avicole quando la dose di estratto di tè verde aumentava da 100 a 200mg/kg. Al contrario, Tang *et al.* (2000) ha riportato un effetto antiossidante dose-dipendente con livelli di catechine da 100 a 300mg/kg di alimento. Tali differenze potrebbero essere dovute alle diverse concentrazioni di catechine presenti negli estratti di tè verde.

Liu *et al.* (2003) ha osservato una riduzione dei valori di TBARS nel plasma di conigli che ricevevano due volte al giorno una dieta contenente 0,8mg/kg di verbascoside; inoltre, altri studi effettuati con colture cellulari hanno chiaramente evidenziato effetti sia pro-ossidanti sia antiossidanti da parte di polifenoli estratti dall'olio di oliva (Cardinali *et al.*, 2012). Infine, secondo uno studio condotto da Medina *et al.* (2009), gli effetti antiossidanti dell'idrossitiroso risultano più evidenti quando il principio attivo è inserito in una emulsione di acidi grassi a corta e media catena in grado di favorire una maggiore penetrazione, ridurre la tensione interfacciale e stabilizzando quindi il sistema.

Appare dunque evidente la necessità di acquisire ulteriori informazioni scientifiche al fine di comprendere meglio gli effetti antiossidanti *in vivo* dei polifenoli, concentrandosi nello specifico su possibili meccanismi d'azione dose dipendenti.

Il fegato rappresenta l'organo più importante per il metabolismo energetico e lipidico e lo studio dell'espressione dei geni epatici coinvolti nella β ossidazione o nella sintesi *de novo* di acidi grassi potrebbe rappresentare uno strumento valido per meglio comprendere le risposte enzimatiche di adattamento in relazione a variazioni della dieta (Huang *et al.*, 2013). In tal

senso, al fine di investigare gli effetti dell'estratto di oliva ad elevato tenore di polifenoli sul metabolismo lipidico, sono stati valutati i seguenti geni: PPAR α , CPT-1, ACOX, ATGL, ACACA e FASN.

La somministrazione dell'estratto di oliva con un elevato tenore di polifenoli non influisce in maniera significativa ($P>0,05$) sull'espressione genica; tuttavia è stata osservata una tendenza alla down-regolazione dei geni PPAR α , ATGL e ACACA in relazione al livello di integrazione dell'additivo. Al contrario, per quanto riguarda i geni CPT-1 e ACOX, il gruppo T2 presentava il maggior livello di espressione, seguito dal gruppo controllo e infine dagli animali T3.

Infine, è stato riscontrato che l'espressione del gene FASN nel gruppo T2 era inferiore al gruppo T3 e al controllo ($T2<T3<C$). In accordo con quanto riportato da Kim *et al.* (2013), la somministrazione dell'additivo oggetto della presente prova non ha modificato in maniera significativa l'espressione dei geni di interesse. Gli autori hanno infatti osservato che la somministrazione di un estratto di Avonia nera arricchito con polifenoli a topi non ha provocato delle differenze significative ($P>0.05$) nell'espressione dei geni FAS, ACOX e CPT1. In aggiunta, uno studio condotto da Benn *et al.* (2014) su modello murino ha dimostrato che l'aggiunta di un estratto di ribes nero non influisce in maniera significativa sull'espressione di geni coinvolti nella lipogenesi (PPARs e FAS) e nella β ossidazione (CPT1 e ACOX-1) a livello muscolare e adiposo.

Tuttavia, in letteratura diversi autori hanno osservato delle differenze statistiche nell'espressione genica in seguito alla somministrazione di composti fenolici nella specie avicola. Ad esempio, Huang *et al.* (2013) ha osservato una significativa modificazione dei geni coinvolti nella β ossidazione e nella lipogenesi con la somministrazione di una miscela di polifenoli estratti dal tè verde nel mangime di polli da carne. In particolare, gli autori hanno riportato un aumento dell'espressione di CPT-1, ACOX e PPAR α ed una significativa down regolazione di FAS.

Lo stesso team di ricerca, in un successivo lavoro, si è focalizzato sugli effetti a medio-lungo termine dell'epigallocatechina-gallato (EGCG), un composto abbondantemente presente nel tè verde, sull'attività dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico (Huang *et al.*, 2015). Come in precedenza, gli autori hanno osservato una significativa down regolazione dei geni responsabili della lipogenesi (ACC e FAS) e un aumento dell'espressione di PPAR α , ACOX e CPT-1 dopo due settimane di trattamento con EGCG disciolta in acqua; tali effetti erano tuttavia meno evidenti al termine della prova, dopo quattro settimane totali di integrazione. Gli autori hanno giustificato tali risultati come una possibile risposta adattativa degli animali in seguito alla somministrazione prolungata con il composto fenolico.

I polifenoli sono una classe molto ampia di molecole organiche naturali caratterizzate da composizione chimica, biodisponibilità ed attività biologica differenti; di conseguenza la scelta del composto, del dosaggio, della durata e del metodo di somministrazione, miscelato all'alimento o disciolto in acqua, rappresentano senza dubbio delle variabili in grado di spiegare le differenze riscontrate in letteratura nell'espressione dei geni di interesse.

Inoltre, i composti fenolici somministrati attraverso la dieta subiscono diversi processi di degradazione e metabolizzazione nel tratto gastrointestinale prima o durante l'assorbimento; di conseguenza, la loro differente biodisponibilità a livello tissutale e la loro possibile interazione a livello molecolare potrebbero contribuire alla mancanza di uniformità dei risultati (Kim *et al.*, 2013).

13.6. Conclusioni

Dai risultati di questo studio è stato osservato che la somministrazione dell'estratto di *Olea europea*, oggetto della presente prova, ha provocato lievi effetti sulle performance di crescita, che tuttavia appaiono interessanti in considerazione del breve ciclo produttivo dei polli da carne. Tuttavia, data l'elevata variabilità della concentrazione dei principi attivi e i complessi meccanismi d'azione, saranno necessari ulteriori approfondimenti sui dosaggi e sui possibili effetti sinergici con gli altri principi nutritivi.

14. III prova sperimentale: Effetto dell'integrazione di un estratto di *Olea Europaea* nell'allevamento del suino

14.1. Introduzione

Nel corso degli ultimi anni la selezione genetica ha portato alla produzione di scrofe iperprolifiche al fine di migliorare la produttività dell'allevamento suinicolo con un aumento del numero di suinetti svezzati e un ridotto numero di riproduttori.

L'aumento della prolificità non è un aspetto privo d'inconvenienti; le nidiatae numerose presentano infatti un maggior numero di suinetti tendenzialmente sottopeso, inoltre non si può escludere il rischio che le scrofe non siano in grado di produrre quantità di latte sufficienti ad assicurare un adeguato apporto di nutrimenti a tutta la nidiata. Tutto questo si ripercuote inevitabilmente sulle performance di crescita degli animali.

In linea con le nuove disposizioni della Comunità Europea che tendono a limitare l'utilizzo di antibiotici nell'ambito dell'allevamento delle specie di interesse zootecnico, l'interesse della ricerca si è spinto verso lo studio delle proprietà benefiche degli estratti vegetali. Dalle piante si possono ricavare sostanze bioattive con comprovate proprietà benefiche sull'organismo e sulle produzioni animali; tra queste, un esempio è rappresentato dai polifenoli, gruppo eterogeneo di composti organici con importanti proprietà antiossidanti, anti-microbiche e immunostimolanti.

Questo lavoro si propone di valutare gli effetti dell'integrazione di un estratto di polpe di oliva arricchito con polifenoli all'interno del ciclo produttivo del suino. In particolare, la prova sperimentale era composta da due fasi; durante la prima fase il prodotto oggetto della prova è stato somministrato alle scrofe, da due settimane prima del parto e per l'intera durata della lattazione, al fine di valutare gli effetti sulla condizione corporea e sulle performance riproduttive delle stesse. La seconda fase coinvolgeva invece i suinetti nati dalle madri oggetto della precedente fase, a cui è stato somministrato lo stesso prodotto per studiare gli effetti sulle performance di crescita e lo stato di salute degli stessi.

14.2. Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta a partire da Maggio 2016 fino a Agosto 2016 presso l'Azienda Agricola Arioli-Sangalli, situata a Genzone in provincia di Pavia.

L'allevamento era composto da capannoni dedicati alle scrofe (gestazione e sale parto, Sito 1) e da capannoni per il magronaggio e il finissaggio dei suini (Sito 3). Per quanto riguarda la fase

di svezzamento gli animali erano stabulati in un altro allevamento dedicato solo a questa fase (sito 2), distante pochi chilometri dai Siti 1 e 3.

I suini sono stati allevati in linea con le disposizioni normative stabilite dal disciplinare per la produzione del prosciutto crudo di Parma DOP.

14.2.1. Animali e stabulazione

Fase 1

La prova è stata condotta su un gruppo di 18 scrofe pluripare Topigs, omogenee per età e ordine di parto, ed è durata dalla fase finale della gestazione (circa due settimane prima della data prevista del parto) fino al termine della lattazione (25 d). Durante la gestazione le scrofe erano stabulate in 2 box multipli di 9 soggetti ciascuno, mentre una settimana prima del parto sono state trasferite nelle sale parto.

Al fine di garantire alle madri e ai suinetti delle condizioni ottimali, le sale parto erano dotate di un sistema di controllo della temperatura (26 °C) e dell'umidità (65%) (Figura 26); inoltre, ogni box parto prevedeva una lampada riscaldante per i suinetti in modo che il nido avesse una temperatura di circa 32-34 °C, valore ottimale per evitare stress termici agli animali. Sia durante la fase di gestazione sia in lattazione, la somministrazione dell'alimento era garantita da una distribuzione automatizzata.

Dopo la nascita, è stato effettuato il pareggiamento, ovvero la ridistribuzione delle nidiate tra le diverse scrofe appartenenti allo stesso gruppo sperimentale, con lo scopo di uniformare la numerosità ed il peso degli stessi.



Figura 26. Sistemazione delle scrofe in sala parto con le nidiate.

Durante la gestazione, le 18 scrofe sono state suddivise in due gruppi sperimentali da 9 soggetti ciascuno; un gruppo ha ricevuto la dieta base (Controllo = C), l'altro l'integrazione di 1,25 kg/ton di un estratto da polpe di olive, equivalente a 450mg/scrofa/d (Trattato = T).

Il prodotto oggetto della prova era caratterizzato da un elevato contenuto di polifenoli (Polifenoli totali = 33.900mg/kg e Idrossitirosolo = 11.600mg/kg di prodotto). Le diete sperimentali e le relative analisi chimiche sono riportate in Tabella 55 e Tabella 56.

Tabella 55. Composizione della dieta delle scrofe in gravidanza e lattazione.

Ingredienti (% SS)	Gestazione II fase	Lattazione
<i>Mais farina</i>	26,3	31,9
<i>Orzo farina</i>	16	22,5
<i>Crusca frumento</i>	21,9	14,25
<i>Nucleo 32,5 % PG¹</i>	--	25
<i>Distillers solubili</i>	14,5	--
<i>Lievito liquido</i>	10	--
<i>Biscotti</i>	5,8	3
<i>Semolino</i>	--	1,85
<i>Olio di soia</i>	1,5	1,5
<i>Pastone⁴</i>	1,5	--
<i>IMV²</i>	2,5	--

1 Nucleo Scrofe lattazione: Componenti analitici % su t.q.: PG 32,5 %; Oli e grassi 6,25 %; Fibra grezza 6,5 %; Ceneri 15,75 %; Lisina 2,5 %; Metionina 0,58%, Sodio 0,80%. Additivi per kg: Vitamine: (3a672) Vit. A 28.590 U.I. (E671); Vit. D3 5.700 U.I. (3a700); Vit. E/tutto-rac-alfa-tocofenile acetato 200mg; Vit. B1 5,8mg; Vit B2 6mg; (3a831) Vit. B6-cloridrato di piridossina 11mg. Vit. B12 0,065mg. Vit H (Biotina) 1,8mg; Vit. K 18mg. Vit. PP 117mg. (3a316) Acido folico 8,8mg, acido d-pantotenico 40mg; (3a680) Colina Cloruro 2.800mg. Oligoelementi: (E1) carbonato ferroso 1.140mg; (E6) ossido di zinco 413mg; (E4) sodio rameico pentaidrato 262mg; (E5) solfato manganoso monoidrato 616 mg. (E2) iodato di calcio anidro 5,13mg. Promotori della digestione: (4a1600) fitasi EC 1 3 8 2.000 FYT. Antiossidanti: (E321)8HT-butildrossitoluene 125mg. Sulfametazona 400mg; tilosina 400mg

2 IMV Scrofe gestazione: Componenti analitici % su t.q.: Calcio 24,6%; fosforo 1,0%; Sodio 6,3%; Ceneri insolubili in HCL 2,3%; Lisina 1,5%; Metionina 0,0%. Additivi per KG: Vitamine, pro-vitamine e sost. a effetto analogo: Vit. A (3a672a) 220.000mg; Vit. E (3a700) 1.200mg; Vit K3 (3a711) 22mg; Vit. B1 (3a821) 39,4mg; Vit. B2 (Riboflavina) 160mg; Vit. B6/cloridrato di piridossina (3a831) 290mg; Vit. B12 1,2Mg; Niacinamide (3a315) 440mg; Cloruro di colina (3a890); (3a841) Clacido D-pantotenato 470mg; Acido folico (3a316) 55mg; Biotina (3a880) 8,8mg. Composti di oligoelementi: E 1 solfato ferroso, monoidrato 20.672mg; E4 Solfato rameico, pentaidrato 1.729mg; 3b605 solfato di zinco monoidrato 12.333mg; E5 Ossido manganoso 2.245mg; 3b201 Ioduro di potassio E8 Selenito di sodio 17,5mg. Antiagglomeranti: Clinoptilolite di orig. Sedim. 1g 568 25.000mg Aminoacidi, loro Sali e analoghi: Monocloridrato di L-lisina 3.2.3 20.000mg Promotori di digestione: (4a12) 6-fitasi 14.000 FYT.

Tabella 56. Analisi chimica della dieta delle scrofe in gravidanza e lattazione.

Analisi chimica	Gestazione II fase	Lattazione
<i>PG</i>	15,6	18,3
<i>LG</i>	3,5	5
<i>FG</i>	6,1	5,3
<i>Ca</i>	1	1,1
<i>P</i>	0,72	0,78
<i>Lisina</i>	0,78	1,08
<i>Metionina+Cistina</i>	0,58	0,66
<i>EM, kcal/kg SS</i>	3280	3555
<i>EN, Kcal/kg SS</i>	2490	2670

Una settimana prima della data prevista del parto le scrofe sono state trasferite nelle sale parto secondo lo schema indicato in Tabella 57 e Tabella 58 ed alimentate con una dieta specifica per la lattazione. La dieta del gruppo trattato presentava le stesse concentrazioni di polifenoli rispetto alla dieta utilizzata in precedenza, tuttavia, la razione era somministrata in forma liquida con un rapporto di diluizione acqua: alimento pari a 2,75: 1.

Tabella 57. Disposizione delle scrofe trattate (T) nelle sale parto.

SCROFA (T)	G63	G25	H113	H31	G32	G20	H108	L110	G30
SALA PARTO	SP7	SP7	SP7	SP8	SP8	SP8	SP8	SP8	SP8

Tabella 58. Disposizione delle scrofe controllo (C) nelle sale parto.

SCROFA (C)	G59	H172	D16	F18	F126	F68	D18	G82	H122
SALA PARTO	SP9	SP8	SP9	SP9	SP9	SP9	SP9	SP9	SP10

Fase 2

Allo svezzamento (25 giorni), tutti i suinetti sono stati pesati e suddivisi in 4 gruppi sperimentali (Figura 27):

- 1. Ctr-Ctr:** suinetti nati dalle madri appartenenti al gruppo controllo (C) e alimentati con una dieta base;
- 2. Ctr-T:** animali nati da scrofe appartenenti al gruppo controllo (C), ma alimentati con una dieta addizionata con l'estratto di polpe di oliva arricchito con polifenoli (T);
- 3. T-Ctr:** suinetti nati da madri che nella fase 1 avevano ricevuto la dieta arricchita dal prodotto oggetto della prova (T), alimentati con una dieta base;

4. **T-T**: suinetti nati da scrofe appartenenti al gruppo trattato con estratto di polpe di oliva arricchito con polifenoli (T), che hanno ricevuto la dieta basale addizionata con il prodotto ricco di polifenoli.

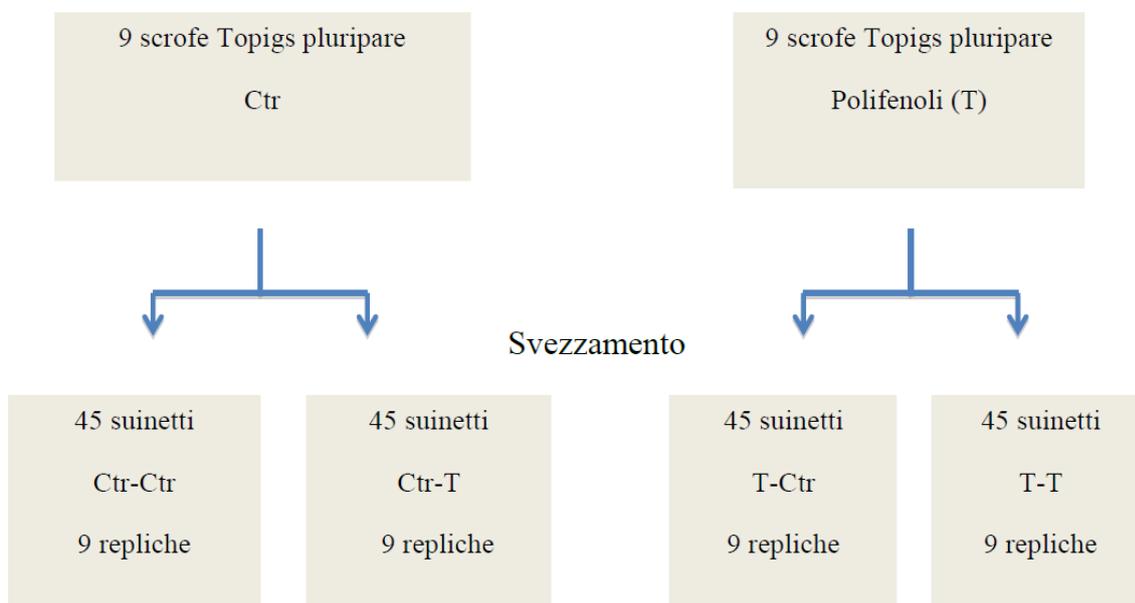


Figura 27. Schema sperimentale utilizzato nella fase 2.

Complessivamente sono stati utilizzati 180 suinetti; il peso medio degli animali nati da madri controllo era di $6,6 \pm 1,5$ kg, mentre il peso dei suinetti nati da madri trattate era di $6,7 \pm 1,8$ kg. Allo svezzamento, tutti gli animali sono stati trasferiti in 4 sale post-svezzamento (A, B, C e D), secondo lo schema riportato in Figura 28.

Le sale A e B contenevano 8 gabbie ciascuna di dimensioni pari a $1,55 \times 1,38$ m ($2,14$ m²), le sale C e D contenevano invece 10 gabbie ciascuna di dimensioni pari a $1,75 \times 0,95$ m ($1,66$ m²). In ogni gabbia sono stati alloggiati 5 suinetti e ciascuna rappresentava l'unità sperimentale (replica), erano previste 9 repliche per gruppo sperimentale.

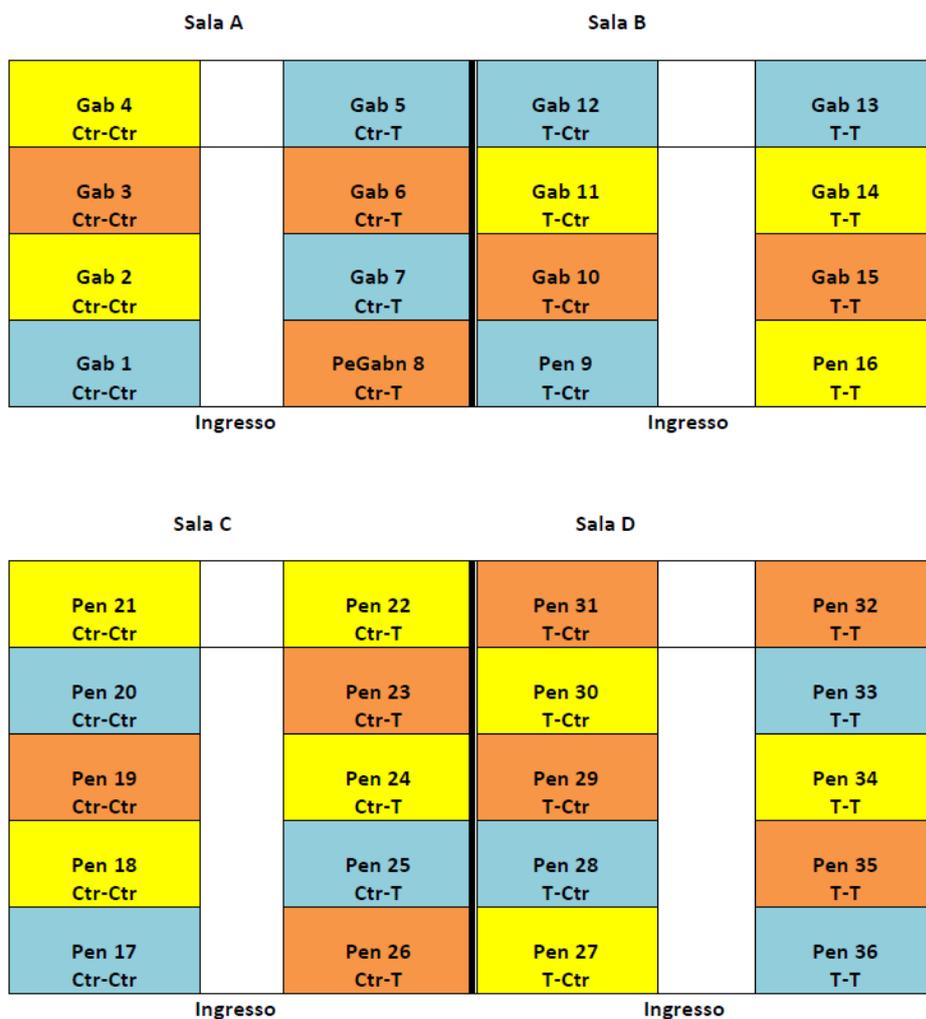


Figura 28. Distribuzione dei suinetti nelle sale A, B, C e D

La fase 2 ha avuto durata di 6 settimane complessive; durante i primi 14 giorni gli animali hanno ricevuto una dieta Prestarter, mentre nella seconda fase i suinetti hanno ricevuto una dieta Starter somministrata *ad libitum*. La Tabella 59 e la Tabella 60 riportano rispettivamente le diete utilizzate in questa fase e le analisi chimiche delle stesse.

Tabella 59. Composizione delle diete somministrate ai suinetti nel corso della prova.

Ingredienti (%SS)	Prestarter (0-14 d)	Starter (15-42 d)
<i>Mais</i>	20	30
<i>Orzo</i>	28	17
<i>Biscotto</i>	14	12,5
<i>Crusca</i>	6	6
<i>Nucleo 31% PG¹</i>	6	--
<i>Nucleo 25% PG²</i>	--	25
<i>Farina di pesce</i>	5	--
<i>Olio</i>	2	2
<i>Latte in polvere</i>	5	--
<i>Siero di latte</i>	5	2,5
<i>Palbio50³</i>	2,5	--
<i>Pasticceria</i>	1,5	--

¹ Nucleo 31%: Composizione: farina di soia, sbramato tostato, carbonato di calci, farina di soia tostato, fosfato monocalcico, cloruro di sodio, proteina di patate, glutine vitale di frumento, crusca di frumento, olio vegetale di soia, acidi grassi (vegetale), frumento decorticato trattato termicamente, farinaccio di riso. Costituenti analitici: umidità 5,80%, proteina grezza 31,00%, lipidi grezzi 1,90%, ceneri 34,70%, fibra grezza 1,90%, calcio 7,70%, fosforo 1,50%, sodio 2,40%, lisina 6,70%, metionina 2,10%.

² Nucleo 25%: Composizione: f.e. soia tostata e decorticata, fiocchi di orzo decorticati, fiocchi di frumento, farina di aringhe, tritello di frumento tenero, carbonato di calcio da rocce calciche macinate, polpe di barbabietola, solfato di calcio, cloruro di sodio, fosfato bicalcico biidrato precipitato. Componenti analitici: proteina grezza 25,00%, oli e grassi grezzi 3,00%, cellulosa grezza 5,50%, ceneri grezze 10,50%, lisina 3,05%, metionina 1,38%, sodio 0,56%. Additivi: Vitamine: vitamina A/ Acetato di retinile 250000 IU/kg, vitamina D3 33333 IU/kg. Oligoelementi: solfato di rame: rame 2500,0mg/kg, solfato ferroso: ferro 2000,0mg/kg, ossido di zinco: zinco 1750,0mg/kg, ossido di manganese: manganese 1300,0mg/kg, iodato di calcio: iodio 16,2mg/kg, selenito di sodio: selenio 5,7mg/kg. Additivi tecnologici: sepiolite 3178,4mg/kg, BHT 515,0mg/kg, etossichina 254,7mg/kg, propilgallate 4,7mg/kg. Additivi zootecnici: Endo-1,3(4) -beta-glucanase EC 3.2.1.6. 4a1604i: 25200 VU/kg; Endo-1,4-beta-xylanase EC 3.2.1.8. 4a1604i: 18480 VU/kg; 6-phytase EC 3.1.3.26 4a18: 16666 FYT/kg. Additivi per kg: Vitamine: (E672) vit A 55.200 U.I. (E671) vit D3 9.600 U.I. Oligoelementi: solfato ferroso monoidrato 2401mg, chelato ferroso di amminoacido idrato 154mg, solfato rameico penta idrato 3081mg, chelato di rame dell'analogo idrossilato della metionina 2.000mg, solfato di zinco 1465mg, ossido di zinco 240mg, solfato di manganese monoidrato 1084mg, ossido manganoso 250mg, selenito di sodio 2,64mg, iodato di calcio anidro 7,7mg.

³ Idrolizzato proteico multi-enzimatico della mucosa gastro-intestinale suina supportato su farina di estrazione di soia. Umidità 6.00% Proteine 50.00% Grassi 4.00% Fibra 3.00% Ceneri 18.00%

Tabella 60. Analisi chimiche delle diete somministrate ai suinetti nel corso della prova.

Analisi chimiche (%TQ)	Prestarter (0-14 d)	Starter (15-42 d)
<i>Sostanza secca</i>	89,0	89,0
<i>Proteina grezza</i>	19,5	17,9
<i>Lipidi grezzi</i>	5,2	5,5
<i>Fibra grezza</i>	3,2	3,5
<i>Calcio</i>	0,8	0,86
<i>Fosforo</i>	0,7	0,75
<i>Lisina</i>	1,4	1,2
<i>Metionina+Cistina</i>	0,84	0,72
<i>EM, kcal/kg</i>	3300	3200
<i>EN, kcal/kg</i>	2480	2400

Agli animali dei gruppi trattati (Ctr-T e T-T) la dieta basale è stata addizionata con il prodotto a base di estratto di polpa di olive, utilizzato nella fase 1 nella dieta delle scrofe, in quantità di 5,0kg/ton nella fase prestarter e 2,5kg/ton nella fase starter, in relazione al maggior consumo di alimento.

14.2.2. Controlli e prelievi

Fase 1

Nel corso della prova sono stati effettuati i seguenti controlli e prelievi:

14.2.2.1. Peso vivo

Le scrofe sono state pesate all'inizio della prova (intorno al 105° giorno di gestazione), in corrispondenza del loro trasferimento in sala parto e allo svezzamento dei suinetti (circa al 26° giorno di lattazione).

14.2.2.2. Spessore del lardo dorsale

Lo spessore del lardo dorsale delle scrofe è stato valutato mediante ecografia in P2 corrispondente cioè alla posizione distante 6,5cm dalla linea della colonna vertebrale, all'altezza dell'ultima vertebra toracica.

14.2.2.3. Numerosità delle nidiate

Alla nascita dei suinetti si è provveduto alla raccolta di dati relativi a: nati vivi, nati morti, tasso di mortalità.

14.2.2.4. Peso delle nidiate

I suinetti sono stati pesati al parto e allo svezzamento (25 giorno).

14.2.2.5. Consumo di alimento

La valutazione del consumo alimentare delle scrofe è stato rilevato per ciascun gruppo nella fase di gestazione e durante la lattazione.

14.2.2.6. Prelievi di colostro

Dopo il parto si è provveduto a prelevare manualmente da tutte le scrofe dei campioni di colostro; talvolta è stato necessario stimolare l'eiezione di colostro tramite somministrazione intramuscolare di ossitocina. Tutti i campioni di colostro sono stati immediatamente congelati a -20 °C fino al momento delle analisi.

Determinazione dei polifenoli totali nel colostro

Il colostro è stato trasportato presso il laboratorio di Analisi Alimenti del Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare e conservato a -20 °C fino allo svolgimento delle analisi.

La determinazione del contenuto di polifenoli è stata eseguita in accordo con il protocollo descritto da Attard (2013), basato sul metodo di Folin-Ciocalteu e precedentemente applicata nella II prova sperimentale del presente elaborato. Il metodo ha previsto delle leggere modifiche, considerando la diversa matrice da analizzare; di seguito vengono riportate le principali modifiche.

L'estrazione dei polifenoli dal colostro è stata effettuata secondo il metodo descritto da Sreeramule e Raghunath (2011). Il campione di colostro è stato scongelato in bagnetto termostato a 37 °C, dunque sono stati prelevati 5ml di campione e miscelati in 20ml di metanolo acidificato con 0.1% HCl. Tale solvente consente l'estrazione dei polifenoli dalla matrice latte, favorendo nel contempo la precipitazione delle proteine, poi eliminate per evitare contaminazioni durante le successive fasi. Al fine di massimizzare l'estrazione dei polifenoli dai campioni in esame, le provette sono state posizionate in un agitatore orizzontale e miscelate per 4 ore a temperatura ambiente.

La fase successiva prevedeva la centrifugazione dei campioni a 3500 giri per 30 minuti ad una temperatura di 4 °C al fine di separare la componente lipidica e proteica sottostante, di colore lattiginoso, di consistenza gelatinosa e priva di composti fenolici, dal surnatante contenente i polifenoli. Il surnatante è stato successivamente filtrato con imbuti e dischi di carta da filtro per rimuovere eventuali frazioni proteiche o lipidiche in grado di alterare il risultato finale.

Successivamente, era prevista l'aggiunta di 2,5ml del reagente Folin-Cicolteau (FC) e di 2ml di carbonato di sodio (10,589g in 100ml di acqua distillata) in 0,5ml di campione, per un volume totale di reazione pari a 5ml. Il campione veniva quindi incubato in ambiente buio per evitare la denaturazione del reattivo di Folin per 20 minuti a temperatura ambiente prima della lettura in triplicato allo spettrofotometro, ad una lunghezza d'onda pari a 730nm. Prima della lettura è stata effettuata una scansione UV in un range di 200-800nm al fine di stabilire il picco massimo di assorbimento della componente fenolica (730nm).

Il risultato finale, corrispondente alla media tra le diverse rilevazioni ed espresso in assorbanza, è stato espresso in equivalenti di acido gallico (Claudine *et al*; 2005). Attraverso la lettura dell'assorbanza degli standard, si è costruita una retta di calibrazione $y = ax + b$ e $R^2 \geq 0.99$ ottenuta inserendo nell'asse delle ordinate la concentrazione espressa in acido gallico ($\mu\text{g/ml}$) e sull'asse delle ascisse il valore di assorbanza degli standard. La risoluzione dell'equazione della retta ha permesso la quantificazione del contenuto in polifenoli totali del campione (espressa in acido gallico eq.), poi trasformato in valore di concentrazione applicando l'equazione della retta calcolata a partire dalla curva standard.

Per la preparazione della curva standard, sono stati pesati 0.240g di acido gallico al quale sono stati aggiunti 250ml di acqua distillata al fine di ottenere una soluzione madre di concentrazione pari a $960\mu\text{g/ml}$. A partire da tale soluzione, sono state allestite le diluzioni seriali 1:2 per ottenere le seguenti concentrazioni di acido gallico: 480, 240, 120, 60, 30 e $0\mu\text{g/ml}$. La lettura degli standard così ottenuti prevedeva lo stesso protocollo sopra riportato per quanto riguarda i campioni.

Determinazione della capacità antiossidante nel colostro

In aggiunta alla quantificazione dei polifenoli presenti nei campioni di colostro, è stata effettuata la determinazione della capacità antiossidante utilizzando la metodologia basata sul saggio di decolorazione ABTS (ABTS: Radical Cation Decolorization Assay).

Tale saggio è applicabile a molti antiossidanti lipofili e idrofili, inclusi i flavonoidi e i carotenoidi (Thaipong *et al.*, 2006). La metodologia sfrutta la reazione tra i due reagenti ABTS e potassio persolfato e la liberazione a seguito della stessa di radicali $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Questi ultimi vengono ridotti in presenza di antiossidanti donatori di idrogeno (come ad esempio i composti fenolici). Dalla prima reazione si ottiene una soluzione blu-verde, la quale diminuisce di intensità in base alla capacità antiossidante della matrice. La misura utilizzata per la determinazione della capacità antiossidante è espressa in Trolox equivalenti.

Fase 1: preparazione dei reagenti

- 7mM ABTS. Per la preparazione della soluzione sono stati pesati 192mg di ABTS. La polvere è stata quindi trasferita all'interno di un matraccio con volume di 50ml e portata

a volume aggiungendo acqua distillata. La soluzione è stata quindi omogenizzata e successivamente trasferita in un matraccio ambrato al fine di mantenere la soluzione in condizioni di luce scarsa;

- 140mM Potassio Persolforato (K₂S₂O₈). Sono stati pesati 378.4mg di K₂S₂O₈, trasferiti in un matraccio da 10ml e portati a volume aggiungendo acqua distillata. La soluzione è stata quindi omogenizzata e trasferita in un matraccio ambrato;
- ABTS +-radicalica. La soluzione è stata preparata facendo reagire di 5ml di ABTS con 88µl di K₂S₂O₈;
- Soluzione lavoro: A 1µl di soluzione ABTS +-radicalica sono stati aggiunti 50µl di etanolo per ottenere un valore di assorbanza tra 0.700±0.020 raggiunto alla lunghezza d'onda di 734 nm. La soluzione è stata preparata al momento poco prima dell'utilizzo.
- Soluzione madre di Trolox (soluzione 2mM). 0.005g di trolox sono stati posti in etanolo (10ml).

Fase 2: determinazione della capacità antiossidante dei campioni

1. 20µl di campione / standard (in triplicato) sono stati prelevati e fatti reagire con 2ml di soluzione lavoro;
2. In seguito a 6 minuti di incubazione al buio, la miscela di reazione è stata effettuata la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 734 nm mediante spettrofotometro (contro aria);
3. Calcolo della capacità antiossidante: attraverso la lettura dell'assorbanza degli standard, si è costruita una retta di calibrazione $y = ax + b$ e $R^2 \geq 0.95$ ottenuta inserendo nell'asse delle ordinate la concentrazione espressa in Trolox (µM) e sull'asse delle ascisse il valore di assorbanza degli standard;
4. La risoluzione dell'equazione della retta ha permesso la quantificazione della capacità antiossidante del campione (espressa in Trolox eq.).

Fase 2

Nel corso della prova sono stati effettuati i seguenti rilievi:

14.2.2.7. Peso vivo

I suinetti sono stati pesati allo svezzamento (25d), a 14 e 42 giorni post-svezzamento.

14.2.2.8. Consumo di alimento

La valutazione del consumo alimentare è stata effettuata considerando le singole unità sperimentali (repliche). Giornalmente venivano registrate le quantità di mangime aggiunte alle mangiatoie e, alle cadenze previste per la registrazione del peso, veniva calcolato il residuo.

14.2.2.9. Incremento ponderale medio giornaliero

Dalla rilevazione dei pesi ai diversi controlli è stato quindi calcolato l'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG) ai diversi periodi. La determinazione dell'IPMG prevedeva la seguente formula:

$$(\text{peso T1}-\text{peso T0})/\text{n}^\circ \text{ di giorni}$$

14.2.2.10. Indice di conversione alimentare

Dai dati relativi all'assunzione media giornaliera e all'incremento ponderale medio giornaliero è stato possibile calcolare l'indice di conversione alimentare (ICA), che costituisce il rapporto tra la crescita dei soggetti e la quantità di alimento consumato. Tale parametro rappresenta un ottimo indicatore dell'efficienza produttiva degli animali e più in generale dell'allevamento.

14.3. Analisi statistica

Fase 1

I dati raccolti sono stati analizzati mediante software SAS (The SAS system v. 9.3). In particolare, i dati raccolti in campo inerenti ai parametri produttivi di scrofe e nidiare sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA GLM) e a una procedura PROC FREQ, includendo nel modello gli effetti del trattamento. Per quanto riguarda invece le analisi statistiche relative alla quantità di polifenoli e alla capacità antiossidante nel latte sono stati sottoposti a un'analisi con ANOVA GLM.

Fase 2

Le performance di crescita sono state analizzate mediante analisi della varianza con supporto del programma statistico SAS versione 9.3, includendo nel modello gli effetti del trattamento, il periodo e l'interazione trattamento x tempo. Il box è stato considerato come unità sperimentale. La significatività determinata per $P < 0,05$ e $P < 0,01$.

14.4. Risultati

Fase 1

14.4.1. Performance produttive

In Tabella 61 sono riportati i dati produttivi degli animali. Come è possibile osservare, non sono state registrate alcune differenze statisticamente significative ($P>0.05$); tuttavia i parametri relativi alle scrofe trattate con polifenoli (T) mostrano dei risultati leggermente superiori se confrontati con gli animali appartenenti al gruppo controllo.

Tabella 61. Parametri produttivi delle scrofe e nidiate.

Parametro	Gruppo		SEM	P-value
	C	T		
<i>Peso scrofe al parto (kg)</i>	299.78	337.00	8.81	0.08
<i>Peso scrofe allo svezzamento (kg)</i>	278.60	286.52	10.58	0.45
<i>Consumo alimento (kg/d)</i>				
Gestazione	2.53	2.81	0.35	0.78
Lattazione	4.89	5.21	0.42	0.57
<i>Grasso dorsale al parto (mm)</i>	21.33	23.89	1.66	0.29
<i>Grasso dorsale allo svezzamento (mm)</i>	16.57	17.11	1.30	0.79
<i>Suinetti Nati totali (n)</i>	13.44	12.89	0.98	0.69
<i>Nati vivi (n)</i>	11.00	11.56	1.02	0.71
<i>Nati morti (n)</i>	2.44	1.33	0.95	0.42
<i>Svezzati (n)</i>	9,88	10,22	0.87	0.29
<i>Peso suinetti alla nascita (kg)</i>	1.53	1.58	0.04	0.44
<i>Peso suinetti allo svezzamento (kg)</i>	6.56	6.68	0.43	0.77
<i>Peso nidiata alla nascita (kg)</i>	16.35	17.70	1.70	0.58
<i>Peso nidiata svezzamento (kg)</i>	64.9	67.06	5.48	0.43
<i>Sopravvivenza suinetti (%)</i>				
Neonatale (0-3 d)	81.82	89.66	---	0.08
Allo svezzamento	91.31	96.97	---	0.14

Analizzando più nel dettaglio la condizione corporea delle scrofe, nel Grafico 19 è riportata la perdita di peso degli animali durante la lattazione, calcolata come differenza tra il peso prima del parto e al termine dello svezzamento. Sebbene in assenza di significatività statistica ($P>0.05$), la perdita di peso delle scrofe che hanno ricevuto l'estratto di polpe di oliva arricchito con polifenoli è stata inferiore rispetto agli animali controllo.

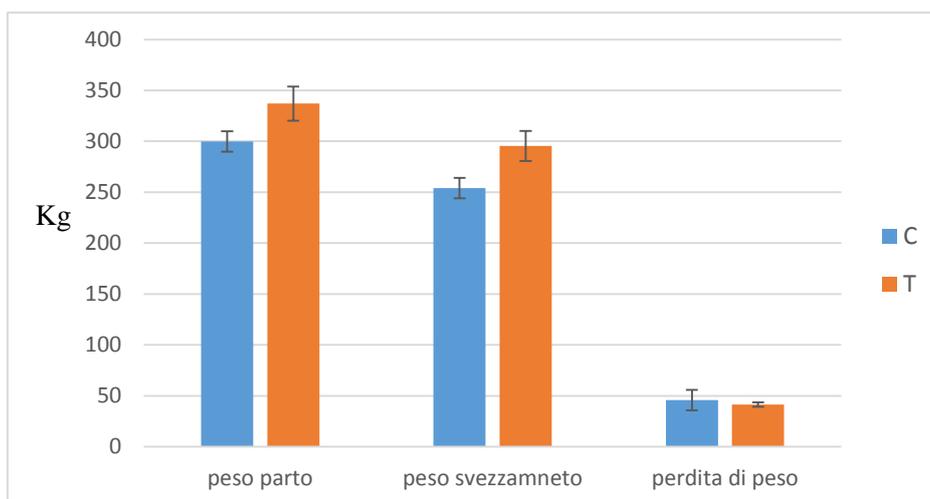


Grafico 19. Peso delle scrofe al parto e allo svezzamento e perdita di peso nel periodo di lattazione (C=controllo; T=trattate).

Il Grafico 20 riporta invece i risultati dello spessore del lardo dorsale, espresso in mm, rilevato con i controlli ecografici prima del parto, allo svezzamento dei suinetti e come differenza. Nonostante l'assenza di significatività ($P > 0.05$) le scrofe trattate presentavano uno spessore maggiore in corrispondenza di entrambe le valutazioni, la perdita di spessore di questi animali durante la lattazione è stata più elevata del gruppo controllo.

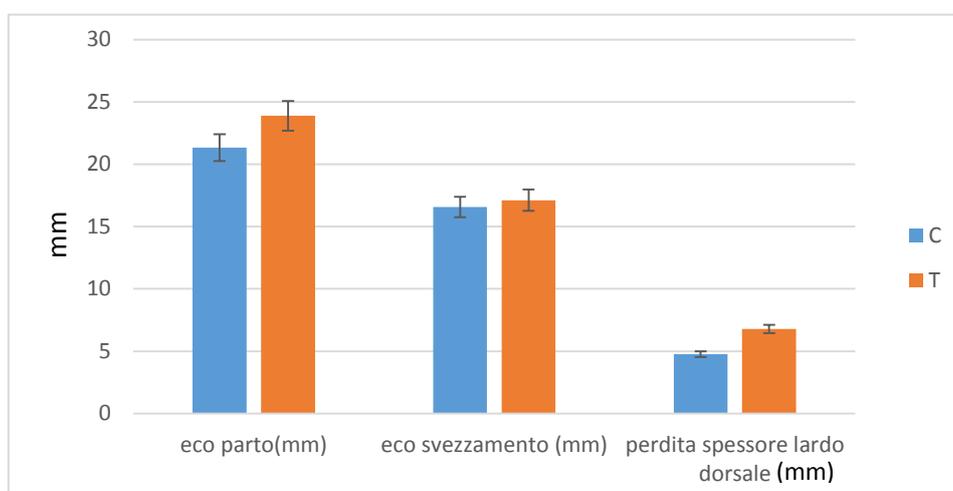


Grafico 20. Perdita di spessore del lardo dorsale nelle scrofe di entrambi i gruppi della sperimentazione (C=controllo, T=trattato).

14.4.2. Quantificazione del contenuto di polifenoli totali e valutazione della capacità antiossidante del colostro

La Tabella 62 riporta i valori di assorbanza e le relative concentrazioni, espresse in ug/ml, degli standard precedentemente preparati, utilizzati per il calcolo della curva standard (Grafico 21).

Tabella 62. Valori di assorbanza e relative concentrazioni della curva standard.

Concentrazione (ug/ml)	Assorbanza
0	0,0154
30	0,3274
60	0,6171
120	1,1625
240	2,1712
480	2,6968

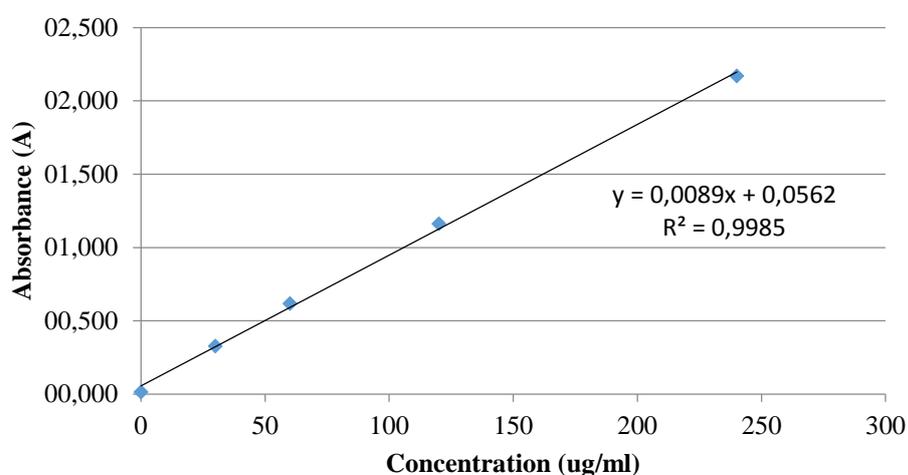


Grafico 21. Curva standard per la determinazione del contenuto di polifenoli

I risultati della quantificazione del contenuto di polifenoli nel colostro del gruppo controllo e trattato sono riportati in Tabella 63.

Tabella 63. Contenuto di polifenoli nel latte delle scrofe dei due gruppi espressa come mg di acido gallico/100g di colostro.

Gruppo	Valore (mg GAE/100g)
Controllo	10,051 ± 3,698
Trattato	18,55 ± 8,740

Sebbene il maggior contenuto di polifenoli nel colostro di scrofe trattate rispetto al gruppo di controllo non sia statisticamente significativo (12,372 vs 17,385, $P > 0.05$), il risultato ottenuto suggerisce una possibile relazione tra l'integrazione dietetica e la presenza di polifenoli nel latte.

Come riportato in precedenza, parallelamente alla quantificazione del contenuto di polifenoli nei campioni di colostro, è stata valutata l'attività antiossidante.

La Tabella 64 sono presenti i valori dell'attività antiossidante delle diluizioni utilizzate per il calcolo della curva standard (Grafico 22).

Tabella 64. Diluizioni per la realizzazione della curva di calibrazione.

Trolox (μM)	Trolox 2 mM (ml)	Etanolo (ml)
0	0	5
100	0.25	4.75
500	1.25	3.75
1000	2.5	2.5
1500	3.75	

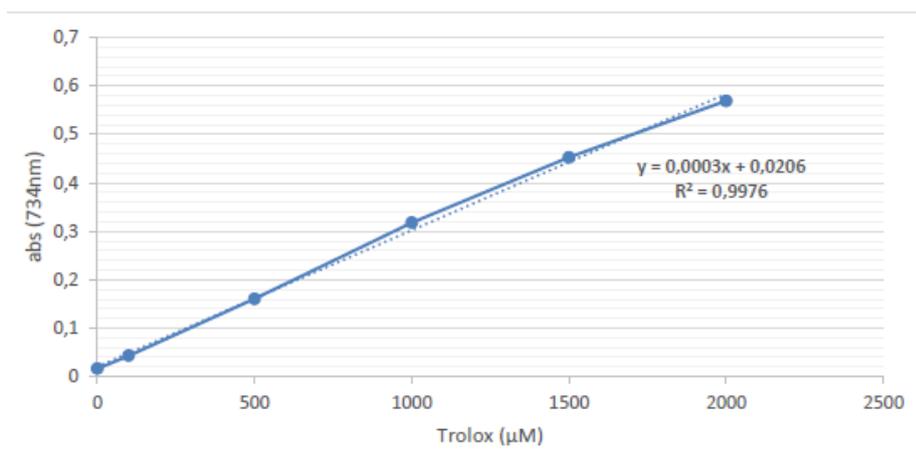


Grafico 22. Curva standard per la valutazione dell'attività antiossidante Trolox (μM).

La Tabella 65 riporta i risultati dell'attività antiossidante dei campioni di colostro del gruppo controllo e trattato; è stata osservata una differenza significativa ($P=0.05$) tra il gruppo trattato e il gruppo controllo.

Tabella 65. Medie e DS relative alla capacità antiossidante del colostro delle scrofe.

	MEDIA (mg trolox/100g)
Controllo	9,636 \pm 2,729
Trattato	11,780 \pm 3,085

Fase 2

14.4.3. Peso vivo

I risultati relativi al peso vivo dei suinetti sono riportati in Grafico 23. Come mostra il grafico, al termine della prova, gli animali appartenenti al gruppo 3, ovvero i suinetti che non hanno ricevuto la dieta integrata con estratto d'oliva, ma provenienti da madri trattate, hanno evidenziato un peso superiore con una differenza statisticamente significativa rispetto ai

soggetti trattati, ma nati da madri controllo (gruppo 2; 25,07kg vs 23,34kg, $P=0.03$). Al contrario, le analisi del peso vivo al giorno 0 e al giorno 14 dei quattro gruppi sperimentali non presentavano differenze statistiche ($P>0.05$).

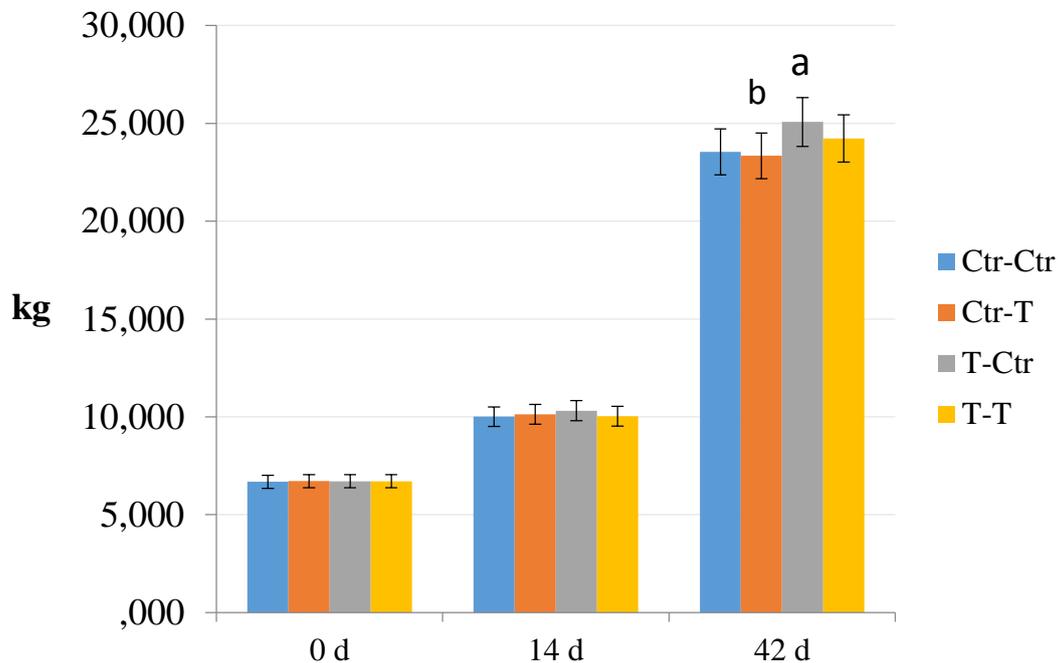


Grafico 23. Effetti della somministrazione dell'estratto di polpa di oliva sul peso dei suinetti (a, b $P \leq 0.05$).

14.4.4. Consumo di alimento

I risultati relativi al consumo di alimento nei diversi gruppi non hanno mostrato differenze significative ($P>0.05$) durante tutto il periodo di osservazione (0-42 giorni post-svezzamento). In dettaglio, il gruppo 2 (Ctr-T) ha riportato il maggior tasso di assunzione 167,06kg, mentre il valore più basso è stato registrato nel gruppo 3 (T-Ctr) con 153,07kg di alimento.

14.4.5. Incremento Ponderale Medio Giornaliero

Il Grafico 24 mostra i risultati dell'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG) dei diversi gruppi nel periodo 0-14 giorni, 14-42 giorni e come media complessiva dell'intera durata della prova (0-42 giorni). Nella seconda parte della prova (14-42 giorni) è stata trovata una differenza statisticamente significativa tra il gruppo 3 (T-Ctr) e il gruppo 2 (Ctr-T; 527,11g/d vs 472,05g/d; $P=0.03$); inoltre, nello stesso periodo, si osserva una tendenza alla significatività tra il gruppo T-Ctr e il gruppo 1 (Ctr-Ctr; $P=0.08$).

Considerando invece l'intero periodo di osservazione, ottenuto come valore medio dei due precedenti periodi (0-42 giorni post-svezzamento), i risultati sono speculari; l'IPMG tra il gruppo 3 è risultato statisticamente differente rispetto al gruppo 2 (392,38g/d vs 357,90g/d; $P=0.05$), mentre si riscontra la tendenza alla significatività tra T-Ctr e Ctr-Ctr ($P=0.07$).

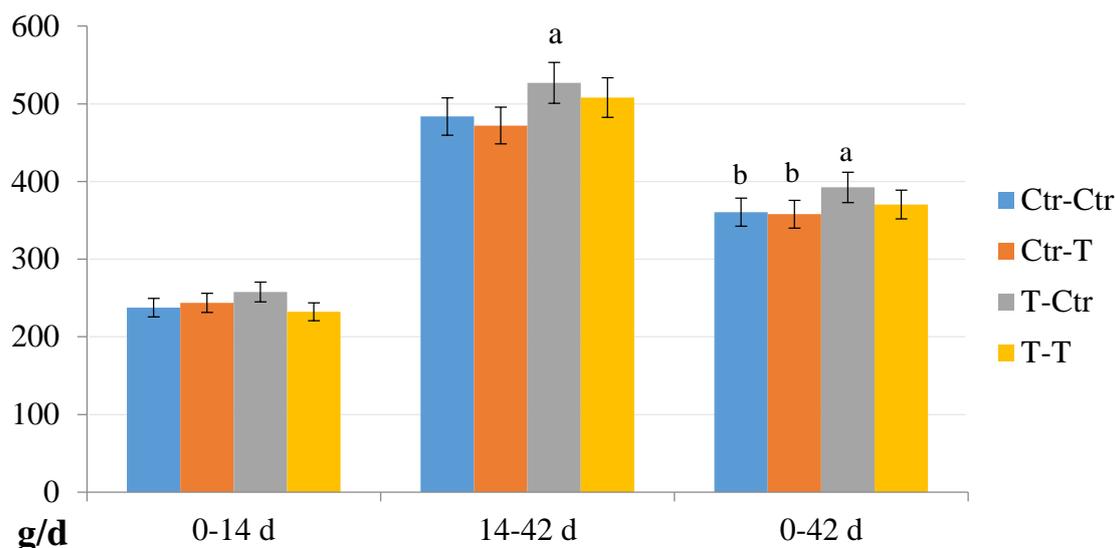


Grafico 24. Incremento ponderale medio giornaliero dei suinetti (a, b $P \leq 0.05$).

14.4.6. Indice di Conversione Alimentare

L'indice di conversione alimentare (ICA) misura l'attitudine di un suino a trasformare la propria dieta in aumento di peso corporeo; tale valore può essere definito come la quantità di mangime, espressa in kg, necessaria per depositare 1 kg di peso vivo. Minore è l'indice di conversione alimentare più efficiente risulta la trasformazione del mangime in carne.

Il Grafico 25 riporta i risultati dell'ICA dei 4 gruppi sperimentali; in dettaglio, i suini provenienti da madri trattate, ma che non hanno ricevuto la dieta integrata con polifenoli (T-Ctr, gruppo 3) hanno riportato un ICA più basso rispetto al gruppo T-T (1.69 vs 1.96; $P \leq 0.01$), al gruppo 2 (1.69 vs 2.04; $P \leq 0.01$) e anche rispetto ai suinetti Ctr-Ctr (1.69 vs 1.89; $P \leq 0.01$).

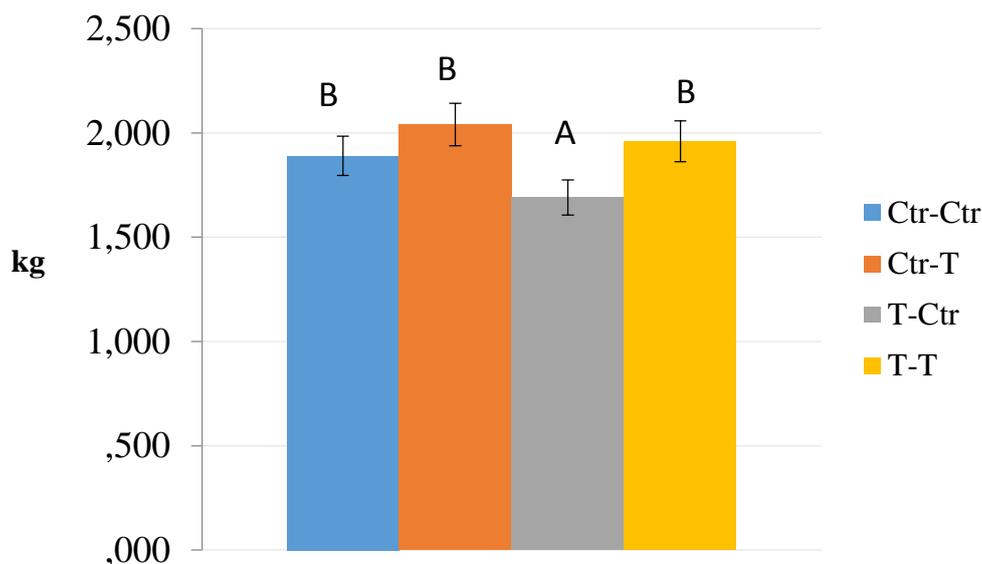


Grafico 25. Indice di conversione alimentare calcolato per box (A, B $P \leq 0.01$).

14.4.7. Resa Alimentare

Oltre ai parametri riportati in precedenza, è stata valutata la resa o efficienza alimentare. Tale indice rappresenta il reciproco dell'ICA, ossia l'incremento di peso di un suino dopo che ha consumato 1 kg di mangime. Più grande è il valore percentuale della resa e più efficiente risulta essere la trasformazione del mangime in carne.

I risultati della resa alimentare confermano quanto riportato per l'indice di conversione alimentare; il gruppo 3 (T-Ctr) ha mostrato un'efficienza maggiore rispetto agli altri gruppi sull'intero periodo di prova 0-42 d. Gruppo T-Ctr vs T-T (0.60kg vs 0.51kg; $P \leq 0.01$), gruppo T-Ctr vs Ctr-T (0.60kg vs 0.50kg; $P \leq 0.01$) e infine gruppo T-Ctr vs Ctr-Ctr (0.60kg vs 0.53kg; $P \leq 0.01$) (Grafico 26).

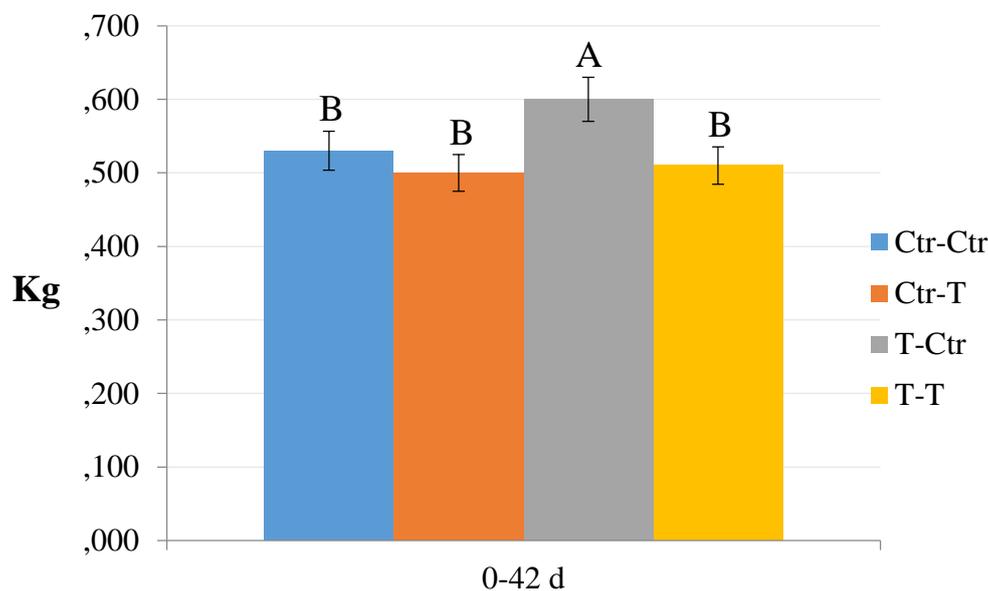


Grafico 26. Efficienza alimentare calcolata per box (0-42 giorni) (A, B $P \leq 0.01$).

14.4.8. Resa alla trasformazione

Un altro parametro che è stato preso in considerazione è stata la resa alla trasformazione, ovvero il guadagno che si trae dalla vendita della carcassa. Il Grafico 27 riporta la resa alla trasformazione dei 4 gruppi sperimentali suddivisa nei due periodi (0-14 e 14-42 giorni).

In particolare, non sono state osservate differenze statisticamente significative nel primo periodo (0-14 giorni), mentre è possibile osservare una significatività nel periodo 14-42 d tra il gruppo 3 (T-Ctr) e il gruppo Ctr-T (14,76kg vs 13,21kg; $P=0.01$). E' stata rilevata inoltre una differenza significativa tra gruppo T-Ctr e il gruppo 1 (Ctr-Ctr) (14,76kg vs 13,54kg; $P=0.04$).

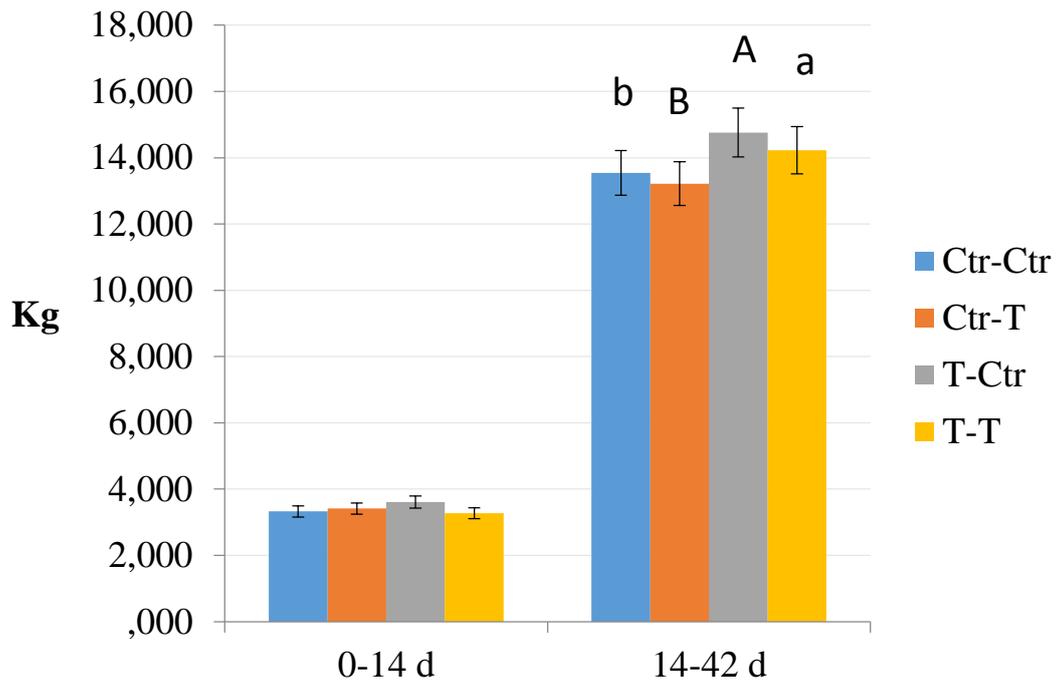


Grafico 27. Resa alla trasformazione dei gruppi sperimentali suddivisa nei due periodi (a, b $P \leq 0.05$; A, B $P \leq 0.01$).

14.5. Discussione

L'impiego di estratti vegetali naturali nell'allevamento del suino è ancora oggi oggetto di studio. Negli ultimi anni i ricercatori hanno posto l'attenzione sullo studio di estratti vegetali in grado di modulare l'ambiente intestinale con l'obiettivo di trovare soluzioni alternative all'uso di antibiotici promotori di crescita.

Le modalità di azione dei fitobiotici non sono tuttora chiare, ma è possibile che grazie ai loro effetti antiossidanti possano preservare le qualità organolettiche e l'appetibilità della dieta, incrementando di conseguenza l'assunzione di alimento. Vanno inoltre ricordati i possibili miglioramenti della funzionalità intestinale, grazie a effetti stimolanti sulle secrezioni digestive, effetti antimicrobici con ripercussioni positive sulla salute dell'intestino in particolare durante l'accrescimento o in situazioni di stress.

Oltre ai possibili benefici sulla salute dell'animale, l'impiego di diete arricchite con polifenoli offrirebbe la possibilità di arricchire i prodotti derivati con sostanze antiossidanti modulando così le caratteristiche qualitative delle carni senza alterarne i parametri di conservazione.

Durante l'ultima fase di gestazione e durante la lattazione, a fronte di un'insufficiente assunzione alimentare, le scrofe necessitano di elevate quote energetiche per sostenere la crescita fetale prima e la produzione di latte dopo (Shen *et al.*, 2015) e tale situazione fisiologica potrebbe spiegare i risultati relativi alla perdita di condizione corporea riscontrata nel gruppo trattato. Inoltre, la maggiore perdita di spessore del lardo dorsale potrebbe giustificare un maggiore ricorso alle riserve corporee per sostenere una maggiore produzione di latte. Tale risultato è stato confermato in studi *in vivo* condotti su ruminanti, dove è stato registrato un aumento della produzione di latte a seguito della somministrazione di foglie di ulivo (Molina *et al.*, 2008) o di polpe d'oliva (Chiofalo *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda i dati sulle nidiate, non sono state osservate differenze significative ($P > 0.05$) fra i trattamenti; tuttavia è possibile ipotizzare che la discrepanza tra i due gruppi sperimentali riguardo la percentuale di nati vivi sul totale (89,7% e 81,9% per il gruppo trattato e controllo, rispettivamente) sia dovuta al maggior numero di nati totali delle scrofe di controllo, ma non sono da escludere possibili effetti positivi legati alla somministrazione dei polifenoli. Il miglior stato di salute dei suinetti provenienti da madri trattate potrebbe inoltre giustificare i migliori risultati relativi alla mortalità pre-svezzamento, che nel caso del gruppo trattato con polpe di oliva risulta contenuta entro il 4%, valore decisamente accettabile nelle condizioni di allevamento italiane. Nonostante il peso delle nidiate dei due gruppi alla nascita non presentava valori statisticamente significativi, il peso dei suinetti allo svezzamento è risultato superiore nel caso di soggetti nati dalle scrofe trattate. La differenza tra il peso dei due gruppi di suinetti allo svezzamento appare più evidente se si confronta il peso delle nidiate allo svezzamento (64.9kg per il Controllo *vs* 67.06kg per il gruppo trattato). Sebbene anche questo dato non sia risultato

statisticamente significativo, l'incremento di peso maggiore dalle nidiatte provenienti da madri trattate con polpa di oliva potrebbe essere legato al maggior consumo di latte, ma non si può escludere anche un miglioramento delle caratteristiche funzionali dello stesso. Tale risultato è in accordo con uno studio condotto da Kwon *et al.* (2005), dove gli autori hanno osservato un effetto sull'incremento ponderale medio dei suinetti sottoscrofa in seguito all'introduzione di una miscela di erbe (*Artemisia*, *Acanthopanax* e aglio) nella dieta delle scrofe. Inoltre, un'altra ricerca *in vivo* ha riportato un maggior peso allo svezzamento in suinetti nati da scrofe a cui era stata somministrata una combinazione di estratti naturali (*Yucca shidigera* e *Quillaja saponaria*) prima del parto e durante la lattazione (6,878kg vs 6,584kg, T vs C) (Ilsley *et al.*, 2003).

In una ricerca di Berchieri-Ronchi *et al.* (2011) è stato dimostrato un aumento dello stress ossidativo sistemico in scrofe durante la tarda gestazione e l'allattamento come conseguenza della lipomobilizzazione; gli autori hanno osservato una riduzione dell'attività antiossidante a partire dal 90-110 giorno di gravidanza nelle scrofe, probabilmente in concomitanza con il rapido sviluppo fetale durante l'ultimo trimestre di gestazione (Shen *et al.*, 2015). Inoltre, è importante considerare che lo stress ossidativo ha un impatto diretto non solo sul benessere e sulle performance delle madri, ma anche sulla salute dei suinetti (Agarwal *et al.*, 2005; Jabbour *et al.*, 2009).

Appare dunque giustificata la somministrazione di prodotti con un elevato apporto di polifenoli a scrofe gestanti, anche se i loro effetti potrebbero risultare più evidenti solo con somministrazioni più prolungate; anche possibile che, in mancanza di dati sperimentali certi sulla biodisponibilità, si debbano somministrare dosi più elevate per favorire una maggiore concentrazione nell'organismo dei principi attivi contenuti nelle sostanze naturali.

Per quanto riguarda le analisi effettuate sul latte, è necessario sottolineare che la metodica applicata per la quantificazione dei polifenoli accumulati nel tessuto epatico era di tipo quantitativo, in quanto il risultato ottenuto rappresentava la concentrazione totale delle frazioni fenoliche presenti; inoltre, il metodo presentava una sensibilità alle sostanze facilmente ossidabili come l'acido ascorbico, l'anidride solforosa e gli zuccheri riducenti eventualmente presenti nei campioni considerati.

In letteratura non sono presenti studi che valutano il contenuto di polifenoli nella specie suina; in tal senso, non è stato possibile confrontare i risultati ottenuti con altri autori. L'unico studio che ha quantificato i polifenoli nella matrice lattea è stato condotto da Sreeramulu *et al.* (2011) nelle bufale in lattazione e la concentrazione di tali composti è risultato molto inferiore alla specie suina (3.0 ± 0.4 mg GAE eq/100g), oggetto della prova, probabilmente in relazione al differente volume di latte prodotto. Tuttavia, l'aumento della concentrazione dei polifenoli nel latte del gruppo trattato con polpe di oliva arricchite con polifenoli trova conferma in uno studio condotto da José *et al.* (2010). Gli autori hanno dimostrato che l'integrazione con il 10% e il

20% di foglie di rosmarino distillate per 224 giorni nella dieta di pecore dal latte permetteva di aumentare in modo statisticamente significativo ($P < 0.05$) il contenuto di molti polifenoli del latte, in particolare flavonoidi, acido gallico, naringina, esperidina e carnosolo. Gli stessi risultati sono stati confermati in un'altra prova condotta da Terramoccia *et al.* (2013) nella specie bufalina, dove animali che ricevevano una dieta addizionata con 15,5% di polpa di oliva essiccata mostravano una maggior concentrazione media di idrossitirosolo nel latte rispetto al gruppo controllo, in questo caso è stata riscontrata una variabilità individuale molto elevata (8,9 - 56,2mg/L).

Considerando i risultati da un punto di vista più ampio, è possibile che la mancanza di significatività tra i due gruppi di scrofe potrebbe essere attribuita al ridotto numero di animali, alla durata del trattamento, alle caratteristiche del colostro/latte di scrofa, generalmente poco standardizzato relativamente alla sua composizione e in parte alle tempistiche di prelievo avvenute in base al momento del parto.

Un altro aspetto da considerare è rappresentato dalla biodisponibilità dei polifenoli; la maggior parte di questi composti naturali non viene assorbita come tale, ma idrolizzata da enzimi intestinali o dalla microflora dell'intestino e successivamente modificata a livello epatico attraverso processi di metilazione, solforazione o glicuronidazione (D'Archivio, 2010). Per tali ragioni, la quota di polifenoli che entra nel circolo ematico e raggiunge la mammella presenta forme differenti da quelle delle sostanze di origine; in tal senso, sono necessari ulteriori approfondimenti per comprendere quali siano i polifenoli meglio assorbiti, quali i metaboliti attivi e quali polifenoli possono portare alla formazione dei metaboliti attivi (D'Archivio, 2010).

Per quanto riguarda il possibile effetto dei polifenoli sulla qualità del latte, non sono presenti dati sulle scrofe in letteratura, ma la maggior parte degli studi condotti sui ruminanti non ha evidenziato alterazioni significative dovute all'integrazione nella dieta con estratti naturali contenenti polifenoli sui parametri del latte, quali tenore di grasso e proteine (Molina *et al.*, 2008; Chiofalo *et al.*, 2003).

È stato dimostrato che il colostro presenta una propria attività antiossidante in quanto deve fornire al neonato non solo tutte le componenti nutrizionali ed immunologiche necessarie, ma anche la protezione antiossidante nei confronti dello stress ossidativo. Oltre ai noti enzimi antiossidanti quali la glutazione perossidasi, la superossido dismutasi, le catalasi o altri antiossidanti a basso peso molecolare, anche le proteine quali lattoperossidasi (LPO), lattoferrina (LF) e ceruloplasmina (CP) possono esercitare proprietà antiossidanti nel colostro (Albera *et al.* 2008).

In accordo con quanto riportato in letteratura relativamente all'aumento dell'attività antiossidante negli animali trattati, Sreeramulu *et al.* (2011) ha dimostrato una correlazione positiva ($r=0.93$) tra il contenuto in polifenoli e l'attività antiossidante (valutata in Trolox

equivalenti) di alcuni alimenti quali il latte di bufala, il latte vaccino, l'olio di girasole, l'olio di palma e il miele; questi risultati evidenziano quindi l'importanza dei polifenoli nella determinazione della capacità antiossidante di un alimento.

L'obiettivo della seconda parte del presente lavoro è stato valutare gli effetti a lungo termine della somministrazione orale di un estratto di polpe di oliva con un alto contenuto di polifenoli sulle performance di crescita dei suini.

I risultati ottenuti fanno riflettere sull'importanza del latte materno come veicolo di alimenti funzionali; in tal senso, i dati più interessanti sono stati osservati negli animali nati da madri trattate con il prodotto ricco di polifenoli durante la gestazione e la lattazione.

In letteratura, molti autori hanno valutato l'effetto di polpe d'oliva nell'alimentazione degli animali da reddito, sia sulla salute e il benessere degli stessi, sia di conseguenza sui prodotti di origine animale (Rabayaa *et al.*, 2001; Molina-Alcaide and Yanez-Ruiz, 2008). I polifenoli presenti nel frutto dell'oliva potrebbero quindi modificare i processi di digestione e di assorbimento dei nutrienti a livello gastrointestinale e interagire inoltre sulla composizione del microbiota.

Uno studio effettuato da Dueñas *et al.* (2015) ha confermato sia *in vivo* sia *in vitro* che diete ricche di polifenoli sono in grado di modificare la popolazione microbica intestinale riducendo la quantità di potenziali patogeni, in particolare i Gram-negativi della famiglia *Bacteroides spp.*, e favorendo nel contempo la proliferazione di batteri considerati benefici come *Bifidobatteri* e *Lattobacilli*.

La modificazione del microbiota, ed in particolare l'aumento del numero di *Lactobacillus spp.*, potrebbe esser dovuta alla capacità di tali microrganismi di metabolizzare i composti fenolici e di trarre benefici dalla biodisponibilità di glucosio apportata (Duenas *et al.*, 2015).

Un altro studio ha dimostrato l'effetto dei polifenoli sulle popolazioni microbiche intestinali; Dal Bosco *et al.* (2007) ha riscontrato una funzione inibitoria di tali composti naturali nei confronti della crescita di batteri intestinali tra i quali *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*.

In aggiunta, Secondo Giavais *et al.* (2012), i polifenoli estratti dai sottoprodotti della lavorazione delle olive potrebbero stimolare la proliferazione di batteri produttori di acido lattico dando la possibilità di essere utilizzati nell'alimentazione animale al fine di orientare l'equilibrio microbico in modo favorevole per la salute intestinale. In letteratura sono tuttavia riportati dei lavori che hanno evidenziato un effetto negativo sulla flora batterica del colon con effetti "antibiotici non selettivi" in seguito alla somministrazione di un estratto di polifenoli del tè verde a polli da carne (Cao *et al.*, 2005). In tal senso, ulteriori approcci di investigazione proteomica e genomica risultano necessari per individuare geni, o eventualmente altri

microrganismi, coinvolti nella modulazione del microbiota da parte di questi composti (Dueñas *et al.*, 2015).

Altri autori hanno osservato effetti antibatterici da parte dei polifenoli estratti dalle acque di vegetazione derivanti dalla lavorazione delle olive, solo nei confronti di *Staphylococcus aureus* e a seguito dell'utilizzo di elevate concentrazioni di polifenoli (5mg/mL), mentre nessuna o scarsa attività è stata osservata nei confronti di *E. Coli* e *Streptococcus fecalis* (Leouifoudi *et al.*, 2015).

È inoltre possibile che l'integrazione con polifenoli nella dieta di animali allevati per la produzione della carne abbia effetti anche sul prodotto finale; questi composti di origine naturale, accumulandosi nei tessuti, possono prevenire l'ossidazione dei lipidi insaturi nella carne e contribuire quindi alla conservazione del valore dietetico-nutrizionale del prodotto.

Gli estratti dell'olivo contengono polifenoli come Oleuropeina, Idrossitirosolo e Tirosolo (Briante *et al.*, 2002) che sono efficaci antiossidanti in quanto agiscono come “spazzini” delle specie reattive all'ossigeno, bloccando le reazioni a cascata indotte dai ROS. Tali molecole sono anche efficaci nel prevenire o contenere lo stress ossidativo e di conseguenza migliorare lo stato di salute per le loro attività antinfiammatorie, antivirali e antibatteriche (Pereira *et al.*, 2006).

14.6. Conclusioni

L'impiego di estratti vegetali nell'alimentazione degli animali è una tematica di grande interesse da parte della Ricerca e dell'Industria con lo scopo di proporre soluzioni che possano contribuire a ridurre il consumo di antibiotici nella pratica zootecnica.

L'integrazione di polifenoli nelle diete degli animali ha dimostrato di migliorare la funzionalità intestinale, attribuita principalmente agli effetti stimolanti sulle secrezioni digestive, nonché agli effetti antimicrobici, con ripercussioni positive sulla salute dell'intestino. In tal senso, l'utilizzo di questi composti naturali risulta particolarmente interessante durante lo svezzamento, che rappresenta la fase più critica e delicata nell'allevamento del suino.

Dati la complessità dei fattori coinvolti nell'utilizzo dei composti fenolici in alimentazione animale, tra cui la biodisponibilità, il meccanismo d'azione, il dosaggio e la durata della somministrazione, ulteriori ricerche sono necessarie al fine di valutare con maggior accuratezza i pathways metabolici relativi al tasso di passaggio nel latte dei polifenoli, anche alla luce della forte variabilità individuale riscontrata nella presente prova *in vivo*.

I risultati ottenuti sulle performance dei suinetti fanno riflettere sull'importanza del latte materno come veicolo di sostanze funzionali nelle prime settimane di vita e soprattutto sulle successivi tassi di crescita e sulla salute intestinale degli animali.

15. IV prova sperimentale: Effetto dell'integrazione di un additivo probiotico nell'allevamento del pollo da carne

15.1. Introduzione

L'efficienza digestiva dei broiler è un parametro fondamentale per garantire il corretto metabolismo e le performance produttive di animali a rapida crescita; in tal senso, l'utilizzo di additivi probiotici nelle diete di questa specie rappresenta un'interessante alternativa all'impiego di antibiotici a scopo auxinico, peraltro banditi a partire dal 1/1/2006.

I probiotici sono microrganismi vivi, privi di patogenicità, in grado di influenzare positivamente l'ospite, migliorando l'equilibrio microbico intestinale; tali ceppi batterici sono responsabili della formazione di molecole a livello gastroenterico, come l'acido acetico e l'acido lattico, in grado di stabilizzare il pH dell'intestino creando un ambiente idoneo per la colonizzazione e la crescita di popolazioni microbiche benefiche a scapito di batteri antagonisti tossici (Denli *et al.*, 2003).

L'obiettivo della presente ricerca è stato valutare gli effetti della somministrazione di un probiotico costituito da due ceppi di lattobacilli sulle performance di crescita e sulle principali caratteristiche delle carni avicole.

Il prodotto oggetto della tesi è stato un additivo probiotico costituito da una combinazione di *Lactobacillus farmaciminis* e *L. rhamnosus* trattati termicamente e prodotti a partire da un substrato di latte fermentato.

15.2. Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta da Novembre a Dicembre 2016 presso il Centro Zootecnico Didattico Sperimentale (CZDS) del Polo Veterinario di Lodi, previa richiesta e ottenimento del parere positivo del Comitato Etico di Ateneo.

15.2.1. Animali e stabulazione

Per l'espletamento della prova sono stati utilizzati 960 pulcini ROSS 308 di 1 giorno di età, tutti di sesso maschile, provenienti dall'incubatoio dell'Allevamento "Pollo Monteverde", Ospitaletto (Brescia). All'arrivo presso il CZDS i soggetti prevedevano una copertura vaccinale nei confronti delle principali patologie avicole (malattia di Marek, Newcastle e bronchite infettiva).

All'arrivo al Centro Zootecnico, definito come giorno 0 della prova sperimentale, è stata effettuata una valutazione dello stato generale di salute degli animali, al fine di escludere dalla

prova i soggetti che si presentavano sottopeso, ipovitali o con evidenti problemi articolari, dunque tutti i pulcini sono stati pesati e assegnati in maniera random ad uno dei quattro gruppi sperimentali.

I pulcini, del peso vivo medio di 45g, sono stati alloggiati in 4 stanze costituite da 12 recinti (1.25m x 2.00m) contenenti 20 soggetti ciascuno.

I recinti erano dotati di lettiera in truciolo di legno bianco, di abbeveratoi per la somministrazione dell'acqua e di mangiatoie a tramoggia conformi alla crescita degli animali. La somministrazione di acqua e alimento è stata *ad libitum* per tutta la durata della prova sperimentale.

Per quanto riguarda la gestione del microclima, dall'arrivo dei pulcini fino al giorno 7 era previsto un fotoperiodo di 23 ore di luce e 1 ora di buio, mentre dal giorno 8 al termine della prova (giorno 48) il rapporto tra ore di luce e di buio era di 20:4. Durante la prima settimana la temperatura era stata impostata a 35°C; successivamente ridotta di 2,5 °C alla settimana (-0,5 °C ogni 36 ore circa) fino ai 24 °C presenti al termine della prova.

I pulcini sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali, ciascuno dei quali prevedeva 12 recinti (repliche) secondo lo schema sotto riportato:

1. CTR (Controllo): Dieta Basale (DB);
2. T1: DB integrata con 600g/ton di METALACT;
3. T2: DB integrata con 400g/ton di METALACT;
4. T3: DB integrata con 200g/ton di METALACT.

L'alimentazione prevedeva un classico programma a 3 fasi:

1. Dall'arrivo al giorno 10: avviamento o starter;
2. Dal giorno 11 al giorno 20: accrescimento o grower;
3. Dal giorno 21 al termine della prova (48d): finissaggio o finisher.

Durante il primo periodo (0-10g), il prodotto oggetto della presente prova in vivo è stato disciolto nell'acqua di abbeverata, in quantità di 83g per 1m³, e somministrato agli animali appartenenti ai gruppi trattamento (T1, T2 e T3). Al contrario, nelle ultime due fasi sperimentali il prodotto è stato addizionato al mangime, secondo le quantità sopra riportate.

I mangimi Starter e Grower si presentavano in forma sbriciolata, per consentire un'ottimale assunzione in relazione alle dimensioni degli animali; mentre il mangime finisher era in forma pellettata. In Tabella 66 e Tabella 67 sono riportati gli ingredienti e le caratteristiche chimiche dei mangimi utilizzati.

Tabella 66. Composizione delle diete sperimentali.

Ingredienti (%TQ)	Starter ¹	Grower ²	Finisher ³
<i>Mais</i>	45.17	37.31	30.28
<i>Farina di soia 49% CP</i>	32.50	25.00	25.50
<i>Fruento</i>	15.00	15.00	20.00
<i>Sorgo</i>	0	10.00	15.00
<i>Olio di soia</i>	3.00	0	0
<i>Grassi di origine animale</i>	0	4.00	6.00
<i>Cloruro di sodio</i>	0.40	0.35	0.25
<i>Carbonato di calcio</i>	1.20	1.00	0.95
<i>Fosfato dicalcico 18%</i>	1.50	1.2	1.00
<i>DL-Metionina</i>	0.34	0.30	0.25
<i>L-Treonina</i>	0.11	0.09	0.04
<i>L-Lisina HCl</i>	0.28	0.25	0.23
<i>Premix⁴</i>	0.50	0.50	0.50

¹Starter = dal giorno 0 al giorno 11.

²Grower = dal giorno 12 al giorno 22.

³Finisher = dal giorno 23 al termine della prova (48 giorni).

⁴Contenente: vitamina A 11250 IU; vitamina D₃ 5000 IU; vitamina E 60mg; MnSO₄·1H₂O 308mg; ZnSO₄·1H₂O 246mg; FeSO₄·1H₂O 136mg; CuSO₄·5H₂O 39mg; KI 2.4mg; Na₂SeO₃ 657µg; 6-Fitasi EC 3.1.3.26, 750 FTU; Endo-1, 4-beta-xylanasi EC 3.2.1.8, 2250 U.

Tabella 67. Analisi chimica dei mangimi somministrati durante la prova sperimentale.

Composizione chimica	Starter ¹	Grower ²	Finisher ³
<i>Energia metabolizzabile (MJ/kg)</i>	12.77	13.19	13.65
<i>Proteina Grezza (%)</i>	21.8	20.2	19.0
<i>Estratto etereo (%)</i>	5.2	6.7	8.2
<i>Calcio (%)</i>	0.92	0.80	0.70
<i>Fosforo (%)</i>	0.65	0.60	0.54

¹Starter = dal giorno 0 al giorno 11.

²Grower = dal giorno 12 al giorno 22.

³Finisher = dal giorno 23 al termine della prova (48 giorni).

Al termine della prova (48 d), tutti gli animali sono stati inviati presso lo stabilimento “Avicola Val Tidone” (Castel San Giovanni, Piacenza) e processati in accordo con le normative vigenti.

Il METALACT consisteva in una miscela di *Lactobacillus farmaciminis* CNCM-I-3699 e *L. rhamnosus* CNCM-I-3698 trattati termicamente e prodotti a partire da un substrato di latte fermentato, presenti in due differenti forme: METALACT Premix e INNOBIAL (Tabella 68 e Tabella 69).

Entrambe le forme del probiotico oggetto della prova sono prodotti registrati per la specie avicola e suinicola e attualmente sul mercato, prevedevano gli stessi ceppi probiotici e lo stesso

metodo di estrazione a base lattea, tuttavia si differivano per la forma; in particolare, METALACT Premix conteneva mais e soia estrusi come carrier e argilla sepiolitica come assorbente, mentre INNOBIAL presentava solamente la base di latte fermentato. Di seguito vengono riportate le analisi chimiche e microbiologiche del prodotto utilizzato.

Tabella 68. Analisi chimica e microbiologica di METALACT Premix.

Analisi chimica		Analisi microbiologica	
Azoto totale	6%	Salmonella NF V08-052	assente in 25gr
Grassi	2%	Lieviti XP V08-059	<5000 UFC/g
Fibra grezza	5%	Muffe XP V08-059	<5000 UFC/g
Ceneri	43%	Coliformi a 44 °C C NV V08-060	<500 UFC/g
		Lactobacilli ISO 15214	<10 UFC/g dopo inattivazione

Tabella 69. Analisi chimica e microbiologica di INNOBIAL.

Analisi chimica		Analisi microbiologica	
Azoto totale	29.4%	Salmonella NF V08-052	assente in 25gr
Grassi	4.8%	Lieviti XP V08-059	<5000 UFC/g
Fibra grezza	0.2%	Muffe XP V08-059	<5000 UFC/g
Ceneri	8%	Coliformi a 44 °C CNVV08-060	<5000 UFC/g
Umidità	≤10%	Lactobacilli ISO 15214	2.10 ¹¹ UFC/g previa inattivazione

15.2.2. Controlli e prelievi

Nel corso della seguente prova *in vivo* sono stati effettuati i seguenti controlli:

15.2.2.1. Peso vivo

Tutti gli animali sono stati pesati all'arrivo (d 0), al giorno 10, 20, 35 e 45 prima del trasferimento al macello; a tale riguardo tutti i soggetti di ogni recinto venivano pesati contemporaneamente e dal valore ottenuto veniva calcolato il peso medio.

Dalla rilevazione dei pesi ai diversi controlli è stato quindi calcolato l'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG) ai diversi periodi. Per la determinazione dell'IPMG prevedeva la seguente formula:

$$(\text{peso T1} - \text{peso T0}) / n^{\circ} \text{ di giorni}$$

Due volte al giorno era inoltre previsto il conteggio degli animali e la rimozione dei soggetti deceduti per cause naturali, che venivano successivamente pesati e decurtati dal totale dei soggetti per tarare correttamente il peso del box.

15.2.2.2. Consumo di alimento

Il consumo di alimento (feed intake, FI) è stato rilevato per ciascuna replica (recinto) con la stessa cadenza della rilevazione dei pesi (giorno 10, 20 e 35). Giornalmente venivano registrate le quantità di mangime aggiunte alle mangiatoie e, alle cadenze previste per la registrazione del peso, veniva calcolato il residuo.

Inoltre, all'inizio della prova è stato inoltre prelevato un campione di mangime di ciascuna fase e trattamento per le analisi sulla composizione chimica.

Dalla correlazione tra l'incremento medio ponderale giornaliero (IMPG) e il consumo di alimento (FI), è stato possibile calcolare l'indice di conversione alimentare (ICA) degli animali, parametro di grande rilevanza nella pratica zootecnica.

In aggiunta, è stata valutata la resa o efficienza alimentare. Tale indice rappresenta il reciproco dell'ICA, ossia l'incremento di peso di un animale dopo che ha consumato 1 kg di mangime. Più grande è il valore percentuale della resa e più efficiente risulta essere la trasformazione del mangime in carne.

15.2.2.3. Prelievi e campionamenti alla macellazione

Al termine della prova, prima dell'invio all'impianto di macellazione, un animale per recinto, il cui peso era simile al peso medio del box, è stato prelevato e sacrificato per le successive analisi.

Prima del dissanguamento, tutti i soggetti sono stati storditi per immersione in vasche di stordimento (125 Hz, 80 mA/soggetto, 5 s).

Tutte le carcasse sono state pesate dopo eviscerazione al fine di poter calcolare la resa totale nonché il peso del petto in percentuale.

15.3. Analisi statistica

Le performance di crescita sono state analizzate mediante analisi della varianza con supporto del programma statistico SAS versione 9.2, includendo nel modello gli effetti del trattamento, del tempo e l'interazione trattamento x tempo. Per quanto riguarda le analisi microbiologiche, la resa alla macellazione e la qualità della carne è stata adottata la procedura GLM. Per quanto riguarda invece le analisi microbiologiche, la resa alla macellazione e la qualità della carne è stata adottata la procedura GLM, dove il recinto rappresenta l'unità sperimentale per quanto riguarda le performance di crescita, mentre il singolo soggetto rappresenta l'unità sperimentale per la qualità della carne.

15.4. Risultati

15.4.1. Performance di crescita e resa alla macellazione

Per quanto riguarda le performance produttive, riportate in Tabella 70, la somministrazione delle diete sperimentali integrate con probiotici non ha evidenziato differenze significative per i parametri produttivi indagati (PV, IMPG, FI, ICA ed efficienza alimentare).

Inoltre, nessuna differenza statistica è stata osservata per quanto riguarda i rilievi alla macellazione, resa e percentuale dei petti (Tabella 71), tra il gruppo controllo e i gruppo trattati.

Tabella 70. Effetti di METALACT sui parametri di crescita dei maschi.

Item	Trattamenti					P-value		
	CTR ¹	T1 ²	T2 ³	T3 ⁴	SEM	T ⁵	tempo	Txt ⁶
<i>PV</i> ⁷ (g)								
d 0	42.03	41.88	41.87	41.87	19.68	0.580	< 0.001	0.849
d 11	351	351	354	352				
d 22	1032	1033	1016	1022				
d 48	3662	3629	3635	3592				
<i>IMPG</i> ⁸ (g/d)								
d 0 to 11	28.09	28.08	28.34	28.20	1.05	0.498	< 0.001	0.784
d 12 to 22	62.13	62.05	60.73	61.19				
d 23 to 48	98.19	96.33	95.43	97.62				
d 0 to 48	75.38	74.71	74.81	73.96	0.767	0.630		
<i>FI</i> ⁹ (g/d)								
d 0 to 11	33.18	33.31	33.45	33.82	1.026	0.321	< 0.001	0.460
d 12 to 22	90.58	89.75	89.86	89.41				
d 23 to 48	194.20	192.09	192.19	190.08				
d 0 to 48	133.55	132.25	132.36	131.20	1.298	0.360		
<i>ICA</i> ¹⁰								
d 0 to 11	1.183	1.190	1.182	1.203	0.017	0.659	< 0.001	0.429
d 12 to 22	1.462	1.447	1.485	1.467				
d 23 to 48	1.948	1.979	1.979	1.938				
d 0 to 48	1.787	1.804	1.812	1.783	0.019	0.408		
<i>Efficienza alimentare</i>								
d 0 to 11	0.847	0.843	0.848	0.834	0.028	0.851	< 0.001	0.670
d 12 to 22	0.685	0.692	0.674	0.682				
d 23 to 48	0.514	0.506	0.506	0.516				
d 0 to 48	0.560	0.555	0.553	0.561	0.006	0.417		

¹ CTR = dieta basale senza integrazione di probiotici.

² T1 = CTR + 600g/ton di METALACT.

³ T2 = CTR + 400g/ton di METALACT.

⁴ T3 = CTR +200g/ton di METALACT.

⁵ T = effetto trattamento.

⁶ T x t = interazione tra trattamento e tempo.

⁷ PV = peso vivo.

⁸ IMPG = incremento ponderale medio giornaliero.

⁹ FI = consumo di alimento.

¹⁰ ICA = indice di conversione alimentare.

Tabella 71. Effetto di METALCT sulla resa alla macellazione dei broiler (48 d).

Item	Trattamenti				SEM	P-value
	CTR	T1	T2	T3		
<i>Resa (%)</i>	74.76	74.10	74.76	73.87	0.353	0.317
<i>Petto (%)</i>	21.42	20.56	21.48	20.88	0.475	0.461

15.5. Discussione

Nel presente lavoro, la somministrazione del probiotico costituito da una combinazione di *Lactobacillus farmaciminis* e *L. rhamnosus*, non ha modificato in maniera significativa i principali parametri produttivi presi in esame. Tali risultati trovano conferma in uno studio condotto da Zunkifli *et al.* (2000), nel quale gli autori hanno persino riscontrato un significativo calo nel consumo di alimento nel primo periodo della sperimentazione (1-21d), che ha provocato un peggioramento dell'indice di conversione alimentare. In aggiunta, Timmerman *et al.* (2006) non ha osservato differenze significative relative al peso vivo, all'assunzione di alimento e all'incremento ponderale giornaliero in seguito alla somministrazione di un additivo contenente diversi ceppi di lattobacilli a polli da carne. Tali conclusioni sono in accordo con un recente lavoro di Awad *et al.* (2009), nel quale la supplementazione di lattobacilli non ha mostrato differenze statistiche relativamente al peso vivo e all'incremento ponderale medio degli animali.

In letteratura sono tuttavia presenti diversi studi che mostrano come la somministrazione di probiotici, in particolare di lattobacilli a polli da carne, sia in grado di migliorare le performance produttive degli animali (Kalavathy *et al.*, 2003; Khaksefidi and Ghoorchi, 2006; Apata, 2008).

Per quanto riguarda invece i dati relativi alla resa alla macellazione, il probiotico oggetto della prova non ha mostrato differenze significative ($P>0.05$); questi risultati sono in accordo con quanto osservato da Denli *et al.* (2003), dove la somministrazione di un probiotico non ha modificato la resa della carcassa degli animali appartenenti al gruppo trattato. Gli stessi risultati sono stati confermati da Awad *et al.* (2009), il quale ha riportato una riduzione della resa in percentuale tra il gruppo che aveva ricevuto il probiotico e il gruppo controllo.

Molti autori hanno studiato gli effetti della supplementazione di probiotici sui parametri produttivi dei polli da carne e i risultati di tali ricerche non sono univoci; bensì dipendono fortemente dal ceppo microbico utilizzato, spesso associato con acidi organici, dal livello e dalla forma di inclusione nella dieta e dalla durata del trattamento. Inoltre, la somministrazione di tali additivi mediante l'acqua di abbeverata porta ad un minore incremento ponderale degli animali, se confrontata con l'assunzione del probiotico attraverso l'alimento (Kalavathy *et al.*, 2003). Un altro elemento discriminante è rappresentato dalle tempistiche di somministrazione; in tal senso, una precoce colonizzazione di specie batteriche benefiche risulta fondamentale sia per la creazione di un habitat favorevole al loro sviluppo, sia per il corretto sviluppo e funzionalità del tratto gastrointestinale dell'animale, che si ripercuotono in maniera positiva sul metabolismo e sulle performance degli stessi (Timmerman *et al.*, 2006).

15.6. Conclusioni

La somministrazione dell'additivo probiotico non ha modificato in maniera significativa i parametri considerati; tuttavia, l'utilizzo di tale prodotto nella realtà zootecnica potrebbe rappresentare uno strumento interessante in alternativa agli antibiotici per ottimizzare le performance di crescita, modulare la flora microbica intestinale e migliorare le proprietà qualitative delle carni. Ulteriori studi saranno inoltre necessari per valutare gli effetti dei possibili ceppi batterici sull'ambiente intestinale, nonché l'impatto economico dei probiotici in avicoltura.

16. Conclusioni generali

Il presente lavoro ha messo in luce come l'applicazione di adeguate strategie alimentari, che consistono nell'integrazione di sostanze in grado di migliorare le caratteristiche nutrizionali dei mangimi, possano migliorare in maniera significativa i principali parametri quanti qualitativi degli animali oggetto di studio.

Come osservato nei quattro studi *in vivo* riportati, le differenti sostanze in esame non agiscono solamente in maniera diretta sulle performance produttive degli animali allevati, aumentando ad esempio l'indice di conversione alimentare, ma anche indirettamente, grazie ad un miglioramento delle condizioni generali di benessere, valutate come riduzione del tasso di mortalità e minor perdita di condizione corporea, e influenzando positivamente l'equilibrio intestinale degli stessi.

Con riferimento particolare all'allevamento del pollo da carne, considerata una filiera zootecnica altamente specializzata e standardizzata e caratterizzata da un ciclo di allevamento molto breve, il miglioramento degli indici produttivi rappresenta un traguardo positivo dal punto di vista zootecnico.

In tal senso, la supplementazione del gliceril polietilenglicol ricinoleato ha mostrato come l'aggiunta di un agente emulsionante nella dieta di questi animali rappresenti una strategia alimentare in grado di agire in maniera positiva sull'utilizzazione dei grassi alimentari, con significative ripercussioni sulle produzioni finali e più in generale sul metabolismo lipidico epatico. Nello studio che ha valutato invece l'integrazione di un estratto di polpe di oliva ad elevata concentrazione di polifenoli, gli effetti del composto somministrato sembrano maggiormente rivolti a prevenire o contenere lo stress ossidativo e migliorare di conseguenza lo stato di salute degli animali e la qualità dei prodotti derivati.

Durante lo svolgimento di queste prove è stata inoltre studiata l'espressione di alcuni geni direttamente coinvolti con il metabolismo lipidico; i risultati ottenuti mettono in evidenza l'importanza della scelta del composto, del periodo e della modalità di somministrazione e infine della fase fisiologica e produttiva degli animali a cui viene somministrato. Tale approccio metodologico rappresenta senza dubbio un'interessante strategia nel campo della nutrizione animale che pone le basi per una futura e sempre più concreta applicazione in campo umano.

La prova sperimentale effettuata sulla specie suina ha rivelato invece la presenza di un quadro metabolico molto complesso. L'integrazione del composto ad azione antiossidante ha mostrato effetti tendenzialmente positivi sulle scrofe, in particolare è stata osservata una minore perdita di condizione corporea nell'immediato post parto negli animali appartenenti al gruppo trattato

rispetto al controllo; tuttavia l'assenza di risultati particolarmente significativi potrebbe essere correlata alla limitata tempistica di somministrazione della sostanza.

Al contrario, l'aggiunta dell'estratto di polpe di oliva ad elevata concentrazione di polifenoli ha mostrato effetti positivi sui parametri dei suinetti. Nello specifico, sono state osservate differenze significative sul peso finale, sull'incremento ponderale medio giornaliero nel secondo periodo della prova e come media complessiva, sull'indice di conversione alimentare e infine sulla resa degli animali. I risultati ottenuti in questa fase sembrano evidenziare come un'integrazione più prolungata del composto in esame possa indurre maggiori modificazioni a livello metabolico e produttivo; rimarcando tuttavia l'importanza del latte materno, come alimento completo e funzionale, nella nutrizione del neonato.

In generale, l'utilizzo di composti fenolici in alimentazione animale è caratterizzato da molteplici fattori sia intrinseci, come la variabilità individuale dei soggetti, che estrinseci come la biodisponibilità e il meccanismo d'azione della sostanza, possibili effetti sinergici positivi o negativi con altri principi nutritivi, nonché il dosaggio e la durata della somministrazione. In tal senso, ulteriori ricerche saranno necessarie al fine di valutare con maggior accuratezza i pathways metabolici coinvolti.

Infine, lo studio che ha valutato l'impatto dell'aggiunta di un additivo probiotico nella dieta di polli da carne non ha mostrato differenze statistiche sui principali indici produttivi degli animali oggetto della prova; tuttavia, la somministrazione dei lattobacilli potrebbe rappresentare una valida alternativa agli antibiotici nella modulazione della flora microbica intestinale, con possibili benefici sulla qualità delle carni.

In questo contesto, nuovi studi si stanno focalizzando sugli effetti di differenti parametri come il ceppo microbico utilizzato, la modalità di inclusione, la durata del trattamento ed eventualmente l'associazione del probiotico con altre sostanze ad effetto benefico sulla flora intestinale, sui parametri quanti qualitativi di interesse.

Per quanto riguarda l'impatto dell'alimentazione sulla qualità dei prodotti di origine animale, è stato osservato che l'inclusione delle diverse sostanze nelle diete delle specie allevate è in grado di apportare delle modifiche sulle rese alla macellazione e sui principali indici qualitativi dei prodotti, con particolare riferimento all'integrazione dell'estratto di polpe di oliva ad elevata concentrazione di polifenoli nel pollo da carne, grazie alle proprietà antiossidanti dei composti fenolici. Tuttavia, come riportato in letteratura, i risultati non sono univoci, bensì dipendono fortemente dal composto utilizzato e soprattutto dalle modificazioni che avvengono durante i processi digestivi che ne influenzano la struttura chimica e conseguentemente la biodisponibilità.

Tuttavia, è importante sottolineare che la mancanza di evidenti effetti benefici sulla qualità dei prodotti di origine animale non comporta in alcun modo eventuali risvolti negativi dell'utilizzo di composti ad azione benefica in zootecnia, in quanto tutte le sostanze presenti sui registri ufficiali, prima dell'immissione sul mercato, vengono sottoposte a rigide valutazioni tossicologiche al fine di scongiurare l'insorgenza di qualsiasi effetto collaterale sul consumatore.

Un importante componente della moderna zootecnia è senza dubbio rappresentato dalla selezione genetica, che ha permesso nel corso degli ultimi trenta quarant'anni di ottenere animali altamente selezionati che presentino performance produttive sempre più elevate in periodi di tempo sempre più brevi. Questo discorso è particolarmente evidente nell'allevamento del pollo da carne, dove il controllo della genetica ha portato alla selezione di ibridi commerciali caratterizzati da tassi di crescita elevati e uniformi.

Tuttavia, se da un lato il miglioramento genetico ha rappresentato la chiave di volta da una zootecnia rurale e poco sviluppata verso un comparto produttivo fortemente specializzato e industrializzato su scala mondiale, risulta essenziale sottolineare l'importanza di una corretta alimentazione animale. La formulazione di diete bilanciate e complete è infatti necessaria per soddisfare i fabbisogni degli animali in termini di macro e micronutrienti e per supportare le loro produzioni. Di conseguenza, l'applicazione di strategie nutrizionali volte a migliorare le caratteristiche dei mangimi, all'interno delle quali rientra lo scopo del presente lavoro, ha la funzione di massimizzare le potenzialità genetiche degli animali allevati ed esacerbare gli effetti alimentari; in tal senso, le differenze riscontrate saranno ridotte in termini quantitativi, ma sostanziali dal punto di vista qualitativo.

Attualmente, la ricerca in campo nutrizionale si sta focalizzando sul miglioramento della digeribilità dei nutrienti al fine di incrementare ulteriormente il valore nutritivo della dieta e di ridurre la quota di alimento indigerito ed eliminato con le deiezioni.

Un altro importante campo di studio è rappresentato dal microbiota e dall'impatto delle differenti componenti alimentari sull'equilibrio delle popolazioni microbiche simbiotiche.

Il microbiota svolge infatti un ruolo fondamentale all'interno della fisiopatologia dell'ospite, regolando ad esempio i processi di digestione ed assorbimento dei nutrienti, il metabolismo lipidico e la resistenza nei confronti di microrganismi patogeni. Un'attenta gestione dell'alimentazione rappresenta dunque uno dei principali fattori in grado di influenzare positivamente la composizione quali/quantitativa della microflora intestinale apportando dirette conseguenze sulle performance degli animali.

17. Riferimenti bibliografici

- Agarwal A., Gupta S. and Sharma R.K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3:1–21;
- Agerholm-Larsen L., Bell M.L., Grunwald G.K. and Astrup A. 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *European Journal of Clinical Nutrition*. 54(11):856-60;
- Aguilera C.M., Mesa M.D., Ramirez-Tortosa M.C., Nestares M.T. and Ros E. 2004. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. *Clinical Nutrition*. 23(4):673–681;
- AIA. 2016. BOLLETTINO dei controlli della produttività del latte;
- Albera E. and Kankofer M. 2008. Antioxidants in Colostrum and Milk of Sows and Cows. *Reproduction of Domestic Animals*. 44(4):606-11;
- Albertí P., Beriain M.J., Ripoll G., Sarriés V., Panea B., Mendizabal J.A., Purroy A., Olleta J.L. and Sañudo C. 2014. Effect of including linseed in a concentrate fed to young bulls on intramuscular fatty acids and beef color. *Meat Science*. 96(3):1258–1265;
- Albuquerque J.A., Gonzalvez J., Garcia D. and Cegarra, J. 2004. Agrochemical characterization of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*. 91(2):195-200;
- Aliotta G., Fiorentino A. and Temussi A. 2002. Olive oil mill wastewater: isolation of polyphenols and their phytotoxicity in vitro. *Allelopathy Journal*. 9(1):9–17;
- Al-Marzooqi W. and S. Leeson S., 2000. Effect of Dietary Lipase Enzyme on Gut Morphology, Gastric Motility, and Long-Term Performance of Broiler Chicks. *Poultry Science*. 79(1):956–960;
- American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund. 1997. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. *Nutrition*. 15(6):523-526;
- Anadón A., Martínez - Larranaga M.R.M. and Martínez M.A. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 45(1):91-95;
- Andújar I., Recio M.C., Giner R.M., Ríos J.L. (2012) Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2012/906252;

- Apata D.F. 2008. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88(7):1253–1258;
- Askun T., Tumen G., Satil F. and Ates M. 2009. Characterization of the phenolic composition and antimicrobial activities of Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*. 47(7):563–571;
- ASSALZOO, 2016. *Annuario 2016*. 1-161;
- ASSICA. 2017. *L'industria delle Carni e dei Salumi*. 6:1-27;
- Attard E. 2013. A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Central European Journal of Biology*. 8(1):48–53;
- AVEC Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU countries. 2016. Disponibile al link: <http://www.avec-poultry.eu/annual-reports-overview/annual-report-2016>;
- AVIAGEN www.aviagen.com;
- Awad W.A., Ghareeb K., Abdel-Raheem S. and Bohm J. 2009. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*. 88(1):49-55;
- Baird M.F., Graham S.M., Baker J.S. and Bickerstaff G.F. 2012. Creatine-Kinase- and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012:1-13;
- Baldi A. and Pinotti L. 2008. Bioactive Components of Milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 606:109-125;
- Baldi A., Gottardo D. and Giromini C. 2016. Proteine animali: una previsione della domanda globale nei prossimi 20 anni. *Rivista di Nutrizione Pratica*. 10:20-21;
- Baldi A., Maffii M., Canali E and Verga M. 1986. Relazione tra aggressività e parametri ematici in suinetti raggruppati dopo lo svezzamento. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. 40:638-642;
- Baldi A., Politis I., Pecorini C., Fusi E., Chronopoulou R. and Dell'Orto V., 2005. Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *Journal of Daily Research*. 72:66-72;
- Barahona M., Olleta J.L., Sanudo C., Alberti P., Panea B., Pèrez-Juan M., Realini C.E. and Campo M.M. 2016. Effects of whole linseed and rumen-protected conjugated linoleic acid enriched diets on beef quality. *Animal*. 10(4):709-717;

- Barton L., Marounek M., Kudrna V., Bures D. and Zahradkova R. 2007. Growth performance and fatty acid profile of intramuscular and subcutaneous fat from Limusin and Charolais heifers fed extruded linseed. *Meat science*. 76(3):517-523;
- Basli A., Soulet S., Chaher N., Mérillon J.M., Chibane M., Monti J.P. and Richard T. 2012. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:[10.1155/2012/805762](https://doi.org/10.1155/2012/805762);
- Bazoti F.N., Bergquist J., Markides K. and Tzarbopoulos A. 2006. Noncovalent interaction between amyloid- β -peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 17(4):568-575;
- Benn T., Kim B., Park Y.K., Wegner C.J., Harness E., Nam T.G., Kim D.O., Lee J.S. and Lee J.Y. 2014. Polyphenol-rich blackcurrant extract prevents inflammation in diet-induced obese mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 25(10):1019-1025;
- Berchieri-Ronchi C.B., Kim S.W., Zhao Y., Correa C., Yeum K.J. and Ferreira A.L.A. 2011. Oxidative stress status of highly prolific sows during gestation and lactation animal. *Animal*. 5(11):1774-1779;
- Bessei W. 2006. Welfare of broilers: a review. *World's Poultry Science Journal*, 62(3):455-466;
- Bhatt D.L. and Topol E.J. 2003. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2(1):15-28;
- Biesalski H.K. 2007. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 10(6):724-728;
- Bogani P., Galli C., Villa M. and Visioli F. 2007. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*. 190(1):181-186;
- Bonanome A., Pagnan A., Caruso D., Toia A., Xamin A., Fedeli E., Berra B., Zamburlini A., Ursini F. and Galli G. 2000. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 10(3):111-120;
- Bontempo V., Comi M. and Jiang X.R. 2016. The effects of a synthetic emulsifier supplementation on growth performance of broiler chicks and weaned piglets. *Animal*. 10(4):592-596;
- Bontempo V., Dell'Orto V. and Savoini G. 2013. Possibile impiego del chitosano nell'alimentazione del suinetto. *Summa*. 9:61-64;
- Bontempo V., Savoini G. and Dell'Orto V. 2013. Produzioni sostenibili: feed no food per l'alimentazione dei suini. *Summa*. 6:15-19;

- Bontempo V., Sciannimanico D., Pastorelli G., Rossi R., Rosi F. and Corino C. 2004. Dietary Conjugated Linoleic Acid Positively Affects Immunologic Variables in Lactating Sows and Piglets. *Journal of Nutrition*. 134(4):817-824;
- Bosetti C., La Vecchia C., Talamini R., Negri E., Levi F., Dal Maso L. and Franceschi S. 2002. Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study from Italy and Switzerland. *International Journal of Cancer*. 100(3):355-60;
- Botsoglou E., Govaris A., Moulas A. and Botsoglou N. 2010. Oxidative stability and microbial growth of turkey breast fillets during refrigerated storage as influenced by feed supplementation with olive leaves, oregano and/or α -tocopheryl acetate. *Journal British Poultry Science*. 51(6):760-768;
- Bouvard V., Loomis D., Guyton K.Z., Grosse Y., Ghissassi F.E., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Mattock H. and Straif K. 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncology*. 16(16):1599-600;
- Brenes A., Viveros A., Goni I., Centeno C., Sáyago-Ayerdy S.G., Arija I. and Saura-Calixto F. 2008. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poultry science*. 87(2):307-316;
- Breton C., Terral J.F., Pinatel C., Médail F., Bonhomme F. and Bervillé A. 2009. The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus Biologies*. 332(12):1059- 64;
- Briante R., Patumi M., Terenziani S., Bismuto E., Febbraio F. and Nucci R. 2002. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50(17):4934-40;
- Brooks P.H., Beal J.D. and Niven S. 2001. Liquid feed of pigs: potential for reducing environmental impact and for improving productivity and food safety. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*. 13:49-63;
- Buddington R.K., Piva A., Bach Knudsen K.E. and Lindberg J.E. 2001. The use of nondigestible oligosaccharides to manage the gastrointestinal ecosystem: Gut environment of pigs. Nottingham University Press, Nottingham, UK 137-147;
- Bulotta S., Celano M., Lepore S.M., Montalcini T., Pujia, A. and Russo D. 2014. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*. 12, 219. doi: 10.1186/s12967-014-0219-9;
- Cabras P. and Martelli A. *Chimica degli alimenti*. Piccin, 2004;

- Cao B.H., Karasawa Y. and Guo Y.M. 2005. Effects of green tea polyphenols and fructo-oligosaccharides in semi-purified diets on broilers' performance and caecal microflora and their metabolites. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 18(1):85-89;
- Cardinali A., Pati S., Minervini F., D'Antuono I., Linsalata V. and Lattanzio V. 2012. Verbascoside, Isoverbascoside, and Their Derivatives Recovered from Olive Mill Wastewater as Possible Food Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(7):1822–1829;
- Carluccio M.A., Sciculella L., Ancora M.A., Massaro M., Scoditti E., Storelli C., Visioli F., Distanto A. and De Caterina R. 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 23(4):622-629;
- Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Sermanni G.G. and Lo Cascio B. 2003. Reduction of the phenolic components in olive mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*. 50(8):959-966;
- Casula G. and Cutting S.M. 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5):2344-2352;
- CDC Center for Disease Control and Prevention. Disponibile al sito: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/index.htm>;
- Cerolini S. 2013. *Seminari Carne Filiera Zootecnica, Valore Alimentare*;
- Cerolini S., Marzoni Fecia di Cossato M., Romboli I., Schiavone A. and Zaniboni L. 2008. *Avicoltura e Coniglicoltura*. 1° edizione. Le Point Veterinaire Italie srl;
- Cevolani D. 2016. *Prontuario degli alimenti per il suino*. Edagricole-New Business Media;
- Cevolani D., Barbieri L., Bombardieri R., Carrescia R., Conte F., Cuccolini M., Mattiello S., Pepe F and Vincenzi R. 2010. *Prontuario degli alimenti per il suino*. Seconda edizione. Ed Agricole;
- Chandrasekara A. and Shahidi F. 2010. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(11):6706-6714;
- Cheyrier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1):223S–229S;
- Chiofalo V.B., Liotta L. and Zumbo A. 2003. Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Ruminant Research*. 55(1-3):169–176;

- Ciani E., 2014. Le tecnologie a supporto delle scienze "omiche". XXI Congresso Nazionale SIPAOC. Disponibile a: <https://www.researchgate.net/publication/271608113>;
- Cicerale L. and Russell K. 2010. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Journal of Molecular Science*. 11(2):458–479;
- Cicerale S., Lucas L.J. and Keast R.S. 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(2):129-35;
- Cinq-Mars C.D., Hu C., Kitts D.D. and Li-Chan E.C.Y. 2008. Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-Converting enzyme-inhibitory peptides in pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56(2):410–419;
- Claudine M., Gary W., Christine M., Augustin S. and Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of clinical nutrition*. 81(1):230-242;
- COBB-VANTRESS www.cobb-vantress.com;
- Conde C., Delrot S. and Geros H. 2008. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal Plant Physiology*. 165(15):1545-62;
- Coni E., Di Benedetto R., Di Pasquale M., Masella R., Modesti D., Mattei R. and Carlini E.A. 2000. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low-density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*. 35(1):45–54;
- Corino C., Musella M., Pastorelli G., Rossi R., Paolone K., Costanza L., Manchisi A. and Maiorano G. 2008. Influences of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and total lysine content on growth, carcass characteristics and meat quality of heavy pigs. *Meat Science*. 79(2):307-316;
- CREA Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria. Disponibile al sito: http://nut.entecra.it/646/tabelle_di_composizione_degli_alimenti.html?idalimento=106200&quant=100;
- Crovetto G.M. and Sandrucci A. 2010. Allevamento animale e riflessi ambientali. Fondazione Iniziative zooprofilattiche e zootecniche. Brescia;
- Cruz-Hernandez C., Deng, Z., Zhou, J., Hill, A.R., Yurawercz M.P., Delmonte P., Mossoba M.M., Dugan M.E.R. and Kramer J.K.G. 2004. Methods for Analysis of Conjugated Linoleic Acids and *trans*-18:1 Isomers in Dairy Fats by Using a Combination of Gas Chromatography,

- Silver-Ion Thin-Layer Chromatography/Gas Chromatography, and Silver-Ion Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*. 87(2):545-562;
- D'Archivio G., Filesi C., Vari R., Scazzocchio B. and Masella R. 2010. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Science*. 11(4):1321–1342;
- Dal Bosco A., Castellini C., Cardinali R. Mourvaki E., Moscati L., Battistacci L., Servili M. and Taticchi A. 2007. Olive cake dietary supplementation in rabbit: immune and oxidative status. *Italian Journal of Animal Science*. 6(1):761-763;
- Davidson G.P. and Butler R.N. 2000. Probiotics in pediatric gastrointestinal disorders. *Current Opinion in Pediatric*. 12(5):477-481;
- De la Torre A., Gruat D., Durand D., Micol D., Peyron A., Scislawski V. and Bauchart D., 2006. Factors influencing proportion and composition of CLA in beef. *Meat science*. 73(2):258-268;
- De la Torre-Carbot K., Chavez-Servin J.L., Jauregui O., Castellote A., Lamuela-Raventos R.M., Fito M., Covas M.I., Munoz-Aguayo D. and Lopez-Sabater M.C. 2007. Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low-density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 583(2):402–410;
- De Marco M., Salcedo W.L., Pastorelli G., Rossi R., Corino C., Bergagna S., Mellia E., Gennero M.S., Biasibetti E., Capucchio M.T., Nurisso S., Tarantola M., Forneris G. and Schiavone A. 2015. Effects of verbascoside supplemented diets on growth performance, blood traits, meat quality, lipid oxidation and histological features in broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*. 14:172-178;
- de Roos N.M. and Katan M.B. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71(2):405-411;
- de Vrese M.M., Stegelmann A. and Richter B. 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2):421S-429S;
- de Vries S., Kwakkel R.P., Pustjens A.M., Kabel M.A., Hendriks W.H. and Gerrits W.J.J. 2014. Separation of digesta fractions complicates estimation of ileal digestibility using marker methods with Cr₂O₃ and cobalt-ethylenediamine tetraacetic acid in broiler chickens. *Poultry Science*. 93(8):2010–2017;
- Dekdouk N., Malafrente N., Russo D., Faraone I., De Tommasi N., Ameddah S., Severino L. and Milella L. 2015. Phenolic Compounds from *Olea europaea* L. Possess Antioxidant

- Activity and Inhibit Carbohydrate Metabolizing Enzymes In Vitro. Evidence-Based Complement Alternative Medicine. doi: 10.1155/2015/684925;
- Dell'Orto V and Baldi G. 2014. La produzione di carne bovina a livello mondiale e nazionale: prospettive. *Mangimi e alimenti.it*;
- Dell'Orto V and Cheli F. 2013. La carne rossa in un approccio di nutrizione totale. *Intersezioni*. 31:1-4;
- Dell'Orto V. 2009. La nutrizione funzionale in sala parto. Atti della società italiana di patologia e allevamento suino. XXXV Meeting annuale. Modena;
- Dell'Orto V., Bontempo V. and Savoini G. 2009. L'importanza di un'adeguata assunzione del latte nel suinetto SUMMA. 4:9-13;
- Dell'Orto V., Sgoifo-Rossi C.A., Cheli F. and Bassini A.L. 2005. Sostanze naturali per la prevenzione delle patologie stress indotte del bovino da carne. *Quaderni della Ricerca, Regione Lombardia n°44*;
- Dell'Aglio M., Maschi O., Galli G.V., Fagnani R., Dal Cero E., Caruso D. and Bosisio E. 2008. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP phosphodiesterase. *British Journal of Nutrition*. 99(5):945-951;
- Denli M., Okan F. and Celik K. 2003. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets to broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2(2):89-91;
- Dierick N. and Decuypere J. 2004. Influence of lipase and/or emulsifier addition on the ileal and faecal nutrient digestibility in growing pigs fed diets containing 4% animal fat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(12):1443-1450;
- Direttiva 2007/43/CE del Consiglio del 28 giugno 2007 che stabilisce norme minime per la protezione dei polli allevati per la produzione di carne;
- Duda C., Tomasz T., Paweł S. and Paweł S. 2015. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition*. 54(3):325–341;
- Dueñas M., Muñoz-González I., Cueva C., Jiménez-Girón A., Sánchez-Patán F., Santos-Buelga C., Moreno-Arribas M. and Bartolomé B. 2015. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed Research International*. 2015:850902;
- Duncan J.H. 1988. The welfare of farm animals: an ethological approach. *Science Progress*-71(283):317-326;

- Ebrahimi A. and Schluesener H. 2012 Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*. 11(2):329-45;
- EFSA, 2012. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal*. 10(2):2557-2623;
- Eid Y.Z., Ohtsuka A. and Hayashi K. 2003. Tea polyphenols reduce glucocorticoid-induced growth inhibition and oxidative stress in broiler chickens. *British Poultry Science*. 44(1):127-32;
- Erdmann K., Cheung, B.W.Y. and Schroder H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. 19(10):643–654;
- Erickson K.E. and Hubbard N.E. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *American Society of Nutritional Science*. 130(2S):403S-409S;
- Escrich E., Moral R. and Solanas M. 2011. Olive oil, an essential component of the Mediterranean diet and breast cancer. *Public Health Nutrition*. 14(12A):2323–2332;
- Estruch R., Ros E., Salas-Salvadó J., Covas M.I., Corella D., Arós F., Gómez-Gracia E., Ruiz-Gutiérrez V., Fiol M., Lapetra J., Lamuela-Raventos R.M., Serra-Majem L., Pintó X., Basora J., Muñoz M.A., Sorlí J.V., Martínez J.A. and Martínez-González M.A. 2013. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *The New England journal of medicine*. 368(14):1279-1290;
- EU Agricultural Market Briefs n°6, 2015;
- European Commission. 2017. Short-term Outlook for EU agricultural markets – Winter 2017;
- Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P., Servili M., Selvaggini R., Montedoro G.F., Di Saverio C. and Morozzi G. 2006. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *Journal of Nutrition*. 136(3):614-619;
- Fabiani R., Fuccelli R., Pieravanti F., De Bartolomeo A. and Morozzi G. 2009. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Molecular Nutrition in Food Research*. 53(7):887-896;
- Fabiani R., Rosignoli P., De Bartolomeo A., Fuccelli R., Servili M. and Morozzi G. 2011. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenolic compounds induce apoptosis on HL60 cells. *Food Chemistry*. 125:1249-1255;

- Fairbrother J.M., Nadeau E. and Gyles C.L. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*. 6(1):17-39;
- FAO. 2006c. *World Livestock 2011. Livestock in Food Security*. 78-98;
- FAO. 2011. *World Livestock 2011 – Livestock in food security*. Rome, FAO;
- FAO. Alexandratos N. and Bruinsma J. 2012. *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. ESA Working paper. 12(3);
- Farr S.A., Price T.O., Domingue L.J., Motisi, A., Saiano F., Niehoff M.L., Morley J.E., Banks W.A., Ercal N. and Barbagallo M. 2012. Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *Journal of Alzheimers Diseases*. 28(1):81-92;
- Fernández-Bolaños J., Rodríguez G., Rodríguez R., Heredia A., Guillén R. and Jiménez A. 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “alperujo”. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50(23):6804-6811;
- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A. and Parrella A. 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular weight phenol components. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51(4):1005–1009;
- Fito M., Cladellas M., De la Torre R., Marti J., Alcantara M., Pujadas-Bastardes M., Marrugat J., Bruguera J., Lopez-Sabater M.C., Vila J. and Covas M.I. 2005. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*. 181(1):149–158;
- Folch J., Lees M. and Sloane-Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226(1):497–509;
- Food and agriculture Organization/World Health Organization. 2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic acid Bacteria. Available from: www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm;
- Frankel E., Bakhouché A., Lozano-Sánchez J., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. 2013. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 61(22):5179–5188;

- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*. 15(12): 8813-8826;
- Gatlin D.M. and Peredo A.M., 2012. Prebiotics and Probiotics: Definitions and Applications. Southern Regional Aquaculture Center. 4711:8-43;
- Georgoulis M., Kontogianni M.D. and Yiannakouris. 2014. Mediterranean Diet and Diabetes: Prevention and Treatment. *Nutrients*. 6(4):1406–1423;
- Giardini A. and Villa S. 2007. Il vitello parte meglio grazie ai probiotici. *L'Allevatore Magazine* 2. Area Tecnica;
- Giavasis I., Tsante E., Goutsidis P., Papatheodorou K. and Petrotos K. 2012. Stimulatory effect of novel polyphenol-based supplements from olive mill waste on the growth and acid production of lactic acid bacteria. *Microbes in Applied Research*. 308-312;
- Goliomytis M., Kartsonas N., Charismiadou M.A., Symeon G.K., Simitzis P.E. and Deligeorgis S.G. 2015. The Influence of Naringin or Hesperidin Dietary Supplementation on Broiler Meat Quality and Oxidative Stability. *PLoS One*. 10(10):e0141652;
- Gong D., Geng C., Jiang L., Cao J., Yoshimura H. and Zhong L. 2009. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytotherapy Research*. 23(5):646-650;
- Goni I., Brenes A., Centeno C., Viveros A., Saura-Calixto F., Rebole A., Arija I. and Estevez R. 2007. Effect of Dietary Grape Pomace and Vitamin E on Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Susceptibility to Meat Lipid Oxidation in Chickens. *Poultry Science*. 86(3):508–516;
- Gonzalo H., Frutos P., Giráldez F.J., Mantecón Á.R. and Álvarez Del Pino M.C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*. 109(1-4):65-78;
- Gucci R., Perri E., Servili M. 2004. Il miglioramento delle caratteristiche organolettiche tipiche degli oli extra vergini di oliva rispetto alle esigenze di mercato;
- Hagiwara K., Goto T., Araki M., Miyazaki H. and Hagiwara H. 2011. Olive polyphenols hydroxytyrosol prevents bone loss. 662(1-3):78-84;
- Harper C.R., Edwards M.C. and Jacobson T.A. 2006. Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration or particle size in human subjects. *Journal of Nutrition*. 136(11):2844–2848;

- Havenstein G.B., Ferket P.R. and Qureshi M.A. 2003. Growth, livability and feed conversion on 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* 82(10):1500-1508;
- Heim K.E., Tagliaferro A.R. and Bobilya D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10):572-584;
- Hirayama K. and Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infection*. 2(6):681-686;
- Hodge A.M., English D.R., McCredie M.R., Severi G., Boyle P., Hopper J.L. and Giles G.G. 2004. Foods, nutrients and prostate cancer. *Cancer Causes Control*. 15(1):11-20;
- Hong H.A., Duc L.H. and Cutting S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(4):813-835;
- Hu Z.P., Wang T., Ahmad H., Zhang J.F., Zhang L.L. and Zhong X. 2015. Effects of different formulations of α -tocopherol acetate (vitamin E) on growth performance, meat quality and antioxidant capacity in broiler chickens. *British Poultry Science*. 56(6):687-95;
- Huang J., Yang D., Gao S. and Wang T. 2008. Effects of soy-lecithin on lipid metabolism and hepatic expression of lipogenic genes in broiler chickens. *Livestock Science*. 118(1-2):53-60;
- Huang J.B., Zhang Y., Zhou Y., Zhang Z., Xie Z., Zhang J. and Wan X. 2013. Green tea polyphenols alleviate obesity in broiler chickens through the regulation of lipid-metabolism-related genes and transcription factor expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(36):8565-8572;
- Huang J.B., Zhang Y., Zhou Y.B., Wan X.C. and Zhang J.S. 2015. Effects of epigallocatechin gallate on lipid metabolism and its underlying molecular mechanism in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 99(4):719-727;
- Hussain M., Rehman A.U. and Khalid M.F. 2012. Feeding of guar meal and the application of enzymes in improving nutritive value for broilers. *World's poultry science journal*. 68(2):253-268;
- Hyronimus B., Le Marrec C., Hadj Sassi A. and Deschamps A. 2000. Acid and bile tolerance of sporeforming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 61(2-3):193-197;
- INRAN-SSICA-IBSI-ISIT. 2011. Salumi italiani: nuovi valori, nuovo valore;

- Isley S.E., Miller H., Greathead M. and Kamel C. 2003. Plant extracts as supplements for lactating sows: effects on piglet performance sow food intake and diet digestibility. *Animal Science*. 77(2):247-254;
- Ismea. 2017. Consumi Alimentari. I consumi domestici delle famiglie italiane;
- Isolauri E., Sutas Y., Kankaanpaa P., Arvilommi H. and Salminen S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2):444S-450S;
- Jabbour H.N., Sales K.J., Catalano R.D. and Norman J.E. 2009. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction*. 138(6):903–919;
- Jadamus A., Vahjen W. and Simon O. 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Archives of Animal Nutrition*. 54(1):1-17;
- Jiang R.R., Zhao G.P., Zhao J.P., Chen J.L., Zheng M.Q., Liu R.R. and Wen J. 2014. Influence of dietary nicotinic acid supplementation on lipid metabolism and related gene expression in two distinct broiler breeds of female chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 98(5):822-829;
- Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah N. and Jalaludin S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*. 79(6):886-891;
- José J.M., Moñino M.I., Martínez C., Lafuente A. and Sotomayor J.A. 2010. Introduction of Distillate Rosemary Leaves into the Diet of the Murciano Granadina Goat: Transfer of Polyphenolic Compounds to Goats' Milk and the Plasma of Suckling Goat Kids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58(14):8265–8270;
- Kaczmarek S.A., Bochenek M., Samuelsson A.C. and Rutkowski A. 2015. Effects of glyceryl polyethylene glycol ricinoleate on nutrient utilisation and performance of broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition*. 69(4):285-96;
- Kahle M., Schäfer A., Seelig A., Schultheiß J., Wu M., Aichler M., Leonhardt J., Rathkolb B., Rozman J., Sarioglu H., and Hauck S.M. 2015. High fat diet-induced modifications in membrane lipid and mitochondrial-membrane protein signatures precede the development of hepatic insulin resistance in mice. *Molecular Metabolism*. 4(1):39-50;
- Kalavathy R., Abdullah N., Jalaludin S. and Ho Y.W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performances, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*. 44(1):139-144;
- Karr J.E., Alexander J.E. and Winningham R.G. 2011. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognition throughout the lifespan: A review. *Nutritional Neuroscience*. 14(5):216-225;

- Kerrigan S. and Lindsey T. 2005 Fatal caffeine overdose: Two case reports. *Forensic Science International*. 153(1):67-69;
- Khaksefidi A. and Ghoorchi T. 2006. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. *The Journal of Poultry Science*. 43(3):296-300;
- Ki T.S., Moon Y.K. and Soon K.B. 2014. Alcoholic liver disease: treatment. *World Journal of Gastroenterology*. 20(36):12934–12944;
- Kim B., Ku C.S., Pham T.X., Park Y., Martin D.A., Xie L., Taheri R., Lee J. and Bolling B.W. 2013. *Aronia melanocarpa* (chokeberry) polyphenol-rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. *Nutrition Research Journal*. 33(5):406-413;
- Kim E.K., Lee S.J., Jeon B.T., Moon S.H., Kim B., Park T.K., Han J.S. and Park P.J. 2009. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chemistry*. 114:365–1370;
- Kim W., Hurley W. L., Wu G. and Ji F. 2009. Ideal amino acid balance for sows during gestation and lactation. *Journal of Animal Science*. 87(14):123-132;
- Kim Y.J., Park W.Y. and Choi I.H. 2010 Effects of dietary α -tocopherol, selenium, and their different combinations on growth performance and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*. 89(3):603–608;
- King A.J., Griffin J.K. and Roslan F. 2014. In Vivo and in Vitro Addition of Dried Olive Extract in Poultry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62(31):7915-7919;
- Kohler G.A.K., Assefa S. and Reid G. 2012. Probiotic Interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 1-14;
- Kotsou M., Mari I., Lasaridi K., Chatzipavlidis I., Balis C. and Kyriacou, A. 2004. The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*. 26(2):113–12;
- Kwon O.S., Yoo J.S., Min B.J., Son K.S., Cho J.H., Kim H.J., Chen Y.J. and Kim I.H. 2005. Effect of supplemental medicinal plant (*Artemisia*, *Acanthopanax* and *Garlic*) on growth performance and serum characteristic in lactating sows, suckling and weanling pigs. *Journal of Animal Science and Technology*. 47(4):501-512;
- Lázaro R., Latorre M.A., Medel P., Gracia M. and Mateos G.G. 2004. Feeding regimen and enzyme supplementation to rye-based diets for broilers. *Poultry Science*. 83(2):152-160;

- Leouifoudi I., Harnafi H. and Ziad A. 2015. Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Advances in Pharmacological Science*. doi: 10.1155/2015/714138;
- Littarru G.P. and Tiano L. 2007. Bioenergetic and Antioxidant Properties of Coenzyme Q₁₀: Recent Developments. *Molecular Biotechnology*. 37(1):31–37;
- Liu M.J., Li J.X., Guo H.Z., Lee K.M., Qin L. and Chan K.M. 2003.. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. *Life Science*. 73(7):883-92;
- Lotito S.B. and Frei B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology Medicine*. 41(12):1727-46;
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5):727-47;
- Martinelli A. and Cabras P. 2004. *Chimica degli alimenti*. Piccinin-Nuova Libreria;
- Mateos R., Pereira-Caro G., Bacon J.R., Bongaerts R., Sarriá B., Bravo L. and Kroon P.A. 2013. Anticancer activity of olive oil hydroxytyrosyl acetate in human adenocarcinoma Caco-2 cells. *J Agriculture and Food Chemistry*. 61(13):3264-9;
- Medina E., De Castro A., Romero C. and Brenes M. 2006. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54(14):4954-4961;
- Medina I., Lois S., Alcántara D., Lucas R., and Morales J.C. 2009. Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57(20):9773-9779;
- Melegy T., Khaled N.F., El-Bana R. and Abdellatif H. 2010. Dietary fortification of a natural biosurfactant, lysolecithin in broiler. *African journal of agricultural research*. 5(21):2886-2892;
- Ministero della Salute, 2016. Parere n°15 sul rischio legato alla cancerogenicità delle carni rosse fresche e trasformate;
- Molina-Alcaide E. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 147(1-3):247–264;
- Molina-Alcaide E. and Yanez-Ruiz D.R. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 147:247–264;

- Moschandreas J., Vissers M.N., Wiseman S., van Putte K.P. and Kafatos A. 2002. Extra virgin olive oil phenols and markers of oxidation in Greek smokers: a randomized crossover study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56(10):1024–1029;
- Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C. and Vincieri F.F. 2001. Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(8):3509-3514;
- Mullertz A., Ogbonna A., Ren S. and Rades T. 2010. New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62(11):1622–1636;
- Musella M., Cannata S., Rossi R., Mourot J., Baldini P. and Corino C. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acid from extruded linseed influences the fatty acid composition and sensory characteristics of dry-cured ham from heavy pigs. *Journal of Animal Science*. 87(11):3578-3588;
- Nathaniel Mead M. 2007. *Nutrigenomics The Genome–Food Interface*. *Environmental Health Perspectives*. 115(12):A583-589;
- NRC Nutrient Requirements of Poultry. 1994. Ninth Revised Edition, Subcommittee on Poultry Nutrition Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture National Research Council National Academy Press. Washington. D.C;
- NRC Nutrient Requirements of Swine. 2012. National Research Council National Academy Press. Washington. D.C;
- O’Neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations the review on antimicrobial resistance. 1-84;
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K. and Stockmann R. 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53(4):823-7;
- OECD/FAO. 2016. *OECD FAO Agricultural Outlook 2016-2025*, OECD Publishing, Paris.. Disponibile al sito: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en;
- Omar S.H., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Science and Pharmacology*. 78(2):133-154;
- Paiva-Martins F., Fernandes J., Rocha S., Nascimento H., Vitorino R., Amado F., Borges F., Belo L. and Santos-Silva A. 2009. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Molecular Nutrition and Food Research*. 53(5):609-616;

- Paixao S.M. and Anselmo A.M. 2002. Effect of olive mill wastewaters on the oxygen consumption by activated sludge microorganisms: an acute toxicity test method. *Journal of Applied Toxicology*. 22(3):173–176;
- Paraskeva P. and Diamadopoulou E. 2006. Technologies for olivemill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81(9):1475e1485;
- Pariza M.W., Park Y. and Cook M.E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*. 40(4):283–298;
- Pasantes-Morales H. Quirox H. and Quesada O. 2002. Treatment with Taurine, Diltiazem, and Vitamin E Retards the Progressive Visual Field Reduction in Retinitis Pigmentosa: A 3-Year Follow-Up Study. *Metabolic Brain Disease*. 17(3):183–197;
- Patrick L. and Uzick M. 2001. Cardiovascular disease: C-reactive protein and the inflammatory disease paradigm: HMG-CoA reductase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature. *Alternative Medicine Reviews*. 6(3):248–271;
- Pereira J.A., Pereira A.P., Ferreira I.C., Valentão P., Andrade P B., Seabra R. and Bento A. 2006. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(22):8425-8431;
- Petty S. and Scully C. 2009. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*. 37(6):413-423;
- Piotrowska A., Rao M.A., Scotti R. and Gianfreda L. 2011. Changes in soil chemical and biochemical properties following amendment with crude and dephenolized olive mill wastewater (OMW). *Geoderma*. 161(1-2):8-17;
- Pitozzi V., Jacomelli M., Catelan D., Servili M., Taticchi A., Biggeri A., Dolara P. and Giovannelli L. 2012. Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation Research*. 15(6):601-612;
- Poli A. 2013. Mediterranean Diet and Cardiovascular Prevention: an interesting randomised and controlled trial. *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi* 2013; 4(2):3-7;
- Polviset W., Schonewille J.T., Everts H., Wachirapakorn C., Yuangklang C., Claeys E. and De Smet S. 2015. Effect of whole cottonseed v. sunflower seed on the fatty acid profile of subcutaneous fat, *longissimus dorsi* and blood of Thai Native and Holstein bulls. *Animal*. 9(12):2072-2080;
- Price K.L., Lin X., van Heugten E., Odle R., Willis G. and Odle J. 2013. Diet physical form, fatty acid chain length, and emulsification alter fat utilization and growth of newly weaned pigs. *Journal of Animal Science*. 91(2):783-792;

- Prisa D. 2016. Utilizzo di microrganismi benefici e di zeolititi per l'alimentazione e la difesa degli animali. 1:10;
- Proestos C., Sereli D. and Komaitis M. 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*. 95(1):44–52;
- Puel C., Mardon J., Agalias A., Davicco M.J., Lebecque P., Mazur A., Horcajada M.N., Skaltsounis A.L. and Coxam V. 2008. Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56(20):9417–9422;
- Purchas R.W., Rutherford S.M., Pearce P.D. Vather R. and Wilkinson B.H.P. 2004. Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine. *Meat Science*. 66:629–637;
- Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A. and Oksman-Caldentey K.M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90(4):494-507;
- Rabayaa E., Abo-omar J.M. and Othman R.A. 2001. Utilization of Olive Pulp in Broiler Rations. *An-Najah University Journal Resource*. 15:134-144;
- Raina B.L. 2003. Olives In: Caballero B., Trugo L.C, Finglas P.M., *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition-Second Edition*. 7: 4260-4262. Elsevier Science;
- Raiola A., Tenore G.C., Barone A., Frusciante L. and Rigano M.M. 2015. Vitamin E Content and Composition in Tomato Fruits: Beneficial Roles and Bio-Fortification. *International Journal of Molecular Science*.;16(12):29250-64;
- Ramassamy C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*. 545(1):51-64;
- Rauha J.P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kahkonen M., Kuyala T., Pihlaya K., Vuorela H. and Vuorela P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56(1):3-12;
- Reddy M.B., Hurrell R.F and Cook J.D. 2000. Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71(4):937-943;
- Reglodi D., Renaud J., Tamas A., Tizabi Y., Socías S., Del-Bel E. and Raisman-Vozari, 2015. Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotic, polyphenols and neuropeptides. *Progress in Neurobiology*. 155:120-148;

- REGOLAMENTO (CE) N. 767/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 13 luglio 2009 sull'immissione sul mercato e sull'uso dei mangimi, che modifica il regolamento (CE) n. 1831/2003 e che abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione;
- Riley F.R. 2002. Olive oil production on Bronze Age Crete: nutritional properties, processing methods, and storage life of Minoan olive oil. *Oxford Journal of Archaeology*. 21:63-75;
- Rinaldi M., Rana G. and Introna M. 2003. Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Field Crops Research*. 84(3):319–326;
- Roche H.M., 2006. Nutrigenomics-new approaches for human nutrition research. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(8):1156–1163;
- Rodis P.S., Karathanos V.T. and Mantzavinou A. 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50(3):596–601;
- Rodríguez G., Lama A., Rodríguez R., Jiménez A., Guillén R. and Fernández-Bolanos J. 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*. 99(13):5261-5269;
- Rohrmann S., Overvad K., Bueno-de-Mesquita B., Jakobsen M.U., Egeberg R., Tjønneland A., Nailler L., Boutron-Ruault M.C., Clavel-Chapelon F., Krogh V., Palli D., Panico S., Tumino R., Ricceri F., Bergmann M.M., Boeing H., Li K., Kaaks R., Khaw K.T., Wareham N.J., Crowe F.L., Key T.J., Naska A., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Leenders M., Peeters P.H.M., Engeset D., Parr C.L., Skeie G., Jakszyn P., Sánchez M.J., Huerta J.M., Redondo L, Barricarte A., Amiano P., Drake I., Sonestedt E., Hallmans G., Johansson I., Fedirko V., Romieux I., Ferrari P., Norat T., Vergnaud A.C., Riboli E. and Linseisen J. 2013. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*. 11:63;
- Rolfe R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*. 130:396S-402S;
- Romero C., Brenes M., García P. and Garrido A. 2002. Hydroxytyrosol 4-β-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(13):3835-3839;
- Rosato V., Tavani A., Negri E., Serraino D., Montella M., Decarli A., La Vecchia C. and Ferraroni M. 2017. Processed Meat and Colorectal Cancer Risk: A Pooled Analysis of Three Italian Case-Control Studies. *Nutrition and Cancer*. 69(5):732-738;

- Roy A., Haldar S., Mondal S. and Ghosh T.K. 2010. Effects of supplemental exogenous emulsifier on performance, nutrient metabolism, and serum lipid profile in broiler chickens. *Veterinary Medicine International*. 2010: 262604. doi:10.4061/2010/262604;
- Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.G. and Stanton C., 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients*. 3(9):765-791;
- Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H. and Kanazawa K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51(3):571-81;
- Salvini S., Sera F., Caruso D., Giovannelli L., Visioli F., Saieva C., Masala G., Ceroti M., Giovacchini V., Pitozzi V., Galli C., Romani A., Mulinacci N., Bortolomeazzi R., Dolara P. and Palli D. 2006. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*. 95(4):742–751;
- San Tan H., Zulkifli I., Soleimani Farjam A., Meng Goh Y., Croes E., Karmakar Partha S. and Kiat Tee A. 2016. Effect of exogenous emulsifier on growth performance, fat digestibility, apparent metabolisable energy in broiler chickens. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*. 4(1):7-10;
- Sanchez-Escalante A., Djenane D., Torrescano G., Beltran J.A. and Roncales P. 2001. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*. 58(4):421-429;
- Scalbert A. and Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. 130(8S):2073S-85S;
- Scheuermann G.N., Bilgili S.F., Hess J.B. and Mulvaney D.R. 2003. Breast Muscle Development In Commercial Broiler Chickens. *Poultry Science*. 82:1648–1658;
- Schmid A. 2009. Sostanze bioattive nella carne e nei prodotti a base di carne. *ALP science*. 529(10):23-24;
- Schrezenmeir J. and de Vrese M.M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2):361S-364S;
- Scollan N.D., Choi N.J., Kurt E., Fisher A.V., Enser M. and Wood J.D. 2001. Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *British Journal of Nutrition*. 85(1):115-124;
- Scollan N.D., Hocquette J.F., Nuernberg K., Dannenberger D., Richardson I. and Moloney A. 2006. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*. 74(1):17–33;

- Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G. and Morozzi G., 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of chromatography*. 1054(1-2):113-27;
- Séverin S. and Wenshui X. 2005. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45(7-8):645–656;
- Sgoifo Rossi C.A. 2016. La carne, alimento salubre ed essenziale. *Informatore zootecnico* n°4;
- Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D. and Corke H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 117(1):112-9;
- Shen Y., Wan H., Zhu J., Fang Z., Che L., Xu S., Lin Y., Li J. and Wu D. 2015. Fish Oil and Olive Oil Supplementation in Late Pregnancy and Lactation Differentially Affect Oxidative Stress and Inflammation in Sows and Piglets. *Lipids*. 50(7):647–658;
- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruanas R. and Garau M.A. 2001. Characterization and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *Science of Total Environment*. 279(1-3):207-214;
- Silva S., Gomes L., Leitão F., Coelho A. V. and Vilas Boas L. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*. 12:385-395;
- Simitzis P.E., Symeon G.K., Charismiadou M.A., Ayoutanti A.G. and Deligeorgis S.G. 2011. The effects of dietary hesperidin supplementation on broiler performance and chicken meat characteristics. *Canadian Journal of Animal Science*. 91(2):275–282;
- Sklan D. and Noy Y. Hydrolysis and Absorption in the Small Intestines of Posthatch Chicks. *Poultry Science*. 79(1):1306–1310;
- Smet K., Raes K., Huyghebaert G., Haak L., Arnouts S. and De Smet S. 2008. Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. *Poultry Science*. 87(8):1682-8;
- Soares M. and Lopez-Bote C.J. 2002. Effects of dietary lecithin and fat unsaturation on nutrient utilisation in weaned piglets. *Animal feed science and technology*. 95(3):169-177;
- Società Italiana di Nutrizione Umana-SINU, 2014. LARN - Livelli di assunzione di riferimento per la popolazione italiana: PROTEINE;
- Sorli-Aguilar M., Martin-Luján F., Santigosa-Ayala A., Pinol-Moreno J.L., Flores-Mateo G., Basora-Gallisa J., Arija-Val V. and Solà-Alberich R. 2015. Effects of Mediterranean diet on

- lung function in smokers: a randomized, parallel and controlled protocol. *BioMed Central Public Health*. 15:74;
- Spinosa M.R., Braccini T., Ricca E., De Felice M., Morelli L., Pozzi G. and Oggioni M.R. 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research in Microbiology*. 151(5):361-368;
- Sreeramulu D. and Raghunat M. 2011. Antioxidant and Phenolic Content of Nuts, Oil Seeds, Milk and Milk Products Commonly Consumed in India. *Food and Nutrition Sciences*. 2(5):422-427;
- Steinfeld H., Gerber P., Wassenaar T., Castel. V, Rosales M. and de Haan C. 2006. Livestock's long shadow. *Environmental issues and options*. FAO;
- Stojanovic J., Giraldi L., Arzani D., Pastorino R., Biondi A., Persiani R., Boccia S. and Leoncini E. 2017. Adherence to Mediterranean diet and risk of gastric cancer: results of a case-control study in Italy. *European Journal of Cancer Prevention*. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000371;
- Surai P. and Fisinin V.I. 2010. Ill Health effects of food lipids: Consequences of inadequate food processing, storage and cooking. In *Modern dietary fat intakes in disease promotion*. Humana Press. 251-274;
- Surai P.F. 2002. *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham: Nottingham University Press. 5-9;
- Swanson B.G. 2003. Tannins and Polyphenols In: Caballero B., Trugo L.C, Finglas P.M., *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition-Second Edition*. 9:5729-5733. Elsevier Science;
- Talhaoui N., Gómez-Caravaca A.M., León L., De la Rosa R., Fernández-Gutiérrez A. and Segura-Carretero A. 2015. Pattern of Variation of Fruit Traits and Phenol Content in Olive Fruits from Six Different Cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 63(48):10466-76;
- Tang S.Z., Kerry J.P., Sheehan D., Buckley D.J. and Morrissey P.A. 2000. Dietary tea catechins and iron-induced lipid oxidation in chicken meat, liver and heart. *Meat Science*. 56(3):285-90;
- Tangney C.C. and Rasmussen H.E. 2013. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis and Reproduction*. 15(5):324;
- Taranto M.P., Medici M. and Perdigon G. 2000. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *Journal of Dairy Science*. 83(3):401-3;
- Terramoccia S., Bartocci S., Taticchi A., Di Giovanni S., Pauselli M., Mourvaki E., Urbani S. and Servili M. 2013. Use of Dried Stoned Olive Pomace in the Feeding of Lactating Buffaloes:

- Effect on the Quantity and Quality of the Milk Produced. *Asian Australian Journal of Animal Science*. 26(7):971-980;
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. and Hawkins Bryne D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19:669–675;
- Timmerman H.M., Mulder L., Everts H., van Espen D.C., der Wal E., Klaassen G., Rouwers S.M.G., Hartemink R., Rombouts F.M. and Beynen A.C. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science*. 88(6):2154-2165;
- Timmerman H.M., Veldman A., van den Elsen E., Rombouts F.M. and Beynen A.C. 2006. Mortality and Growth Performance of Broilers Given Drinking Water Supplemented with Chicken-Specific Probiotics. *Poultry Science*. 85(8):1383–1388;
- Tiziani A. 2006. *Harvard's Nursing Guide to Drugs*. Elsevier Australia; Sydney, Australia;
- Toledo E., Salas-Salvadò J., Donat-Vargas C., Buil-Cosiales P., Estruch R., Ros E., Corella D., Fitò M., Hu F.B., Aròs F., Gòmez-Garcia E., Romaguera D., Ortega-Calvo M., Serra-Majem L., Pintò X., Schroder H., Basora J., Sorli J.V., Bullò M., Serra-Mir M. and Martínez-González M.A. 2015. Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial. *Journal of American Medical Association*. 175(11):1752-1760;
- Tosi M.V., Canali E., Mattiello S., Ferrante V., Carenzi C and Verga M. 2003. Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento. Ed. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche. 1-76;
- UNAVICOLTURA. 2005. Disponibile al sito: <http://www.unavicoltura.it/archivio.asp>;
- Urquiaga I. and Leighton F. 2005. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*. 33(2):55-64;
- Valceschini E. 2006. Poultry meat trends and consumer attitudes. *World's Poultry Science Journal*. 62:81-82;
- Van der Heijden M. and de Haan D. 2010. Optimizing moisture while maintaining feed quality. *All About Feed*. 1:29-31;
- Van Krimpen M. 2012. New alternative protein sources: their potential contribution. *International symposium on European protein position*;
- Vermeirssen V., Camp J.V. and Verstraete W. 2009. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*. 92(3):357–366;

- Vertuani S., Manfredini S. and Braccioli G. 2001. Probiotici e Prebiotici: Impieghi attuali e prospettive future. *Integratore Nutrizionale*. 4:26-32;
- Vissers M.N., Zock P.L., Wiseman S.A., Meyboom S. and Katan M.B. 2001. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 55(5):334–341;
- Waladkhani A.R. and Clemens M.R. 2001. Effect of dietary phytochemicals on cancer development. In: *Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion*. Edited by Ronald R. Watson CRC Press;
- Wang J.P., Zhang Z.F., Yan L. and Kim I.H. 2016. Effects of dietary supplementation of emulsifier and carbohydrase on the growth performance, serum cholesterol and breast meat fatty acid profile of broiler chickens. *Animal Science Journal*. 87(2):250-256;
- Wang X.H., Liu F.Z., Niu Z.Y., Gao Y.P., Zhang Y.F., Gao Y.H., Shen H., Wang A.Y. and Yang Z.J. 2011 Influence of vitamin E on antioxidative activity and meat oxidation stability of broilers. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*. 20:1–7;
- Willenberg I., Meschede A.K., Gueler F., Jang M., Shushakova N. and Schebb N.H. 2015. Food Polyphenols Fail to Cause a Biologically Relevant Reduction of COX-2 Activity. *PLoS One*. 10:10;
- Willnow T.E. 1999. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *Journal of Molecular Medicine*. 77(3):306-315;
- Windisch W., Schedle K., Plitzner C. and Kroismayr A. 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*. 86(14):140-8;
- Xing J.J., van Heugten E., Lit D.F., Touchette K.J., Coalson J.A., Odgaard R.L. and Odle J. 2004. Effects of emulsification, fat encapsulation, and pelleting on weanling pig performance and nutrient digestibility. *Journal of Animal Science*. 82(9):2601-2609;
- Yamada K., Ogawa H., Hara A., Yoshida Y., Yonezawa Y., Karibe K., Nghia V.B., Yoshimura H., Yamamoto Y., Yamada M., Nakamura K. and Imai K. 2009. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research*. 83(1):35-44;
- Yangui T., Sayadi S., Rhouma A. and Dhouib A. 2010. Potential use of hydroxytyrosol-rich extract from olive mill wastewater as a biological fungicide against *Botrytis cinerea* in tomato. *Journal of Pest Science*. 83(4):437–445;
- Zamora R., Alaiz M. and Hidalgo F.J. 2001. Influence of Cultivar and Fruit Ripening on Olive. *Chemistry*. 49(9):4267-70;

- Zhang B., Haitao L., Zhao D., Guo Y. and Barri A. 2011. Effect of fat type and lysophosphatidylcholine addition to broiler diets on performance, apparent digestibility of fatty acids, and apparent metabolizable energy content. *Animal Feed Science and Technology*. 163(2):177-184;
- Zhu X., Zhang H. and Lo R. 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52(24):7272-7278;
- Zuidhof M.J., Schneider B.L., Carney V.L., Korver D.R. and Robinson F.E. 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science*. 93(12):2970–2982;
- Zulkifli I., Abdullah N., Mohd.Azrin N. and Ho Y.O. 2000. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under stress conditions. *British Poultry Science*. 41(5):593-597.

Ringraziamenti

Il più grande Grazie lo devo dire alla mia famiglia che da sempre crede in me, mi appoggia e trova sempre il tempo per aiutarmi. Grazie per tutto quello che avete fatto e che fate ogni giorno per me. Vi voglio bene.

Sentiti ringraziamenti vanno al Professor Dell'Orto, alla Professoressa Baldi e al Professor Pinotti per avermi permesso di affrontare questo percorso e per avermi assistito con professionalità e disponibilità.

Ringrazio inoltre il Professor Bontempo e la Dottoressa Rossi per avermi coinvolti nei loro progetti, facendomi tornare sul campo e consentendo l'utilizzo dei dati raccolti per la scrittura del presente lavoro.

Grazie anche a Raffaella, Carlotta, Valentina, Matteo, Marco, Andrea, Antonio, Sara, Federica, Diego, Monika e tutti gli altri colleghi di Trentacoste per avermi accolto nel loro gruppo, coinvolto nei loro lavori, aiutato durante lo svolgimento delle analisi e in ogni momento in cui mi trovavo in difficoltà.

Ringrazio tutte le persone che ho conosciuto in questi anni, professori, collaborati e studenti che mi hanno trasmesso qualcosa e mi hanno fatto crescere.

Infine voglio ringraziare gli amici, vicini e lontani, nuovi e vecchi, che mi sostengono e mi incoraggiano. In particolare voglio ringraziare Marco per essere da sempre al mio fianco. Sei la mia certezza. Grazie di tutto.