

PhD thesis

Dottorato di Ricerca in

“Scienze delle Produzioni Animali”

Università degli Studi di Catania

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni Animali

**TRACCIABILITÀ DEL SISTEMA DI ALIMENTAZIONE
IN AGNELLI DA CARNE: IMPIEGO DI ISOTOPI**

Maria Giuseppina D'Urso

Tutor: Prof.ssa Luisa Biondi

Coordinatore: Prof.ssa Marcella Avondo

Anno Accademico 2007-2010

SOMMARIO

Prefazione	7
<i>Capitolo 1</i>	
Tracciabilità: Approccio normativo	10
<i>Capitolo 2</i>	
Tracciabilità: Approccio scientifico	17
2.1. Metodiche analitiche	18
2.2. Marcatori utili al riconoscimento dell'autenticità dei prodotti alimentari	20
2.3. Considerazioni	38
<i>Capitolo 3</i>	
Isotopi stabili	39
3.1. Isotopi stabili nella ricerca scientifica e nelle produzioni animali	41
3.2. Rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$)	43
3.3. Rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ($\delta^{18}\text{O}$)	51
3.4. Rapporto isotopico $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$)	56
3.5. Rapporto isotopico $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ($\delta^{34}\text{S}$)	61
<i>Capitolo 4</i>	
Obiettivi del lavoro	63
<i>Capitolo 5</i>	
Materiali e metodi	65
5.1. Animali ed alimentazione sperimentali	65
5.2. Campionamento e tecniche di conservazione	68
5.3. Metodiche analitiche	69
5.3.1. Descrizione tecnica degli strumenti utilizzati e dei principi di funzionamento.	71
5.3.2. Pesata e incapsulamento del campione	83
5.3.3. Analisi strumentale	83
5.4. Elaborazione statistica	86
<i>Capitolo 6</i>	
Risultati e discussioni	87
6.1. Obiettivo tracciabilità	87
6.2. Obiettivo cinetica di variazione dei SIR conseguente alla variazione di alimentazione	101

Capitolo 7

Conclusioni	107
Ringraziamenti	110
Bibliografia	111

ELENCO DELLE TABELLE

<i>Tab. 1.</i>	Regolamenti Europei finalizzati alla tutela di prodotti alimentari	12
<i>Tab. 2.</i>	Sistema obbligatorio e facoltativo di etichettatura della carne bovina	16
<i>Tab. 3.</i>	Composizione acidica di differenti foraggi	28
<i>Tab. 4.</i>	Accumulo di scatolo e indolo nei tessuti animali	33
<i>Tab. 5.</i>	Abbondanza naturale media di alcuni isotopi stabili e rispettivi standard di riferimento internazionale	40
<i>Tab. 6.</i>	Frazionamento isotopico e reazione enzimatica	43
<i>Tab. 7.</i>	Valori medi ($\delta^{13}\text{C}$) di composizione isotopica nella dieta	46
<i>Tab. 8.</i>	Valori medi di $\delta^{13}\text{C}$ (‰) nelle diete e nel latte	48
<i>Tab. 9.</i>	Valori medi di $\delta^{13}\text{C}$ (‰) nella carne in funzione della dieta	50
<i>Tab. 10.</i>	Processi del ciclo dell'azoto che determinano frazionamento isotopico	57
<i>Tab. 11.</i>	Valori medi di ^{15}N (‰) nelle diete e nel latte	59
<i>Tab. 12.</i>	Valori medi di ^{15}N (‰) nella carne in funzione della dieta	61
<i>Tab. 13.</i>	Schema giorni di dieta alimentare	67
<i>Tab. 14.</i>	Schema dei giorni di prelievo sangue per gli animali del gruppo P-S14	68
<i>Tab. 15.</i>	Parametri da impostare prima dell'analisi nell'IRMS	84
<i>Tab. 16.</i>	Standard di riferimento, standard primari e secondari delle varie specie isotopiche	85
<i>Tab. 17.</i>	Rapporto isotopico di C, N, O, H e S (‰) per gli alimenti	87
<i>Tab. 18.</i>	Valori del rapporto isotopico di $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ del sangue nella dieta e nei tessuti	89
<i>Tab. 19.</i>	Misure dei rapporti isotopici stabili nella carne e nel grasso	94
<i>Tab. 20.</i>	Effetti principali del tipo di tessuto (eritrocita vs plasma) e del giorno di alimentazione in stalla (0, 1, 3, 6, 13 d) sui valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$	101

ELENCO DELLE ILLUSTRAZIONI

<i>Fig. 1.</i>	Spettro di riflettanza del grasso perirenale di agnelli	24
<i>Fig. 2.</i>	Regressione lineare tra: il tempo che gli animali hanno passato in stalla e il logaritmo del 2,3-octanedione, nel grasso caudale di pecore	30
<i>Fig. 3.</i>	Concentrazione di scatolo nel grasso perirenale di animali alimentati con una dieta pascolo vs concentrato	34
<i>Fig. 4.</i>	Variazione di concentrazione di alcuni lettoni (δ -tetradecalactone, δ -hexadecalactone e δ -dodecalactone)	35
<i>Fig. 5.</i>	Ciclo fotosintetico delle piante C3 e C4	45
<i>Fig. 6.</i>	Frazionamento isotopico in funzione della T	53
<i>Fig. 7.</i>	Andamento del rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$ in animali alimentati con mangime convenzionale e mangime organico	60
<i>Fig. 8.</i>	Liofilizzatore Hetosicc Laboratory Type CD 52-1	72
<i>Fig. 9.</i>	Analizzatore elementare interfacciato con uno spettrometro di massa	73
<i>Fig. 10.</i>	Sorgente ionica	77
<i>Fig. 11.</i>	Schema di funzionamento separatore delle masse nello spettrometro	78
<i>Fig. 12.</i>	Schema dei tre collettori del SIRA serie II	79
<i>Fig. 13.</i>	Pirolizzatore e colonna di pirolisi	80
<i>Fig. 14.</i>	Equilibratore Isoprep 18	81
<i>Fig. 15.</i>	Rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ misurato in plasma e eritrociti in funzione della dieta	90
<i>Fig. 16.</i>	$\delta^{15}\text{N}$ misurato in plasma ed eritrociti in funzione della dieta	92
<i>Fig. 17.</i>	Rapporto isotopico del carbonio e dell'azoto nella carne sgrassata	95
<i>Fig. 18.</i>	Andamento di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ negli eritrociti (RBC, barre bianche) e nel plasma (PL, barre nere) in agnelli sottoposti a cambio di alimentazione da pascolo (giorno 0) a concentrato (giorni da 1 a 13). Le lettere diverse indicano diversità statistica nei valori medi.	104
<i>Fig. 19.</i>	Andamento di $\delta^{18}\text{O}$ negli eritrociti di agnelli sottoposti a cambio di alimentazione da pascolo (giorno 0) a concentrato (giorni da 1 a 13). Le lettere diverse indicano diversità statistica nei valori medi.	106

A chi mi dona parole di conforto nei momenti difficili
A chi crede in me ed è custode e testimone delle mie emozioni
A chi da sempre e per sempre sa amarmi...
la mia Famiglia

Prefazione

Negli ultimi anni il settore zootecnico è stato il protagonista di notevoli progressi. Nei ruminanti, pur non essendo l'unica fonte di alimentazione, le produzioni intensive (cioè quelle in cui il rapporto tra foraggi e concentrati tende a favorire i secondi) sono quelle che coprono la maggior quota di produzione, ma è anche vero che negli ultimi anni si stanno rivalutando sempre più i sistemi estensivi, biologici ed ecocompatibili, per i benefici effetti su benessere animale, qualità dei prodotti ed impatto ambientale. Queste innovazioni di contro hanno creato non pochi disagi tra il mondo produttivo e il consumatore, rendendolo sempre più esigente nella ricerca dei prodotti alimentari. A tal proposito, le associazioni di settore e le istituzioni nazionali ed internazionali finalizzate alla tutela del consumatore, hanno messo a punto sia diverse metodiche analitiche, aventi lo scopo di discriminare l'origine di un prodotto e sia strumenti utili al riconoscimento dell'autenticità dei prodotti alimentari in funzione della loro origine geografica o del sistema di produzione. Quanto detto finora, garantisce una maggiore sicurezza d'acquisto sui prodotti d'origine animale da parte del consumatore attento.

Il rapporto isotopico stabile (SIR, Stable Isotope Ratio), icona dei marker fisici, assieme ad altri strumenti (marker diretti, marker indiretti e marker con tecniche spettroscopiche) rappresenta un mezzo attendibile e di notevoli riscontri applicativi nel settore delle produzioni animali. I SIR possono essere utilizzati sia per certificare prodotti a base di carne o prodotti lattiero-caseari al fine di proteggerli dai prodotti fraudolenti e sia per garantire l'autenticità dei prodotti d'origine (DOP, IGP, etc...). In più, nell'ambito scientifico, valutare il rapporto isotopico stabile consente di ricostruire la storia alimentare dell'animale avvalendosi solo di alcuni tessuti animali come vello,

zoccoli, ossa, sangue etc..., senza quindi, sottoporre l'animale allo stress della macellazione.

Per ragioni climatiche, nelle aree del Mediterraneo, un fattore limitante dei sistemi di produzione animale è la scarsa disponibilità di pascolo fresco; di conseguenza gli animali alimentati al pascolo sono spesso finiti in stalla (finissaggio) con concentrati. In particolare nel caso dei piccoli ruminanti, orzo e semi di leguminose sono i mangimi più comunemente utilizzati. Il periodo di finissaggio può essere più o meno lungo a seconda delle diverse esigenze di allevamento. Tracciare il periodo di finissaggio è estremamente interessante ai fini della certificazione del sistema di alimentazione degli animali.

Durante i tre anni del mio Dottorato ho scelto di affrontare uno studio sperimentale di tracciabilità del sistema di alimentazione in agnelli da carne con l'ausilio di marker fisici (isotopi). Alla luce delle suddette premesse, lo scopo del presente lavoro di tesi sperimentale è stato quello di verificare se l'analisi isotopica stabile possa essere utilizzata come mezzo per tracciare i cambiamenti della dieta direttamente nel prodotto commerciale.

Catania, Dicembre 2010

Maria G. D'Urso

TRACCIABILITÀ: APPROCCIO NORMATIVO

A seguito della crescente globalizzazione del mercato (area di libero scambio ed entrata di nuovi competitors), all'internazionalizzazione delle imprese, all'efficienza dei mezzi di trasporto e alle nuove tecniche alimentari cambiano le abitudini socio-culturali ed alimentari dei consumatori. Oggi il mercato fornisce l'opportunità di trovare in ogni periodo dell'anno qualsiasi tipo di prodotto alimentare. Nei Paesi con condizioni climatiche, sociali ed economiche svantaggiose la presenza di derrate alimentari è favorita dall'importazione delle stesse da qualsiasi area del mondo. Questo vantaggio però, è controbilanciato dall'incalzante espansione di malattie del bestiame (Afta epizootica, Influenza Aviaria, Blu Tongue, etc...) e di parassiti sui prodotti alimentari. Tuttavia, anche a seguito di recenti scandali alimentari come presenza di antibiotici negli alimenti, contaminazioni di prosciutti e pollame con Diossina, BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy o comunemente detta "mucca pazza"), adulterazione di vino o succhi di frutta, aggiunta di sostanze non autorizzate o non dichiarate in etichetta, etc..., i consumatori sono indotti a ricercare prodotti alimentari genuini ed ottenuti secondo sistemi che rispettino l'ambiente, il benessere degli animali ed inoltre garantiscano la qualità del prodotto da un punto di vista sensoriale, nutrizionale e della sicurezza igienica.

Da una indagine condotta in Svizzera dall'Ufficio Federale della Sanità Pubblica si è evidenziato che la conoscenza dell'origine degli alimenti incide per l'82% sull'importanza della decisione d'acquisto del consumatore; per l'acquisto della carne, in particolare, conoscere l'origine di provenienza incide per il 71%. Per esempio, in

Svizzera oltre la metà delle carni avicole era importata, ma a causa dell'incessante diffusione epidemica dell'influenza aviaria, nel Gennaio 2004, è stata vietata l'importazione di carne avicola da altri paesi (Franke et al., 2005). Inoltre, negli ultimi anni i sequestri effettuati dai N.A.S. (Nucleo Anti Sostituzioni) sono aumentati del 7%. Alla luce di quanto detto, oggi il consumatore pone maggiore attenzione verso il prodotto fresco, il prodotto tipico locale e quello ottenuto mediante sistemi di produzione biologici più rispettosi del benessere dell'animale e dell'ambiente. Nasce quindi l'esigenza da parte delle istituzioni di tutelare il consumatore attraverso l'aggiornamento delle normative e delle regolamentazioni relative al settore agro-alimentare. Oggi, a fronte di quanto detto, l'alimento che maggiormente è nel mirino delle tecniche di tracciabilità è quello della carne bovina. In ambito zootecnico e relativamente al prodotto carne si è avuta la necessità di dettagliare le procedure da seguire per effettuare la tracciabilità consentendo così di risalire dalla confezione finale del prodotto all'animale, quindi tracciare e rintracciare la sua storia. Tra le strategie adottate dall'UE, vanno ricordate l'indicazione dell'origine geografica ed il concetto di tracciabilità e rintracciabilità del prodotto alimentare.

In tabella 1 si riportano alcuni Regolamenti Europei per la tutela dei prodotti alimentari.

Tabella 1. *Regolamenti Europei finalizzati alla tutela di prodotti alimentari*

Regolamento Europeo	Destinazione
Reg. CE n. 1760/2000	<i>istituisce un sistema di identificazione e di registrazione dei bovini relativo all'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine e abroga il regolamento (CE) n. 820/97 del Consiglio.</i>
Reg. CE n. 2065/2001	<i>stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.</i>
Reg. CE n. 178/2002	<i>stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, valido per tutti gli alimenti e mangimi.</i>
Reg. CE n. 1830/2003	<i>concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE.</i>
Decreto MIPAAF n. 179/2003	<i>disciplina del sistema di rintracciabilità del latte al fine di assicurare la più ampia tutela degli interessi del consumatore.</i>
D.L.P.R n. 267/2003	<i>attuazione delle direttive 1999/74/CE e 2002/4/CE, per la protezione delle galline ovaiole e la registrazione dei relativi stabilimenti di allevamento.</i>
Reg. CE n. 509/2006	<i>protegge il consumatore attraverso un sistema di controllo efficace ed imparziale che definisce, all'interno del mercato comune, la salvaguardia della denominazione di origine protetta (DOP). La sigla DOP è un termine utilizzato per descrivere i prodotti alimentari con una forte identità regionale, trasformati e preparati in una specifica area geografica rispettando un disciplinare di produzione unico per quella regione.</i>

Il concetto di tracciabilità è stato coniato nel 1986 ed inizialmente era obbligatorio solo per identificare i prodotti di nicchia del mercato (Reg. CE 510/2006 “Le denominazioni comunitarie” DOP, IGP). Successivamente si assiste ad un nuovo approccio delle politiche comunitarie passando dal Libro Verde, proposto dall'Unione Europea nel 1997, al Libro Bianco che nasce nel 2000 a seguito del trattato di Amsterdam (1999). Con l'avvento del Libro Bianco si assiste ad una nuova strategia

ispirata all'esigenza di garantire un elevato livello di sicurezza alimentare attraverso:

- lo sviluppo di un quadro normativo che tutela l'insieme della filiera produttiva *“dai campi alla tavola”* secondo un approccio globale e integrato;
- l'istituzione di una Autorità alimentare Europea indipendente;
- l'adozione di misure per migliorare e rendere coerente il corpus della legislazione concernente tutti gli aspetti dei prodotti alimentari *“dai campi alla tavola”*.

Nonostante quanto sostenuto dall'Unione Europea nel 2000 e nonostante quanto sostenuto oggi dalla politica delle aziende agricole, la quale associa al concetto di tracciabilità il sinonimo di garanzia e sicurezza alimentare, il concetto di tracciabilità di per se non garantisce la sicurezza di un prodotto alimentare. Pertanto si può affermare che, il concetto di tracciabilità si fa garante dell'equità degli scambi tra soggetti operanti all'interno di segmenti diversi della filiera e dell'affidabilità delle informazioni fornite al consumatore. In tal senso i sistemi e le procedure di tracciabilità hanno l'obbligo di massimizzare l'efficienza e la celerità di ritiro e richiamo dei prodotti non conformi, evitando allarmismi ingiustificati nel mercato e tra i consumatori.

Nel 2002 si assiste al passaggio dal Libro Bianco al nuovo Regolamento Comunitario 178/2002. Esso impone un'importante e innovativa svolta nel quadro giuridico in quanto: stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA *“European Food Safety Authority”*), fissa le procedure nel campo della sicurezza alimentare e inoltre, individua nei singoli operatori alimentari i diretti responsabili della conformità dei prodotti agro-alimentari.

L'articolo 18 del Regolamento Europeo 178/2002, accanto al concetto di tracciabilità conia un nuovo concetto: *rintracciabilità* dei prodotti alimentari. Anche se spesso i termini *tracciabilità* e *rintracciabilità* sono usati impropriamente con lo stesso significato possiamo indicare una sostanziale differenza. Con il termine *tracciabilità* (*tracking*) si intende la disponibilità immediata di ottenere determinate informazioni della filiera alimentare sino al consumatore finale. Con il termine *rintracciabilità* (*tracing*) si intende la capacità di ricostruire la storia di una identità (prodotto, ingrediente, imballaggio, etc...) attraverso un sistema di identificazione e registrazione lungo tutta la filiera produttiva.

La norma ISO 8402 definisce il concetto di tracciabilità in due modi: tracciabilità riferita all'origine del prodotto, detta tracciabilità di prodotto; tracciabilità riferita ai mezzi di produzione, detta tracciabilità di processo. Nel settore zootecnico, ad esempio, con il termine tracciabilità di prodotto intendiamo rappresentare le categorie di prodotti tipici che possono fregiarsi dei marchi di qualità (DOP, IGP, ecc.). La tracciabilità di prodotto è legata alla necessità di diversificare le produzioni agroalimentari, per conseguire un migliore equilibrio tra offerta e domanda sul mercato. Nella tutela di un alimento tipico rivestono una grande importanza i concetti di tracciabilità ed autenticità, intesi come processi di identificazione che seguono l'alimento durante tutte le fasi della sua produzione: per esempio informazioni sull'origine delle materie prime, sul luogo di produzione, sulle tecniche di trasformazione fino all'ottenimento del prodotto finito e sull'origine di un animale, quindi, considerare la razza e l'origine geografica, in modo da poter attribuire al prodotto l'etichetta di qualità e la denominazione di origine (DOP).

Con il termine tracciabilità di processo intendiamo garantire ai consumatori il controllo

relativo alla provenienza della dieta dell'animale, al processo di produzione, trasformazione, conservazione e distribuzione dello stesso prodotto alimentare. Tutto ciò grazie all'impegno coordinato di più organizzazioni che hanno come obiettivo comune la salvaguardia dell'integrità del prodotto.

Solitamente parlando di tracciabilità si fa riferimento ad una tracciabilità cartacea esplicitata attraverso l'uso di protocolli ufficiali e certificati secondo standard internazionali, i quali rappresentano gli strumenti tecnici concepiti per facilitare il rispetto di specifiche normative o di requisiti definiti. Questi standard hanno lo scopo di documentare la storia o la provenienza di un prodotto o delle sue componenti principali, sia all'interno di una singola azienda sia lungo l'intera filiera agroalimentare. La certificazione di rintracciabilità della filiera agroalimentare permette di identificare e tenere traccia di ogni aspetto dell'attività degli operatori coinvolti nel processo, a partire dall'azienda agricola per concludersi sulla tavola dei consumatori, al fine di identificare eventuali errori di etichettatura o di processo produttivo.

Nell'ambito zootecnico il bestiame è sottoposto a rigidi controlli in vivo e post-mortem; i controlli in vivo si basano sull'apposizione di alcuni elementi di riconoscimento negli animali e su registrazioni degli stessi nei registri aziendali. Tra gli elementi di riconoscimento ne ricordiamo alcuni: Marca auricolare (codice numerico di tre cifre detto codice ISTAT riferito alla zona di produzione ed un codice a nove cifre identificativo dell'animale e dell'azienda); Cedola identificativa (si compila in stalla e presenta: data di nascita o provenienza dell'animale); Passaporto (rilasciato dal servizio veterinario delle ASL, indica tutti i passaggi dell'animale dalla nascita al macello) (Reg. CE 1760/2000). In aggiunta, dopo la macellazione è di fondamentale importanza dover garantire la correlazione tra la carne e l'animale vivo e tra la carne e il produttore,

tramite controlli effettuati post-mortem (Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 30/Agosto/2000 recante “Indicazioni e modalità applicative del regolamento (CE) n. 1760/2000 sull'etichettatura obbligatoria e su quella facoltativa delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine”). Il Regolamento è entrato in vigore il 14 agosto 2000, prevedendo che già dal primo gennaio 2002 le carni bovine provenienti da animali macellati nella stessa data siano immesse al consumo corredate di etichetta contenente le seguenti informazioni obbligatorie e facoltative indicate in tabella 2.

Tabella 2. *Sistema obbligatorio e facoltativo di etichettatura della carne bovina*

ETICHETTATURA CARNE BOVINA	
<i>Obbligatorio</i>	<i>Facoltativo</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Modalità e termini minimi di conservazione • Quantità netta • Sede di confezionamento del prodotto; • Paese di nascita, Paese di ingrasso, Paese in cui è situato il macello: l'indicazione deve recare la dicitura “Macellato in (nome dello Stato membro o del Paese terzo e numero di approvazione)” • Numero di approvazione del macello presso il quale sono stati macellati l'animale o il gruppo di animali o laboratorio • Numero o codice di riferimento, evidenzia il nesso tra la carne e l'animale; il numero può essere il codice di identificazione del singolo animale da cui provengono le carni o il numero di identificazione di un gruppo di animali 	<ul style="list-style-type: none"> • Iscrizione dell'operatore al registro delle imprese C.C.I.A.A. • Requisiti tecnici dell'operatore Disciplinare operativo approvato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali

Fonte: *Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 30/Agosto/2000*

TRACCIABILITÀ: APPROCCIO SCIENTIFICO

Negli ultimi venti anni è notevole l'attenzione posta dal mondo della ricerca in riferimento alle strategie poste alla valorizzazione del concetto di tracciabilità attraverso strumenti analitici che la certificano. La tracciabilità analitica, supportata dal mondo scientifico, identifica la qualità e l'autenticità del prodotto e del processo, limita le frodi alimentari, agevola il lavoro degli organismi di certificazione ed inoltre, garantisce la continuità delle informazioni anche dopo la morte dell'animale. L'insieme di questi elementi conferisce un valore aggiunto al prodotto e giustifica il prezzo di mercato più elevato, così come accade per i prodotti di specialità tradizionale (DOP, IGP etc...). La tracciabilità di prodotto è un ottimo strumento per garantire il processo di produzione del prodotto alimentare e per garantire la localizzazione geografica dei prodotti di origine.

Il mondo scientifico, tuttavia, conferisce al termine tracciabilità (*traceability*) anche un altro significato: mira cioè a risalire al genotipo (*genetic traceability*), all'area geografica di produzione (*geographic traceability*) od al sistema di alimentazione (*feeding system traceability*) ricercando opportuni marcatori direttamente nei prodotti, carne, latte o formaggi.

Focalizzando l'attenzione sul sistema di alimentazione, la ricerca scientifica ha identificato essenzialmente marcatori molecolari diretti (molecole che vengono trasferite dagli alimenti di cui gli animali si nutrono al prodotto), marcatori molecolari indiretti (molecole si trovano nei prodotti e che derivano dal metabolismo di composti presenti negli alimenti ingeriti) e marcatori fisici (rapporti isotopici degli elementi

chimici). Oltre a questi, esistono anche marcatori rilevabili con tecniche spettroscopiche (Prache et al., 2005). Dopo un breve esame delle tecniche analitiche disponibili per individuare e quantificare i diversi marcatori, si fa una breve rassegna dei principali lavori disponibili in letteratura sulle diverse categorie di marcatori del sistema di alimentazione.

Sulla base di queste affermazioni si accentra l'attenzione posta dal mondo della ricerca sul progredire del concetto di tracciabilità, il quale si può delineare come un ottimo strumento di valorizzazione e tutela per le diverse parti sociali coinvolte dal processo di produzione e consumo degli alimenti.

2.1. Metodiche analitiche

I metodi analitici devono essere efficienti, ripetibili, affidabili e sostenibili in termini economici. In particolare, allo scopo di discriminare l'origine di un prodotto, tali metodiche dovrebbero essere in grado di determinare più componenti allo stesso tempo. Se tali componenti hanno sufficiente potere discriminante, il profilo della loro concentrazione nel prodotto definisce una specifica "impronta digitale" correlabile con l'origine geografica del prodotto o con il sistema di produzione che lo ha generato (Luykx et al., 2008 citato da Biondi et al., 2010).

Maggiore è il numero di componenti identificati dalla tecnica analitica e maggiori saranno le capacità discriminanti.

Gli approcci analitici utilizzabili possono essere distinti in quattro tipologie: tecniche di spettrometria di massa, tecniche spettroscopiche e tecniche di separazione.

Di seguito vengono ricordate le caratteristiche principali dei metodi maggiormente utilizzati nell'ambito delle tipologie su citate (Luykx et al., 2008 citato da Biondi et al., 2010).

Tecnica di spettrometria di massa

Questa tecnica misura il rapporto massa/carica degli ioni che si originano da un campione e dalla loro successiva separazione in funzione della loro massa molecolare. La spettrometria di massa può anche essere accoppiata ad altre tecniche ad esempio tecniche gas-cromatografiche (Biondi et al., 2010). Inoltre, Vasta e coautori (2007), mediante tecniche di spettrometria di massa (GC/MS), hanno studiato i composti volatili della carne.

Nell'ambito della tracciabilità dei prodotti, le tecniche più utilizzate sono:

IR-MS (<i>Isotope ratio mass spectrometry</i>)	Distingue i composti chimicamente identici in base al rapporto tra gli isotopi (Benson et al., 2006)
ICP-MS (<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)	Determina gli elementi inorganici contenuti anche in tracce negli alimenti (Meija et al., 2004)
PTR-MS (<i>proton transfer reaction mass spectrometry</i>)	Quantifica e monitora on-line i composti organici contenuti negli alimenti, grazie ad una blanda ionizzazione delle molecole organiche utilizzando lo ione H_3O^+ , generato da una sorgente operante in vapore d'acqua (Hansel e Mark, 2004)
GC-MS (<i>gas chromatography mass spectrometry</i>)	Separa i diversi composti in base alla loro affinità rispetto alla fase stazionaria della colonna utilizzata, mentre lo spettrometro di massa consente l'identificazione delle masse tipiche dei composti, generate, di solito, attraverso una ionizzazione ad impatto di elettroni (Pillonel et al., 2003a)

Tecniche spettroscopiche

NMR (<i>nuclear magnetic resonance</i>)	Misura dell'assorbimento di una radiofrequenza da parte del nucleo di atomi, con spin diversi da zero, in un forte campo magnetico (Ibanez and Cifuentes, 2001)
IR (<i>infrared spectroscopy</i>)	Misura le vibrazioni delle molecole in funzione delle differenze di frequenza che si registrano a seconda dei gruppi funzionali e della struttura caratteristica delle molecole stesse
FFFS (<i>Front face fluorescence spectroscopy</i>)	Utile nell'analisi dei prodotti lattiero-caseari in funzione del loro elevato contenuto in fluorofori (Herbert et al., 2000; Becker et al., 2003)

Tecniche di separazione

HPLC (<i>High performance liquid chromatography</i>)	Tecnica utilizzata per separare una vasta gamma di composti di differente origine come carboidrati, vitamine, additivi, micotossine, amino acidi, proteine, trigliceridi (Tranchida et al., 2004)
GC (<i>gas-chromatography</i>)	Tecnica utilizzata nell'analisi degli alimenti per separare sostanze volatili e semi-volatili che compongono l'aroma

2.2. Marcatori utili al riconoscimento dell'autenticità dei prodotti alimentari

Marcatori della dieta (marker diretti)

I marcatori della dieta (marker diretti) provengono direttamente e inequivocabilmente dagli alimenti ingeriti dagli animali poiché sono costituiti da molecole presenti nell'erba verde. Essi non possono essere sintetizzate dall'animale ma lo possono essere solo dopo l'assorbimento dei grassi, quindi, si ritrovano nei prodotti di

origine animale, latte e carne. Fanno parte dei marker diretti i pigmenti carotenoidi, i terpeni e i composti fenolici tra cui i flavonoidi.

Recentemente si è dimostrato che micronutrienti solubili in acqua, come i composti fenolici, sono stati rilevati nel latte di vacca in funzione alla diversa alimentazione dell'animale (Besle et al., 2004). Altri biomarcatori delle piante come il phytenes (terpenoide ad alto peso molecolare) sono stati trovati nel latte (Cerbulis et al., 1985) e nel tessuto adiposo (Coppa et al., 1997) pur non avendo ancora ricevuto una valutazione sperimentale.

I composti fenolici sono metaboliti secondari delle piante (Naczk & Shahidi, 2004) e la loro presenza nella carne può essere dovuta a tanti fattori come: il trasferimento diretto dei fenoli delle piante verdi oppure sono sintetizzati da microrganismi ruminanti. In questo caso, vengono definiti precursori dei composti fenolici i di-terpeni, l'amminoacido tiroxina o il polimero lignina. Chen e coautori (1985), hanno affermato che alcuni batteri ruminanti sono i responsabili della ripartizione della lignina in monomeri fenolici; è noto che la lignina è presente in quantità elevate nelle piante verdi.

I **Carotenoidi** sono una famiglia di pigmenti sintetizzati dalle piante, dalle alghe e da alcune specie di funghi e di batteri. Essi sono molecole costituite da otto unità isopreniche (polimeri di isoprene), spesso terminanti in un anello. Attualmente, sono conosciuti oltre 600 tipi di carotenoidi normalmente suddivisi in due gruppi: i caroteni o idrocarotenoidi, le xantofille o oxicarotenoidi (Thane and Reddy, 2000 citato da Biondi et al., 2010). I più comuni carotenoidi sono α , β e γ carotene, e fra questi il β -carotene è sicuramente il più diffuso ed attivo. I carotenoidi sono composti liposolubili

responsabili del colore dei vegetali, dal giallo pallido al rosso acceso, essi si trovano nelle foglie verdi di tutte le piante, non sono sintetizzati dagli animali ma si possono rilevare nei tessuti animali e nel latte; infatti, sono stati considerati composti utili per l'identificazione della dieta, in particolare per distinguere animale alimentati al pascolo da animali alimentati con concentrati (Nozière et al., 2006b; Serrano et al., 2006; Cozzolino et al., 2002). È noto da tempo che i carotenoidi contenuti negli alimenti zootecnici si trasferiscono nei prodotti di origine animale, infatti, i lipidi del latte e quelli del tessuto adiposo assumono una colorazione più o meno gialla. Infatti, Yang e coautori (1992) hanno dimostrato che, in tre diverse specie animali, bovini, caprini e ovini, l'assorbimento, la deposizione e il metabolismo del β -carotene è differente; quindi, il tessuto adiposo dei bovini, a causa dell'accumulo di β -carotene, diventa di colore giallo, nei caprini e resta di colore bianco negli ovini.

Prache e coautori (2005) hanno asserito che la quantità di carotene nei foraggi varia in funzione della specie foraggera e delle sue modalità di conservazione, in generale essa diminuisce nell'erba conservata rispetto a quella riscontrata nell'erba fresca, di circa il 60% nei foraggi disidratati e nell'insilato, del 70-90% nei fieni.

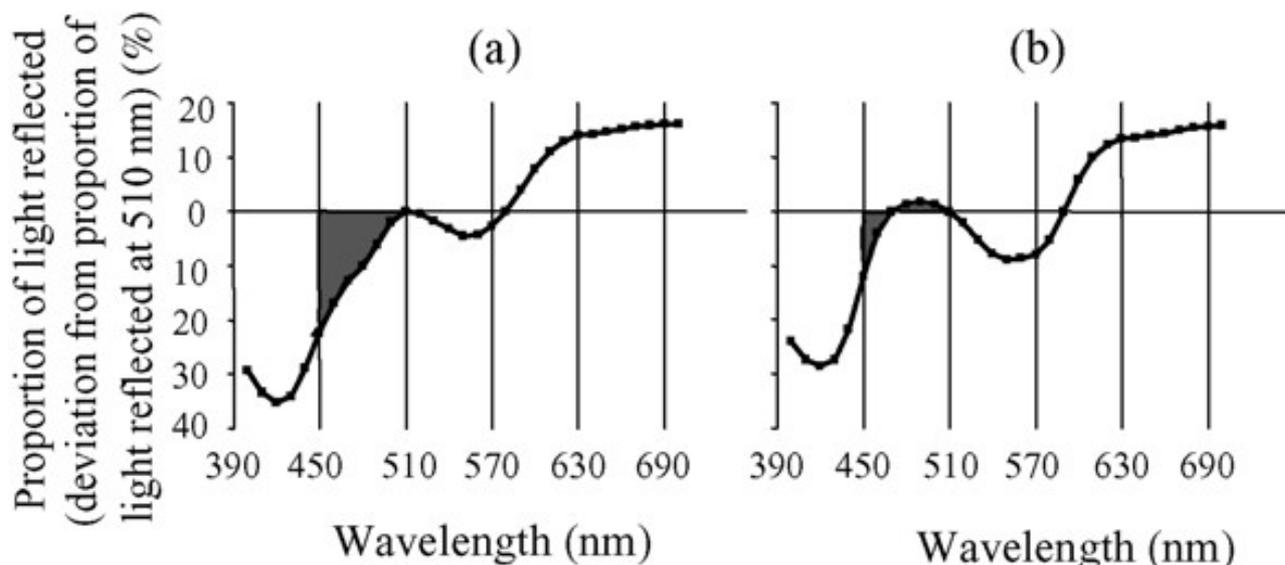
Alla famiglia dei carotenoidi appartiene, inoltre, il carotenoide giallo detto luteina. Esso è l'unico pigmento carotenoide presente nel grasso di ovini e caprini (Yang et al., 1992; Prache et al., 2003b). Questa affermazione è di notevole importanza in quanto questo pigmento carotenoide, luteina, è presente in percentuali elevate nell'erba verde, 9-14 mg/100 g di peso fresco, quindi rappresenta un ottimo marcatore dell'alimentazione degli animali al pascolo così come hanno affermato Prache e coautori (2003b); mentre nei cereali, nei tuberi e nei loro derivati si riscontra una bassa concentrazione di luteina (Wolter, 1998). La percentuale di luteina contenuta nei latticini ha valori elevati quando le vacche sono alimentate con diete a base di fieno rispetto ai valori riscontrati nei

latticini di animali alimentati con diete a base di insilato di mais (Lucas et al., 2006).

Recentemente Prache e coautori (2006) hanno dimostrato che nel plasma di agnelli sono presenti piccole concentrazioni di zeaxantine e di β -carotene, così come due carotenoidi sconosciuti.

Altra caratteristica importante dei pigmenti carotenoidi è che essi sono capaci di assorbire la luce a lunghezze d'onda diverse da quelle delle clorofille e quindi sono considerati dei recettori supplementari di luce. Determinando sperimentalmente l'efficienza della luce di colore diverso nel promuovere la fotosintesi, si ottiene una risposta nota con il nome di spettro d'azione, spesso utilizzato per identificare i pigmenti responsabili dell'effetto biologico della luce. Per esempio, la luteina che è presente nell'erba verde assorbe la luce a lunghezze d'onda comprese fra 450 e 510 nm. Sfruttando questa caratteristica, Prache e Theriez (1999) sono stati i pionieri di un nuovo e innovativo sistema di tracciabilità del sistema di alimentazione al pascolo. Il sistema si basa sull'analisi dello spettro di riflettanza del grasso perirenale di agnelli nella zona di assorbimento della luteina e permette di ricavare un indice di tracciabilità. Gli Autori hanno dimostrato che l'indice di tracciabilità che quantifica l'assorbimento della luce da parte dei pigmenti carotenoidi in agnelli alimentati al pascolo è maggiore rispetto a quello misurato in agnelli alimentati in stalla con mangimi concentrati e fieno (Priolo et al., 2002): in figura 1a è rappresentato lo spettro di riflettanza di agnelli alimentati al pascolo; in figura 1b è rappresentato lo spettro di riflettanza di agnelli alimentati in stalla o con mangimi concentrati.

Figura 1. Spettro di riflettanza del grasso perirenale di agnelli.



Fonte: Prache et al., 2005

Questo metodo è di particolare interesse in quanto facilmente spendibile nell'industria della carne utilizzando uno spettrometro portatile. Il metodo è stato testato in un grande allevamento di pecore da Dian e coautori (2007), in carni bovine (Serrano et al., 2006) e latte (Nozière et al., 2006b).

I **Terpeni** sono una grande classe di molecole quasi esclusivamente sintetizzati dalle piante (monoterpeni, sesquiterpeni e derivati ossigenati). Il contenuto e la tipologia di terpeni presenti nelle diverse famiglie di piante foraggere è molto variabile, soprattutto in certe famiglie botaniche, come le dicotiledoni dove sono abbondanti. Le Apiaceae, alcune Asteraceae e Lamiaceae (famiglie botaniche presenti nel pascolo) contengono un alto contenuto di terpeni di diversa famiglia, mentre i foraggi ricchi di Poaceae presentano una composizione in terpeni più povera di quelli in cui sono presenti una maggior quantità di dicotiledoni (Mariaca et al., 1997; Bugaud et al., 2001 citati da Biondi et al., 2010). Un altro aspetto importante è la variabilità della

composizione dei mono e sesquiterpeni in funzione dell'epoca di raccolta del campione o anche semplicemente allo stadio fenologico della pianta. Infatti, a parità di specie botanica campioni prelevati nel mese di luglio hanno evidenziato contenuti molto differenti rispetto a campioni prelevati nel successivo mese di settembre (Cornu et al., 2001). Affermando che i terpeni e, nella fattispecie, i mono e sesquiterpeni, sono possibili marcatori geografici e di sistema di produzione, nell'ambito della produzione di alimenti di origine animale. Un altro fattore di variazione da prendere in considerazione per valutare il contenuto di terpeni nel latte è la tecnica di pascolamento (Tornambé et al., 2006 citato da Biondi et al., 2010) che può influire sulla quantità e qualità del foraggio disponibile e quindi sui terpeni presenti nel pascolo. Le differenze nel contenuto di terpeni nelle piante foraggere in funzione della specie botanica e della localizzazione geografica ed altimetrica del pascolo hanno indotto a considerare i terpeni e, nella fattispecie, i mono e sesquiterpeni, come possibili marcatori geografici e di sistema di produzione, nell'ambito della produzione di alimenti di origine animale. I terpeni si trasferiscono rapidamente dalle dicotiledoni, di cui l'erba di montagna è molto ricca, al grasso del latte. Infatti, i terpeni contenuti nel foraggio seguono due vie per raggiungere i tessuti dell'animale, tra cui il tessuto mammario, attraverso il quale vengono escreti nel latte. La prima via è quella respiratoria, la seconda via è quella digestiva (Vaillon et al., 2000).

Il trasferimento dei terpeni dal foraggio ai tessuti degli animali è influenzato anche dall'attività della microflora ruminale. Una volta che i terpeni sono stati assorbiti, il loro trasferimento nei tessuti animali è pressoché invariato in quanto essi non sono soggetti a modifiche nel digerente ritrovandosi tal quali nei tessuti. Molti studi condotti da diversi autori (Suzuki e Bailey, 1985; Larick et al., 1987; Young et al., 1997; citati da Priolo et al., 2004) hanno riscontrato una concentrazione significativamente più elevata di terpeni

nel tessuto adiposo di ovini e bovini alimentati al pascolo rispetto ad animali alimentati in stalla. Inoltre, un recente studio condotto da Priolo e coautori (2004) ha messo in evidenza che il β -cariofillene (sesquiterpene), rilevato nel grasso perirenale di agnelli, funge da marcatore dell'alimentazione al pascolo, in quanto esso è stato rilevato nel tessuto adiposo di tutti gli animali alimentati esclusivamente al pascolo ed in nessun animale alimentato in stalla con mangime. Un precedente studio condotto da Cornu e coautori (2001) ha dimostrato che questo sesquiterpene è uno dei principali componenti del pascolo naturale. Tuttavia, non tutti i terpeni rilevati nel grasso dei ruminanti sono correlati positivamente ad una dieta al pascolo: β -gurjunene è stato trovato in percentuali elevate nel grasso di agnelli alimentati in stalla rispetto a agnelli alimentati al pascolo (Priolo et al, 2004). Allo stesso modo, il limonene è stato rilevato con un'alta percentuale nel grasso di agnelli alimentati con concentrato (Sebastian et al., 2003) o nei bovini alimentati con foraggi insilati rispetto a animali alimentati al pascolo (Galvin et al., 2000).

I **Flavonoidi** sono uno dei più grandi gruppi di composti naturali conosciuti e rappresentano una delle classi più importanti di metaboliti secondari delle piante. Nel mondo vegetale il loro ruolo principale è legato alla colorazione dei fiori, dei frutti e talvolta delle foglie. Alcune piante foraggere sono molto ricche in flavonoidi, per esempio le dicotiledoni sono più ricche di flavonoidi rispetto alle graminacee, e alcuni composti sono spesso specifici di alcune famiglie botaniche. In realtà non esistono molti studi sul metabolismo dei flavonoidi nei ruminanti, tuttavia è possibile ipotizzare che tali sostanze, dopo aver subito alcune modificazioni all'interno del rumine siano, almeno in parte, assorbite dall'intestino. Besle e coautori (2005) hanno identificato circa 60 tipi differenti di flavonoidi nel latte delle vacche. La quantità maggiore di flavonoidi

è stata riscontrata nella dieta contenente pascolo di prato di montagna, mentre la quantità minore nella dieta ricca di concentrati (Biondi et al., 2010). Quanto detto spiega perché vi è una grossa differenza in termini di contenuto e di tipologia, fra i flavonoidi della dieta e quelli del latte (De Feo et al., 2006). Gli studi condotti sul contenuto di flavonoidi nel latte, in relazione alla dieta degli animali, sono ancora troppo pochi per poter trarre delle indicazioni certe sulla possibilità di utilizzare queste molecole come marcatori del processo di produzione.

A mia conoscenza non esistono studi sui flavonoidi come mezzo di tracciabilità del sistema di alimentazione. Tra i principali gruppi di flavonoidi ricordiamo gli isoflavoni, i quali non sono utilizzati al fine di tracciare il sistema di alimentazione ma, se presenti nel latte, conferiscono proprietà benefiche per la salute umana.

Marcatori metabolici (marker indiretti)

I marcatori metabolici (marker indiretti) derivano dal metabolismo dell'animale; tra quelli studiati allo scopo di tracciare il sistema di alimentazione si citano gli acidi grassi, lo scatolo e l'indolo, i lettoni e le aldeidi.

Gli acidi grassi insaturi contengono da 1 a 6 doppi legami, sebbene i monoinsaturi rappresentino la quota più cospicua (da C10 a C24) in particolare l'acido oleico ne costituisca i 3/4. Gli acidi grassi polinsaturi (polyunsaturated fatty acid = PUFA), rappresentano meno del 10% del totale degli acidi grassi del latte.

Tra i PUFA, l'acido linoleico coniugato (CLA) sta avendo un crescente interesse nel mondo scientifico per l'attività antitumorale e per altre importanti proprietà come quella antiaterogena, immunomodulante e antidiabetica (Ip et al., 1994; Pariza et al., 2001,

citati da Biondi et al., 2010).

La composizione acidica del latte e della carne può fornire utili informazioni per individuare la dieta degli animali. Nonostante una parte degli acidi grassi insaturi sfugga al processo di idrogenazione ruminale, si può affermare che la dieta influenza fortemente la composizione degli acidi grassi nei tessuti e nei prodotti animali (Wood e Enser, 1997; Wood et al., 2003; Aurousseau et al., 2004 in agnelli; Martin et al., 2005 nel latte di vacca). I lipidi dell'erba hanno un elevato contenuto di PUFA, in modo particolare dell'acido α -linolenico (C18: 3n-3; ALA) (tabella 3), composto non sintetizzato dagli animali. Invece, i concentrati contengono una elevata percentuale di acido linoleico (C18: 2n-6) (Prache et al., 2005). Pertanto, animali alimentati al pascolo presentano, nel grasso perirenale, una percentuale più elevata di acido linolenico rispetto ad animali alimentati in stalla (Wood e Enser, 1997). Inoltre, è stato dimostrato che due derivati dell'acido linolenico, acido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) e acido docosaesaenoico (DHA; 22:6 n-3), sono presenti anche a concentrazioni elevate in animali alimentati al pascolo vs animali allevati in stalla (Elmore et al., 2000).

Tabella 3. *Composizione acidica di differenti foraggi.*

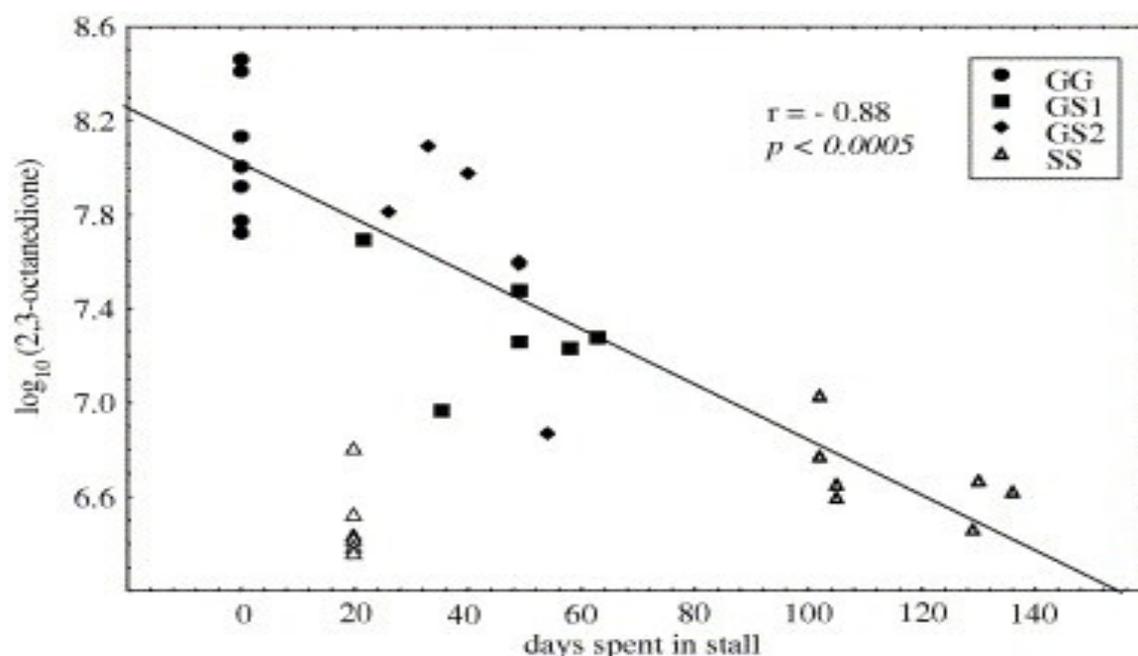
<i>Foraggio</i>	<i>Acidi grassi (% dei lipidi totali)</i>								Totale
	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3	
Triticale	0,05	0,40	4,10	0,69	0,19	0,69	3,76	20,73	30,62
Loglio perenne	0,05	0,62	6,42	0,75	0,30	1,06	5,99	31,00	46,18
Trifoglio bianco	0,05	0,45	5,66	0,78	0,48	1,17	6,80	21,60	36,99
Cicoria	0,02	0,41	6,02	0,90	0,23	0,66	7,58	28,83	44,65
Borragine	0,01	0,30	5,42	0,50	0,58	1,40	5,07	24,80	38,09
Plantagine	0,00	0,43	5,21	0,70	0,36	0,47	6,45	21,30	34,93

Fonte: Clapham et al., 2005 tratto da Biondi et al., 2010.

Altri autori (French et al., 2000; Aourousseau et al., 2004; Priolo et al., 2005), in accordo con quanto detto precedentemente, hanno dimostrato che il rapporto n-6/n-3 ha valori bassi per la carne di agnelli alimentati al pascolo rispetto ai valori misurati nella carne di agnelli alimentati con concentrato. Poiché è noto che il rapporto n-6/n-3 è un indice nutrizionale per la salubrità degli alimenti destinati al consumo umano, la carne prodotta da animali allevati al pascolo è maggiormente salubre, rispetto alla carne prodotta da animali allevati in stalla con concentrati.

Un altro composto chimico la cui presenza è legata all'alimentazione al pascolo ed alla sua ricchezza in acido linolenico è il 2,3 octanedione. Young e coautori (1997) hanno avanzato l'ipotesi che il 2,3-octanedione sia un ottimo indicatore dell'alimentazione al pascolo e che provenga dall'ossidazione dell'acido linolenico a causa dell'azione enzimatica della lipossigenasi. Questo enzima è presente nelle piante a foglia, ma è assente nelle sementi, con l'eccezione dei semi di soia (Keen & Wilson, 1992). Fin dal 1979, Nixon e coautori (1979) hanno rivelato che il 2,3-octanedione è strettamente correlato alle diete con erba verde (pascolo). Questo composto è stato individuato anche nella carne ovina (Vasta et al., 2006). La figura 2 mostra la regressione lineare tra il tempo che gli animali hanno passato in stalla, espresso in giorni, e il logaritmo del 2,3-octanedione misurato nel grasso caudale di pecore. Gli animali divisi in gruppi sono stati alimentati con le seguenti diete: GG = animali alimentati al pascolo; GS1 = animali alimentati al pascolo e finissati in stalla per un breve periodo; GS2 = animali alimentati al pascolo e finissati in stalla per un lungo periodo; SS = animali alimentati in stalla con concentrato.

Figura 2. Regressione lineare tra: il tempo che gli animali hanno passato in stalla e il logaritmo del 2,3-octanedione, nel grasso caudale di pecore.



Fonte: Priolo et al., 2004.

Ancora, Suzuki e Bailey (1985) hanno messo in evidenza che il grasso perirenale di agnelli alimentati con trifoglio contiene valori molto più elevati di 2,3-octanedione rispetto ad agnelli alimentati con corn-fed.

Alcune recenti ricerche sul latte hanno messo in evidenza che anche altri acidi grassi o alcuni rapporti tra acidi grassi possono rappresentare validi marcatori della dieta degli animali e della zona di produzione. Dalla letteratura si evince che la concentrazione degli acidi grassi ramificati *iso*-C14:0, *iso*-C15:0, *iso*-C16:0 e *iso*-C17:0 è più elevata in bovini alimentati su pascoli di altipiani rispetto a quelli di pianura (Collomb et al., 2002; Engel et al. 2007 citato da Biondi et al., 2010). La composizione acidica è risultata efficace nel discriminare il latte di pecore alimentate con differenti specie foraggere (Addis et al., 2005; Mele et al., 2007a citati da Biondi et al., 2010). Gli acidi grassi C14:0, C18:1 e C18:3 n-3 sono risultati essere quelli in grado di discriminare tra i

differenti regimi alimentari. Engel e coautori (2007) hanno dimostrato che il rapporto tra alcuni acidi grassi può essere fortemente discriminante per il latte proveniente da pianura o da montagna. In particolare, i rapporti iso-C17:0/C18:3 n-3 e iso-C15:0/iso-C14:0, sono in grado di discriminare con certezza, l'autenticazione di latte proveniente da pianura rispetto al latte proveniente da altopiani indipendentemente dalla stagione.

Scatolo ed indolo derivano dalla metabolizzazione delle proteine della dieta con successiva deaminazione e decarbossilazione del triptofano ad opera di più ceppi batterici normalmente presenti nel rumine (Tavendale et al, 2005; Deslandes et al., 2001). Scatolo ed indolo sono composti aromatici che contribuiscono significativamente al flavour “*pastorale*” nelle carni (Young et al., 1997; Lane & Fraser, 1999) e nel latte (Urbach, 1990; Lane et al, 2002), con elevate concentrazioni in animali alimentati al pascolo. L'indolo è assorbito attraverso l'epitelio rumine ed è trasportato dal flusso sanguigno, tramite questo, la maggior parte arriva al fegato (Roy et al., 2004). Circa cinquanta anni fa sono stati condotti i primi studi su scatolo e indolo; i risultati presenti in letteratura sono numerosi ed abbastanza concordi per quanto riguarda il prodotto carne, ma sono ancora inconsistenti per il prodotto latte. Solo pochi lavori infatti esaminano il contenuto di scatolo nel latte in rapporto al sistema di alimentazione delle vacche. In ogni caso, nell'animale da latte è molto importante tenere presente che si ha una escrezione veloce e giornaliera dello scatolo attraverso la mammella. Quindi la dipendenza dai fattori di variabilità della produzione di scatolo ruminale dovrebbe essere chiaramente superiore rispetto all'accumulo nei depositi adiposi. Quindi, sono necessarie ulteriori prove scientifiche finalizzate ad indagare sulle fonti di variabilità del contenuto di scatolo nel latte per poter escludere o confermare la possibilità di un suo impiego quale indicatore indiretto dell'alimentazione al pascolo. Invece, per quanto

riguarda gli animali da carne, l'alimentazione al pascolo rispetto all'alimentazione in stalla ha determinato, in numerose prove sperimentali, un aumento della concentrazione di scatolo nei depositi adiposi, in particolare nel tessuto perirenale (Vasta e Priolo, 2006).

Studi condotti da Young e coautori (2003) hanno messo in evidenza che lo scatolo si trova in elevate quantità nel grasso perirenale di agnelli alimentati al pascolo rispetto ad agnelli alimentati in stalla, nonostante è noto che lo scatolo accumulato nei tessuti dei ruminanti è influenzato da tanti fattori (tabella 4).

Esistono diversi fattori di variabilità dello scatolo e dell'indolo, per esempio, nei tessuti animali la concentrazione di indolo e scatolo è influenzata dal tipo di alimentazione. Vasta & Priolo (2006) hanno dimostrato che in animali alimentati al pascolo si ha un aumento delle concentrazioni di scatolo nel tessuto perirenale rispetto alla concentrazione misurata in animali alimentati in stalla.

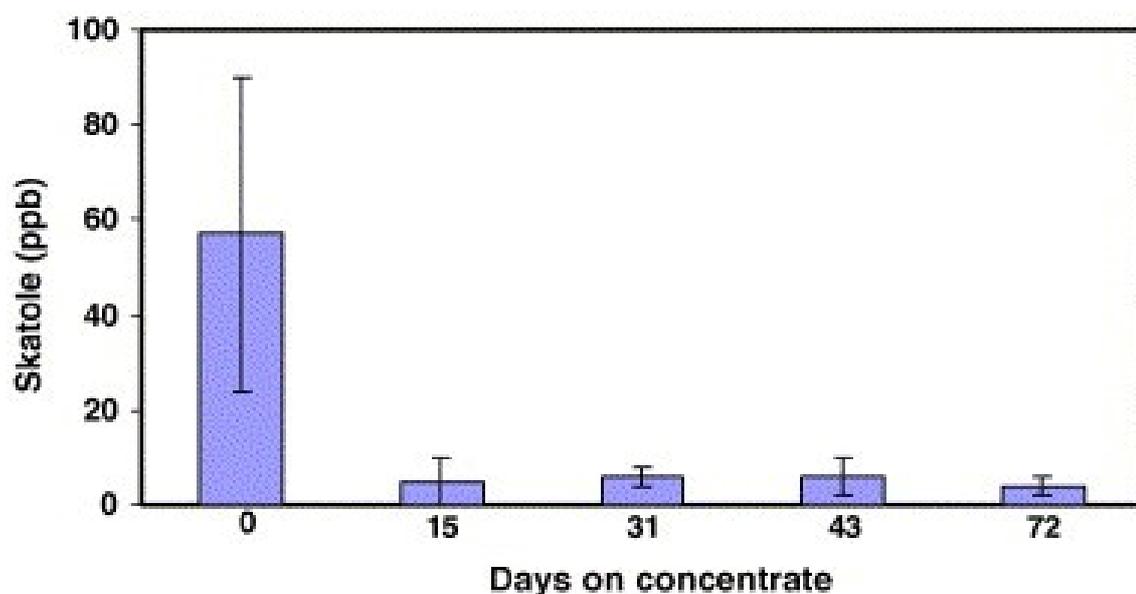
I foraggi integrati con tannini hanno la funzione di ridurre i livelli di scatolo nel plasma (Roy et al., 2002) o nel latte (Roy et al., 2004). A tal proposito, Schreus e coautori (2007b) hanno osservato su pecore alimentate con *Hedysarum coronarium* valori pari a 84,7 µg/g nel grasso del latte rispetto al valore 131,9 µg/g misurato su pecore alimentate con Sulla.

Tabella 4. *Accumulo di scatolo e indolo nei tessuti animali*

Composto volatile	Concentrato (ppm)	Pascolo (ppm)	Specie animale	Tessuto	Riferimenti
Indolo	64	36	Ovini	Grasso perirenale	Priolo et al., 2005
	27	130,5			Young et al., 2003
	25	37			
Scatolo	9	67	Ovini	Grasso perirenale	Young et al., 2003
	3,1	18			
	25	91			Priolo et al., 2005

Young e coautori (1997) hanno osservato che la concentrazione di scatolo nel grasso caudale di agnelli è sostanzialmente più elevata nella carne di agnelli al pascolo rispetto alla concentrazione misurata nella carne di agnelli alimentati in stalla. Questo si può spiegare perché l'elevato valore del rapporto proteine/carboidrati nell'erba verde può favorire la disponibilità di aminoacidi nel ruminale e, quindi, la dieta al pascolo può favorire la formazione di scatolo (Vasta et al., 2006). La figura 3 illustra la concentrazione di scatolo nel grasso perirenale di animali alimentati con una dieta pascolo vs concentrato.

Figura 3. Concentrazione di scatolo nel grasso perirenale di animali alimentati con una dieta pascolo vs concentrato.



Fonte: Priolo et al., 2001

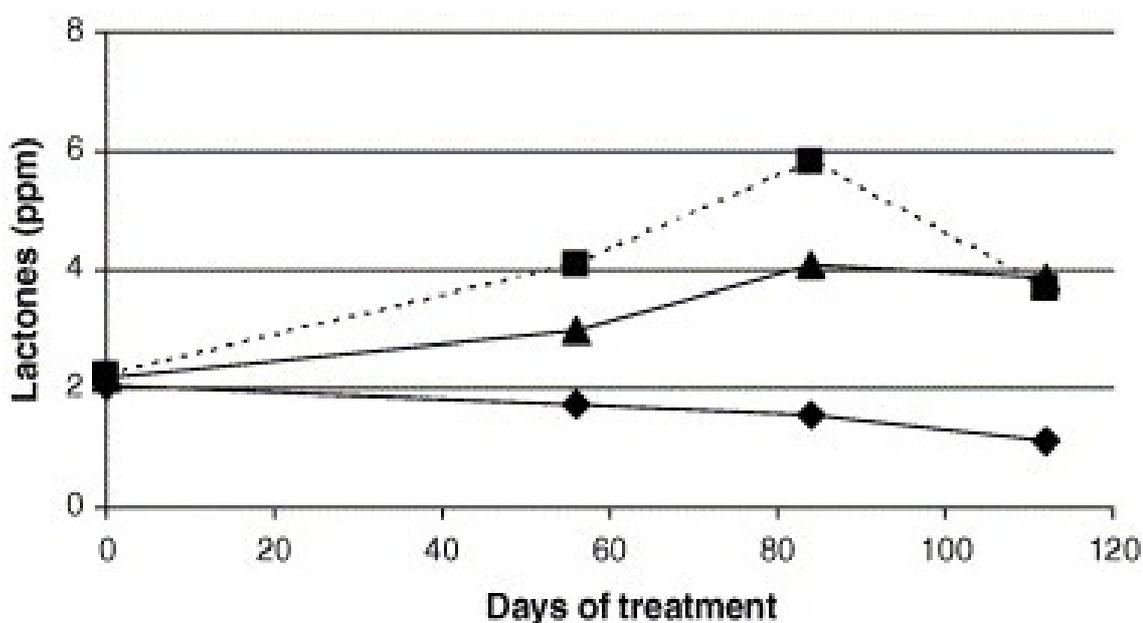
Nel 2004 Schreures e coautori hanno dimostrato che i tannini condensati da *Lotus corniculatus* riducono la produzione di scatolo a causa della lenta degradazione delle proteine da parte della microflora batterica ruminale. Tuttavia, Priolo e coautori (2005) hanno osservato che la quantità di scatolo misurata nel grasso perirenale di agnelli alimentati con Sulla risulta più alta rispetto alla quantità misurata in agnelli alimentati con concentrato. Essi hanno ipotizzato che i tannini condensati presenti nella Sulla probabilmente non era sufficiente a pregiudicare l'attività batterica ruminale e, quindi, di ridurre la produzione di scatolo (Vasta et al., 2006).

Lattoni tra i composti volatili presenti nei grassi, anche i lattoni sembrano essere fortemente legati al sistema di alimentazione. Queste molecole sono generalmente rilevate in quantità elevate nel grasso di agnelli (Sebastiàn et al, 2003; Suzuky & Bailey, 1985) e di bovini (Maruri et al, 1992) alimentati con una dieta a base di concentrato

(cereali) rispetto alla quantità rilevata nel grasso di animali alimentati al pascolo.

Larick e coautori (1987) hanno dimostrato che l'accumulo di lattoni, nel grasso sottocutaneo degli animali, aumenta con l'incremento giornaliero del concentrato ma, raggiunto il picco massimo decrescono. In figura 4 è rappresentata la variazione di concentrazione di alcuni lattoni (il quadrato, il triangolo e il rombo si riferiscono rispettivamente al δ -tetradecalactone, δ -hexadecalactone e δ -dodecalactone) nel grasso sottocutaneo di animali alimentati con concentrato.

Figura 4. Variazione di concentrazione di alcuni lattoni (δ -tetradecalactone, δ -hexadecalactone e δ -dodecalactone).



Fonte: Larick et al., 1987

Ancora, Larick e coautori (1987) hanno scoperto una correlazione diretta tra i lattoni (δ -tetradecalactone, δ -hexadecalactone) e la diete a base di grano e quindi, hanno proposto questi due lattoni come indicatori del sistema di alimentazione.

Aldeidi sono composti derivati dall'ossidazione dei lipidi e in genere sono i maggiori responsabili della frazione volatile dalla carne dei ruminanti (Larick et al, 1990;. Mottram, 1998). Gatellier e coautori (2005) hanno dimostrato che, rispetto ad una dieta a base di concentrato, la dieta al pascolo (erba verde) riduce il livello di acidi grassi polinsaturi (PUFA) ossidati della carne. In un recente studio De Scalzo e coautori (2005) hanno dimostrato che la carne di animali alimentati con concentrato contiene più aldeidi rispetto alla carne di animali alimentati al pascolo con erba verde. Al contrario, Raes e coautori (2003) hanno dimostrato che la carne di bovini alimentati in stalla con concentrato presentano percentuali più basse di aldeidi rispetto ai bovini alimentati al pascolo (Vasta et al., 2006). Young e coautori (1997) hanno dimostrato che il grasso di agnelli alimentati con una dieta a base di cereali contiene una maggiore quantità di alcune aldeidi rispetto ad agnelli alimentati al pascolo. Quanto detto è stato attribuito sia ad un elevato livello di C18:2 n-6 nella dieta a base di concentrato, sia all'effetto protettivo del carotene presente nelle foglie e sia all'ossidazione dei tocoferoli dei grassi di agnelli nutriti al pascolo (Vasta et al, 2006). La carne di ruminanti alimentati con diete a base di cereali, in media, contiene maggiori quantità di acido linoleico e minori quantità di acido α -linolenico rispetto alla carne di animali alimentati al pascolo (Enser et al., 1998). Pertanto, il 4-heptanale, 2,4-heptadienal e 2,6-nonadienale (che derivano dalla decomposizione dell'acido linolenico) sono generalmente presenti in quantità elevate nel grasso di agnelli nutriti al pascolo (Elmore et al, 2004;. Young . et al, 2003), mentre esanale, 2-eptenale e 2,4-decadienal (originati da acido linoleico) sono associati a una dieta a base di cereali (Galvin et al, 2000; Larick et al, 1990; Young et al., 2003).

Marcatori con tecniche spettroscopiche

Grazie all'evoluzione delle tecniche spettroscopiche nel vicino infrarosso, l'utilizzo di metodi NIRS (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*) consente di ottenere un gran numero di informazioni sui diversi costituenti del campione in analisi, sulla base di alcune proprietà chimico-fisiche dello stesso campione oggetto di analisi. Per esempio, è noto che lo spettro infrarosso misurabile in campioni di carne è emesso dai legami C-H, N-H e O-H i quali sono tali da creare una sorta di impronta digitale ("*fingerprint*") dello stesso campione. Questa tecnica è utile a classificare il campione di carne nell'ambito di categorie di provenienza geografica o al fine di tracciare il sistema di alimentazione, però ad oggi in letteratura sono presenti pochi studi su ovini (Osorio et al., 2007; Dian et al., 2009 citati da Priolo et al., 2008) e su bovini (Cozzolino et al., 2002 citato da Priolo et al., 2008). Gli Autori sono riusciti a discriminare agnelli allevati in stalla da agnelli allevati al pascolo, affermando così che tale metodo di analisi rappresenta un ottimo strumento di tracciabilità del sistema di alimentazione degli ovini.

Marcatori fisici (marker fisici)

Gli isotopi stabili sono utilizzati come marcatori fisici per identificare l'origine e la genuinità dei prodotti alimentari. Essi sono ampiamente discussi nei capitoli seguenti. Le tecniche isotopiche hanno anche, un ruolo rilevante nel quantificare l'intake nei ruminanti e nel determinare la reale digeribilità delle proteine nei monogastrici. Inoltre, possono essere utili strumenti per identificare la presenza di fattori anti-nutrizionali, come per esempio tannini e saponine, presenti in alcune fonti alimentari, essi possono diminuire l'assorbimento dei nutrienti e causare tossicità se consumati ad alte dosi

(Makkar et al., 2008).

2.3. Considerazioni

Da quanto detto fino ad ora si può concludere che, sia per la carne che per il latte, esistono diverse metodiche di analisi idonee a tracciare il sistema di alimentazione degli animali in riferimento alla loro dieta (pascolo vs concentrato).

Qualsiasi animale o vegetale possiede una propria composizione isotopica naturale che può essere modificata solo da un processo di turnover metabolico, rappresentando così *“l'impronta digitale”* o *“firma isotopica”* nei tessuti. Questa è correlabile all'origine geografica del prodotto o al sistema di produzione che lo ha generato.

Tracciare il sistema di alimentazione sia con marker diretti, in modo particolare con i carotenoidi, e sia con marker indiretti, in modo particolare con gli acidi grassi, permette di ottenere risposte relativamente veloci, di facile utilizzo e con costi poco onerosi. Invece, tracciare il sistema di alimentazione con l'ausilio di marker fisici è stato affrontato nei capitoli seguenti dopo una panoramica illustrativa del concetto di isotopo stabile. Come si può constatare dai capitoli seguenti, il rapporto isotopico, in particolare quello del carbonio, oltre a essere definito un ottimo marker, ha il grande vantaggio di poter tracciare il sistema di alimentazione dell'animale senza sottoporlo allo stress della macellazione. Di contro, questa tecnica di analisi ha lo svantaggio di avere costi di gestione elevati.

ISOTOPI STABILI

Federick Soddy, assistente di Ernest Rutherford, nel 1913 ha coniato il termine “*isotopo*” per indicare le diverse forme dello stesso elemento (Kotz & Treichel 2003).

Gli isotopi sono atomi di uno stesso elemento, con uguale numero atomico ma con differente numero di massa. Possiedono lo stesso numero di protoni ed elettroni (proprietà chimiche uguali) ma un diverso numero di neutroni (proprietà fisiche diverse). Possono essere naturali, cioè esistenti in natura, o artificiali cioè prodotti in conseguenza di reazioni nucleari provocate; oppure stabili o instabili (detti anche isotopi radioattivi). La maggior parte degli elementi ha almeno due isotopi stabili (non radioattivi), pochissimi hanno un solo isotopo (alluminio, fluoro e fosforo). Per contro, altri elementi hanno numerosi isotopi, per esempio lo stagno ha dieci isotopi stabili.

Nella materia biorganica, i principali costituenti elementari (H, C, N, O) sono presenti sotto varie forme isotopiche stabili (D, H, ^{13}C , ^{12}C , ^{15}N , ^{14}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O) di cui quella decisamente maggioritaria è la più leggera. Gli isotopi di un elemento si differenziano, anche, per delle proprietà chimico-fisiche quali per esempio le caratteristiche spettrali, fenomeno denominato “*effetto isotopico*”.

L'abbondanza isotopica naturale (δ), per ogni isotopo, è definita come la percentuale, in peso, con cui l'isotopo è presente nell'elemento. Essa è conseguenza delle diverse proprietà chimico-fisiche degli isotopi di uno stesso elemento, della diversa massa molecolare e del diverso spin nucleare (Galimov, 1985). Queste proprietà chimico-fisiche, in una reazione chimica o nei cambiamenti di stato, giocano un ruolo fondamentale sia sulla velocità di reazione (effetto cinetico), sia sullo stato energetico del sistema (effetto termodinamico). L'effetto cinetico è causa della differente velocità

di reazione delle specie isotopiche. Infatti, isotopi più leggeri hanno massa minore (maggiore mobilità) e minore forza di legame, di conseguenza una minore energia di attivazione. L'effetto termodinamico è causa della differenza di energia libera dei diversi composti isotopici per cui, isotopi più pesanti hanno una minore energia libera. (Galimov, 1985).

La tabella 5 mostra l'abbondanza isotopica relativa di alcuni isotopi stabili di vari elementi.

Tabella 5. *Abbondanza naturale media di alcuni isotopi stabili e rispettivi standard di riferimento internazionale.*

Elemento	Isotopo Stabile	Abbondanza Naturale Media (%)	Standard di Riferimento Internazionale
Idrogeno	^1H	99,9855	V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)
	^2H (D)	0,0145	
Carbonio	^{12}C	98,892	V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite)*
	^{13}C	1,108	
Azoto	^{14}N	99,6337	AIR (Azoto dell'aria)
	^{15}N	0,3663	
Ossigeno	^{16}O	99,7587	V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)
	^{17}O	0,04	
	^{18}O	0,2039	

*Carbonato di calcio fossile prelevato nel Sud Carolina (USA)

Fonte: Biondi et al., 2010

Dall'esame della frequenza isotopica relativa, mediante la Spettrometria di Massa Isotopica (IRMS), si è dimostrato che in natura questo valore medio è condizionato, seppur nell'ordine dei ppm, da fenomeni fisici, chimici e biochimici. Questo fenomeno è definito “*frazionamento isotopico*”.

Le misure dell'analisi IRMS sono espresse in delta per mille ($\delta\%$) in relazione a standard internazionali di riferimento a noto tenore isotopico assoluto; gli standard internazionali sono diversi in relazione all'alimento da analizzare (tabella 5) e calcolati secondo la seguente formula generale:

$$\delta \text{ ‰} = \frac{R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \cdot 1000$$

in cui R rappresenta il rapporto tra l'isotopo meno abbondante ed il più abbondante. Questo rapporto è detto rapporto isotopico stabile (SIR, *Stable Isotope Ratio*) la sua determinazione è regolamentata da metodi di analisi ufficiali (*reg. CEE n. 2676/90, n. 822/97; DM del 16/2/93; reg. CE n. 2729/2000*). Un valore positivo di δ sta a significare che l'elemento in esame possiede, nel campione analizzato, un rapporto isotopico più alto di quello dello standard; analogamente, un valore di δ negativo indica che il rapporto isotopico del campione è inferiore a quello dello standard; se $\delta = 0$, campione e standard hanno lo stesso rapporto isotopico.

3.1. Isotopi stabili nella ricerca scientifica e nelle produzioni animali

I primi studi che si sono avvalsi dell'utilizzo del rapporto isotopico stabile di C e N sono stati applicati in ecologia per svelare i misteri della migrazione di animali o per avere maggiori chiarimenti sulla catena alimentare naturale (Dawson et al., 2002). Qualsiasi animale o vegetale possiede una propria composizione isotopica naturale che può essere modificata solo da un processo di turnover metabolico, rappresentando così *“l'impronta digitale”* o *“firma isotopica”* nei tessuti. Con il passare del tempo è stato interessante studiare la *“firma isotopica”* nei tessuti animali, per determinare la finestra temporale attraverso la quale si può individuare il cambiamento della dieta di un animale tramite il campionamento dei diversi tessuti animali.

Dal 1993 la ricerca degli isotopi stabili è diventata sempre più importante ed è stata eseguita su diverse matrici alimentari: succhi di frutta, bevande fermentate come il vino, gli aceti e i distillati (Bricout et al., 1985; Rossmann et al., 1994; Kornexl et al., 1996; Camin et al., 2001; Martin et al., 1988; Versini et al. 1997), nonché su altri prodotti alimentari come il miele, l'olio e su composti vegetali come la vanillina e la caffeina (White et al., 1998; Reniero et al., 1993; Giraudon et al., 2000; Angerosa et al., 1999; Dunbar et al., 1982), dimostrando come attraverso l'uso di rapporti isotopici stabili si possa determinare l'origine e la genuinità dei prodotti alimentari. Inoltre, è possibile rilevare variazioni isotopiche anche nei prodotti animali in funzione della dieta alimentare somministrata agli animali; infatti, esistono importanti applicazioni sulla carne (Piasentier et al., 2002) e anche su latte e formaggi (Rossmann et al., 2001; Manca et al., 2001; Camin et al., 2001; Gonzales et al., 1999, 2001). In più, la caratterizzazione isotopica dei componenti con diversa origine biosintetica o geografica ha permesso, sia di individuare vari tipi di frodi alimentari difficilmente rintracciabili e

sia di contribuire alla tipicizzazione degli alimenti (DOP, IGP).

3.2. Rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$)

Frazionamento isotopico del Carbonio nei vegetali.

I processi fondamentali del ciclo del carbonio che inducono frazionamento isotopico sono due: l'assunzione del carbonio dall'ambiente da parte degli organismi viventi, che implica un impoverimento di ^{13}C (definito effetto isotopico biologico) e lo scambio tra l'atmosfera e l'idrosfera che porta ad un arricchimento di ^{13}C (Galimov, 1985). Un ulteriore processo che provoca frazionamento isotopico è rappresentato dalle reazioni nei biosistemi degli organismi, sia vegetali che animali. Per esempio è di notevole importanza il frazionamento isotopico che avviene nella reazione enzimatica della fotosintesi clorofilliana. La fotosintesi è il processo mediante il quale la pianta riceve dall'ambiente esterno energia luminosa, la cattura e, convertitola in energia chimica, la utilizza per la trasformazione di composti poveri di energia in composti ad alto livello di energia. L'equazione globale della fotosintesi è indicata, nella sua forma più semplice, di seguito in tabella 6.

Tabella 6. Frazionamento isotopico e reazione enzimatica

Tipo di reazione		Frazionamento (‰)	
Fotosintesi	$6\text{CO}_2+6\text{H}_2\text{O}\rightarrow 6\text{O}_2+\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = -17$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{zucchero}} = -5$

Fonte: Clark & Fritz, 1997

In questa reazione enzimatica i legami C-C che si formano sono favoriti da atomi di C più leggeri e più mobili apportando ad un arricchimento del ^{12}C fotosintetico rispetto al ^{13}C dell'anidride atmosferica. Questo contribuisce al fatto che i composti

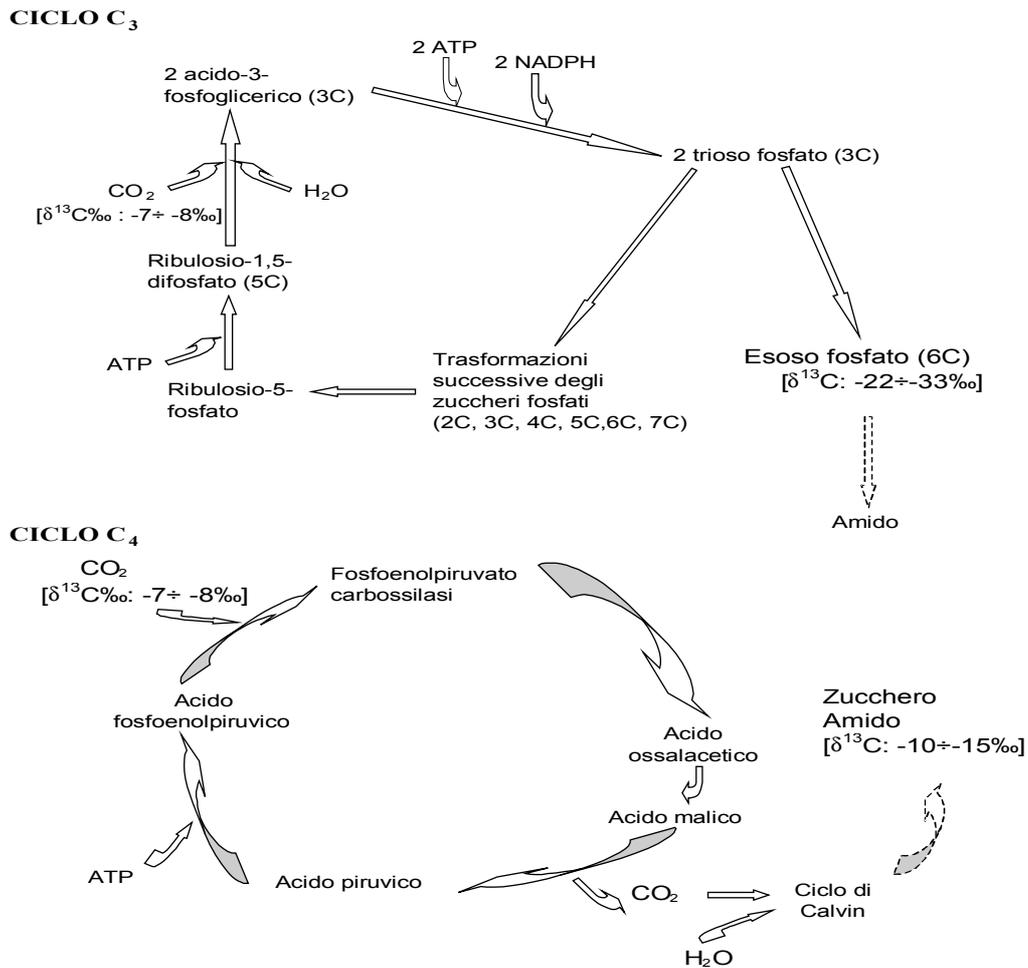
organici della pianta sono meno ricchi di ^{13}C con un valore minore di $\delta^{13}\text{C}$ rispetto a quello della CO_2 atmosferica. Inoltre, le piante a ciclo fotosintetico C_3 , C_4 o CAM hanno una diversa capacità di discriminazione isotopica degli enzimi carbossilici coinvolti nella fissazione della CO_2 e quindi presentano diversi range isotopici.

La principale via di assimilazione della CO_2 , descritta da Calvin, è chiamata via C_3 : in questo caso l'anidride carbonica fissata dà origine a composti intermedi con una catena a tre atomi di carbonio. I cloroplasti delle piante C_3 sono dotati dell'enzima, la ribulosiodifosfato-carbossilasi, che utilizzando la CO_2 dell'aria, catalizza la carbossilazione di questo pentoso e, dando origine a due molecole di acido fosfoglicerico (composto da tre atomi di C), avvia la catena metabolica di reazioni che, nell'interno dei cloroplasti, può portare alla sintesi di amido (figura 5). Le piante C_3 sono tipiche delle zone fredde-temperate; tra queste piante ricordiamo orzo, soia, segala, avena, graminacee foraggere delle aree temperate, leguminose foraggere.

Anche nelle piante C_4 , i processi della “fase oscura” cominciano con la carbossilazione del ribulosiodifosfato e decorrono poi regolarmente sino ad arrivare alla formazione di granuli d'amido primario. Nei cloroplasti delle cellule del mesofillo, nella piante C_4 , la ribulosiodifosfato-carbossilasi non è né concentrata né attiva; è, invece, presente un enzima che partendo da acido piruvico e ATP catalizza la formazione di acido fosfoenolpiruvico, nonché della carbossilasi che, catalizzando la fissazione di CO_2 sull'acido fosfoenolpiruvico, dà origine all'acido ossalacetico. Da qui, si ha la produzione di acido malico oppure acido aspartico (acidi bicarbossilici a quattro atomi di C) senza la produzione né di zuccheri né di conseguenza di amido (Figura 5).

Le piante C_4 sono tipiche delle zone tropicali, delle regioni a forte luminosità, secche ed umide, talvolta anche tipiche di terreni salati; tra queste piante ricordiamo il mais, il sorgo, il miglio, la canna da zucchero e le graminacee foraggere delle aree tropicali.

Figura 5. Ciclo fotosintetico delle piante C3 e C4



Fonte: Clark & Fritz, 1997

Le piante CAM (Crassulaceam Acid Metabolism), tipiche degli ambienti desertici, hanno la capacità di utilizzare entrambi i meccanismi di fissazione precedentemente descritti. Di giorno si comportano come piante C3 e durante la notte come piante C4. Esistono anche altri fattori che influenzano la composizione isotopica delle piante: la disponibilità di acqua che, nelle piante a ciclo fotosintetico C3, determina la chiusura degli stomi in caso di stress idrico apportando un arricchimento isotopico; processo opposto si verifica per le piante a ciclo fotosintetico C4; l'umidità relativa e la

temperatura. Nella tabella 7 sono riportati alcuni valori medi di $\delta^{13}\text{C}$ (‰) presenti in letteratura e riferiti a diverse piante costituenti la possibile dieta animale.

Tabella 7. Valori medi ($\delta^{13}\text{C}$) di composizione isotopica nella dieta

	Alimento	Origine	$\delta^{13}\text{C}$ ‰ Dieta	Riferimento
	Insilato di mais	Baviera (zona non montana)	-12 a -14	<i>Kornexl et al., 1997</i>
C4	Semi di mais	Baviera (zona non montana)	-11,2	<i>Rossmann et al., 1998</i>
	Semi di mais	Badajoz (Spagna)	-11,2	<i>González-Martin et al., 1999</i>
	Semi di mais	Sardegna	-12	<i>Camin et al., 2001</i>
	Semi di orzo	Baviera (zona non montana)	-26,1	<i>Rossmann et al., 1998</i>
C3	Semi di orzo	Badajoz (Spagna)	-22,1	<i>González-Martin et al., 1999</i>
	Soya	Badajoz (Spagna)	-25,4	
	Erba medica	Spagna	-27,5	
C3	Erba medica	Baviera (zona non montana)	-30	<i>Rossmann et al., 1998</i>
	Erba di pascolo	Sardegna	-28,3 ± 1,4	<i>Camin et al., 2001</i>
	Erba di pascolo	Trentino	-27,4 ± -0,4	
C3	Fieno trifoglio di	Baviera (zona non montana)	-28,1	<i>Rossmann et al., 1998</i>
	Fieno	Trentino	-28,7 ± 0,5	<i>Camin et al., 2001</i>
	Unifeed	Veneto	-24 ± 2,2	
	Mangime	Sardegna	-22 ± 3,7	
	Mangime	Trentino	-22 ± 2,4	

I dati in tabella 7 indicano che le piante C3 hanno un range di variazione di $\delta^{13}\text{C}$ tra -22‰ e -30‰; le piante C4 mostrano un range di variazione di $\delta^{13}\text{C}$ tra -11‰ e -14‰. Questi dati confermano quanto riportato da Galimov, 1966. Possiamo quindi affermare che le piante C4 sono più ricche di ^{13}C rispetto alle piante C3. Invece, le piante CAM mostrano un range di variazione di $\delta^{13}\text{C}$ tra -30‰ e -10‰ (Galimov, 1966).

Variatione del $\delta^{13}\text{C}$ nei prodotti di origine animale in rapporto alla dieta.

Nell'ambito zootecnico la determinazione del rapporto isotopico stabile (SIR, *Stable Isotope Ratio*) attraverso l'esame dei campioni di ruminanti o dei campioni fecali, permette di discriminare la dieta dell'animale distinguendo l'alimentazione costituita da piante C3 o C4 (Norman et al., 2009), o di ricostruire la storia alimentare dell'animale analizzando diversi tessuti animali come vello o zoccoli (Zazzo et al., 2007; Harrison et al., 2007). Numerosi lavori scientifici riguardano ovviamente il tema della tracciabilità del sistema di alimentazione. Di seguito vengono riportati i più importanti lavori sul tema che dimostrano come, nel latte così come nella carne, il rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sia correlato alla tipologia botanica del foraggio assunto dall'animale, in rapporto al fatto che le piante C4 sono più ricche di ^{13}C rispetto alle piante C3 (Moreno-Rojas et al., 2008); prodotti lattiero-caseari (Camin et al., 2008).

Latte. Già nel 1975 Minson e coautori avevano pubblicato su Nature un articolo in cui dimostravano che il contenuto in ^{13}C del latte è funzione del contenuto in ^{13}C dell'alimento ingerito dalla vacca. Il latte prodotto da vacche alimentate con piante C3, infatti, presenta un $\delta^{13}\text{C}$ più basso rispetto al latte prodotto da vacche alimentate con piante C4, come è evidente dai dati della tabella 8 la quale riassume i principali lavori

scientifici esaminati sul tema.

Tabella 8. Valori medi di $\delta^{13}\text{C}$ (‰) nelle diete e nel latte

	Alimento	$\delta^{13}\text{C}$ ‰ Dieta	$\delta^{13}\text{C}$ ‰ Latte	Riferimento
C3	Fieno di erba medica e granella di orzo	-25	-25.2 ± 0.5	<i>Boutton et al., 1988</i>
C4	Silomais e granella di mais	-11.5	-13.3 ± 0.4	
C3	Foraggio fresco e fieno	-27.4	-26.3	<i>Knobbe et al., 2006</i>
C4	Silomais (44% della dieta)	-19.9	-22	
C3	Rye-grass	-29.1	-28.5	
C4	Silomais	-12.6	-15.6	<i>Masud et al., 1999</i>
C3	Frumento e orzo (50/50)	-26.3	-25.3	
C3	Barbabietola	-23.3	-23.9	
C3/C4	Dieta mista (C3/C4 ~50/50)	-23.0	-21.7 ± 0.72	<i>Metges et al., 1990</i>
C3	Dieta no mais	-28.0	$-27.3 \div -26.2$	
C4	Dieta mais	-13.7	$-14.6 \div -13.9$	
C3/C4	Mais 42-43% SS	$-21.6 \div -20.1$	-20.3	<i>Camín et al., 2008</i>
	Mais 51-53% SS	$-20.1 \div -18.8$	$-19.7 \div -19.5$	

In alcuni lavori riportati in letteratura il valore di $\delta^{13}\text{C}$ del latte viene misurato sulla frazione proteica estratta dal latte o dal formaggio, quindi sulla caseina, perché sembra che il valore di $\delta^{13}\text{C}$ sia influenzato dal contenuto di grasso presente nel latte o nel formaggio; infatti, la frazione grassa mostra un valore di $\delta^{13}\text{C}$ inferiore rispetto alla frazione proteica (Kornexl et al., 1997). In più, si è dimostrato che durante il processo di

caseificazione non vi è un notevole frazionamento isotopico, perché il valore di $\delta^{13}\text{C}$ misurato nella caseina ha una alta correlazione con il valore di $\delta^{13}\text{C}$ misurato nel formaggio (Camin et al., 2002). Altro aspetto importante nel latte è la velocità di variazione del rapporto isotopico stabile conseguente ad una variazione di alimentazione; alcuni autori, a seguito di un brusco cambiamento di alimentazione (dieta C3 vs C4 e viceversa), hanno rilevato nel latte un immediato cambiamento del rapporto isotopico il quale tende a stabilizzarsi nell'arco di quattro giorni (Boutton et al. 1988; Wilson et al. 1988).

Carne. Dall'esame della letteratura consultata si evidenzia che, anche per la carne, il rapporto isotopico del carbonio $\delta^{13}\text{C}$ esprime chiaramente un legame con l'alimentazione basato sul rapporto tra piante C3 e C4 nella dieta dell'animale (tabella 9). Questo metodo di analisi, quindi, potrebbe essere utile per distinguere il sistema organico da quello convenzionale, visto che il regolamento del sistema di allevamento organico stabilisce che almeno il 60% della dieta debba essere costituita da foraggi di produzione aziendale e che nel sistema convenzionale, invece, il mais (come granella e/o come insilato) rappresenta il principale componente della dieta.

In tabella 9 sono riportati alcuni valori medi del rapporto isotopico stabile $\delta^{13}\text{C}$ in funzione della dieta esaminati in alcuni lavori scientifici.

Tabella 9. Valori medi di $\delta^{13}C$ (‰) nella carne in funzione della dieta

Animale	Dieta	$\delta^{13}C$ ‰ Carne	Riferimento
Ovini	Orzo	-24,64 a -23,71	<i>Moreno-Rojas et al., 2008</i>
	C3 Pascolo (erba fresca)	-26,78 a -25,95	
	C3 Convenzionale	-21,6 ± 1,0	<i>Minson et al., 1975</i>
	C4 Concentrato di mais	-20,15 a -19,25	<i>Moreno-Rojas et al., 2008</i>
Bovini	C4 Mais	-27 a -25	<i>Boner & Forstel 2004</i>
	C4 Convenzionale	-24,5 ± 0,7	<i>Schimdt et al., 2000</i>
	C4 Organico	-26,0 ± 0,2	

Studi recenti, condotti sulla carne di agnello, hanno dimostrato che il rapporto isotopico stabile è uno strumento di tracciabilità del sistema di alimentazione poiché permette di discriminare l'alimentazione al pascolo, solo con piante C3, da quella con concentrato, sia con piante C3 che con piante C4 (Moreno-Rojas et al., 2008).

I campioni di carne di agnello analizzati da Sacco e coautori (2005) sono di diverse razze e provengono da aziende dislocate in diverse zone della Puglia. Tutti gli agnelli sono stati alimentati principalmente con latte materno più una integrazione a base di mais, orzo, frumento, fave, carrube e avena; invece, gli agnelli di razza Merinizzata Italiana oltre al latte materno ricevevano una integrazione costituita solo da granturco. Dalle analisi isotopiche condotte su questi campioni gli autori hanno avvalorato quanto scoperto da Piasentier e coautori (2003), cioè i valori misurati di $\delta^{13}C$ sono notevolmente influenzati dal regime alimentare dell'animale e in modo particolare dalla presenza di piante C3 e C4. Simili risultati sono stati osservati nei bovini. Heaton e coautori (2008) hanno esaminato 200 campioni di carne bovina proveniente da diverse aree geografiche osservando che nessun campione di carne assumeva valori di $\delta^{13}C$

superiore a -20‰. Ciò indicava una alimentazione al pascolo e con foraggio costituiti solo da piante C3. Schmidt e coautori (2005), oltre a confermare l'ipotesi di Heaton e coautori (2008), hanno dimostrato che in altri Paesi Europei il valore di $\delta^{13}\text{C}$ oscilla tra -17‰ e -13‰. Concludendo possiamo affermare che anche la carne, così come visto per il latte (Boutton et al., 1998; Metges et al., 1990; Knobbe et al., 2006; Camin et al., 2008), ottenuta da animali alimentati con piante C3 può essere distinta da quella ottenuta da animali nutriti con piante C4 a causa dei diversi valori di $\delta^{13}\text{C}$.

La relazione tra la presenza di mais nella dieta ed i valori del $\delta^{13}\text{C}$ emerge anche in indagini condotte su altri tessuti o escreti animali come carne, sangue, fegato, reni, peli, feci (AA.VV. citati da Camin et al., 2008), siero ematico e CO_2 espirata (Metges et al., 1990) od urine (Knobbe et al., 2006). In più, recentemente Mannel e coautori (2007), Harrison e coautori (2007) e Zazzo e coautori (2008) hanno dimostrato che il valore del rapporto isotopico stabile del carbonio può essere utilizzato per tracciare il sistema di alimentazione dell'animale attraverso l'esame dei peli, della lana o dia tessuti prelevati dagli zoccoli.

3.3. Rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ($\delta^{18}\text{O}$)

Frazionamento isotopico dell'Ossigeno in natura.

Nella pianta, l'abbondanza isotopica dell'acqua dipende da quella dell'acqua assorbita dal terreno, legata a sua volta alle caratteristiche di quella di falda e quindi al ciclo planetario dell'acqua. Questo principio è conseguenza sia dei cicli di evaporazione degli oceani sia della successiva condensazione che porta alle precipitazioni. La composizione isotopica dell'ossigeno dell'acqua oceanica si approssima a quella del V-SMOW (0‰), ovvero allo standard interno per la misura del $\delta^{18}\text{O}$ nonostante sia

cambiata notevolmente nelle ere geologiche (tabella 5) (Clark & Fritz, 1997). Durante il fenomeno dell'evaporazione si ottiene un arricchimento dell'isotopo più leggero nel vapore; in caso di equilibrio, situazione mai raggiunta nella realtà, è stato stimato nel seguente modo:

$\delta^{18}\text{O}_{\text{vapore}} = -10\text{‰}$	per oceani a 20°C
$\delta^{18}\text{O}_{\text{vapore}} = -11,6\text{‰}$	per oceani a 10°C

Fonte: Clark & Fritz, 1997

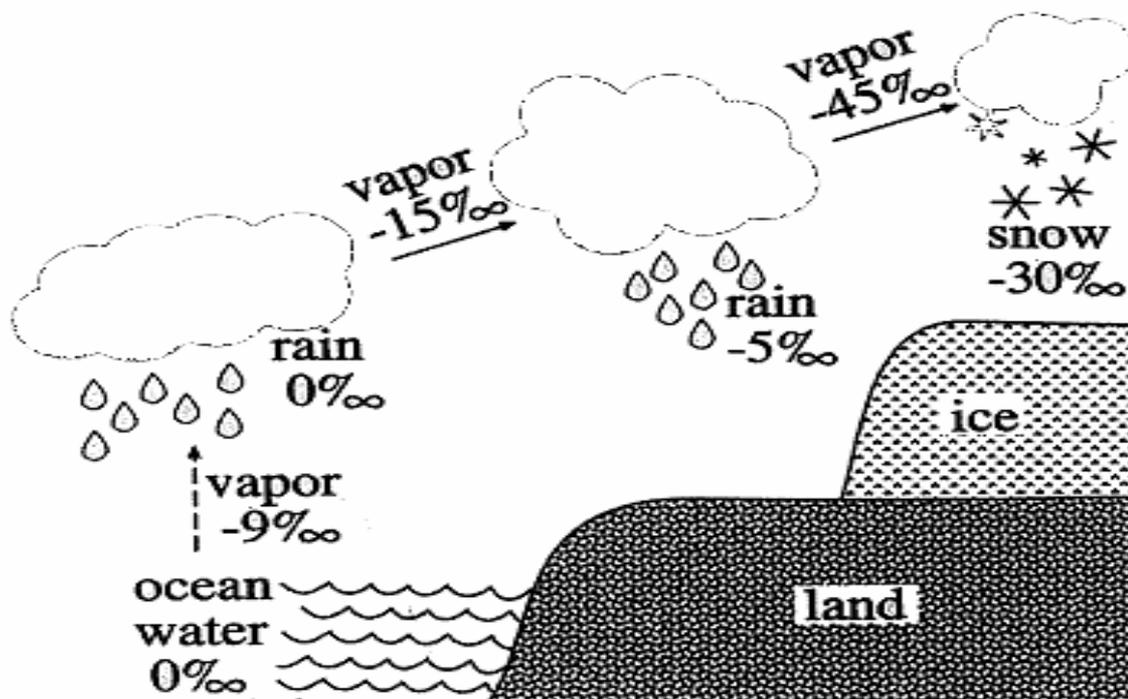
ottenendo, poi i seguenti valori nelle acque di precipitazione:

$\delta^{18}\text{O} = 1,5\text{‰}$	per precipitazioni a 15°C
$\delta^{18}\text{O} = 2,2\text{‰}$	per precipitazioni a 5°C

Fonte: Clark & Fritz, 1997

come si può notare, i valori dei rapporti isotopici non coincidono in quanto i processi di evaporazione e precipitazione risentono degli effetti isotopici (non di equilibrio) determinati da un basso tasso di umidità, dalla temperatura, dal vento e dal grado salino. Il frazionamento isotopico dell'ossigeno è principalmente dipendente dalla temperatura che controlla sia l'evaporazione, in cui si registra un arricchimento del vapore dell'isotopo più leggero, che la ricondensazione o precipitazione, che si verifica quando l'umidità raggiunge il 100% (figura 6).

Figura 6. Frazionamento isotopico in funzione della T



Fonte: Clark & Fritz, 1997

Esistono altri fattori che influenzano il valore di $\delta^{18}\text{O}$ nelle acque, quali la latitudine, la distanza dagli oceani, l'altitudine (fattori geografici). Infatti, nel periodo estivo si registra un arricchimento della composizione isotopica dell'acqua meteorica in ^{18}O soprattutto all'interno dei continenti.

Nelle piante il contenuto dei diversi isotopi dell'ossigeno dipende dall'acqua assorbita dal terreno; tuttavia, l'acqua vegetale a livello fogliare subisce un frazionamento isotopico a causa dei processi di evapotraspirazione. Questi processi sono influenzati da temperatura e umidità relativa, che portano ad un arricchimento dell'isotopo più pesante nelle stesse foglie. Quindi, le piante nei climi caldi e secchi tendono ad avere valori più alti di ^{18}O rispetto a piante presenti in luoghi freschi ed ambienti umidi. Nelle piante esistono altre fonti naturali di approvvigionamento di

ossigeno che sono la CO₂ e l'O₂ dell'aria che provocano un ingente frazionamento isotopico. Ad esempio il valore di $\delta^{18}\text{O}$ nella cellulosa è correlato con quello dell'acqua fogliare, con un arricchimento causato dai diversi frazionamenti isotopici che si verifica durante gli scambi tra il gruppo carbonilico e l'acqua (Schmidt et al., 2001).

Variatione del $\delta^{18}\text{O}$ nei prodotti di origine animale.

Per quanto riguarda i composti biologici di origine animale, i pochi dati disponibili confermano un andamento isotopico simile a quello descritto precedentemente nei composti vegetali. Quindi, l'acqua presente, nei composti di origine animale, deriva le sue caratteristiche da quella assunta dall'animale con l'acqua di bevanda e con il cibo. Anche negli animali la traspirazione conduce all'arricchimento dei livelli di ^{18}O nei loro tessuti rispetto ai valori di ^{18}O riscontrabili nell'acqua di bevanda, cioè nell'acqua piovana sotterranea (Rossmann et al., 2001).

Latte. Alcuni autori (Kornexl et al., 1997; Rossmann et al., 1998) e (Rossmann et al., 2000) hanno misurato i valori del rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ rispettivamente nell'acqua del latte e del burro, dimostrando che tali valori riflettono principalmente quelli dell'acqua di bevanda degli animali, pertanto possono essere considerati ottimi indicatori dell'area geografica di provenienza del prodotto animale. Kornexl e coautori (1997) ed Engel e coautori (2007) hanno osservato un aumento del valore del $\delta^{18}\text{O}$ nell'acqua del latte nella stagione di alimentazione al pascolo, rispetto al valore del $\delta^{18}\text{O}$ misurato con una alimentazione in stalla con foraggi conservati e concentrati.

Nel caso di Engel e coautori (2007) i valori più alti sono stati osservati in coincidenza con la presenza di un pascolo molto giovane e abbondante. Kornexl e coautori (1997)

hanno attribuito il risultato sia al fatto che le piante verdi contengono, rispetto all'acqua presente nel terreno, un'acqua arricchita dell'isotopo più pesante a causa della evapotraspirazione, sia al fatto che la traspirazione dell'animale al pascolo porta ad un arricchimento di ^{18}O nell'acqua corporea. In entrambe le indagini il pascolo era utilizzato nei mesi più caldi dell'anno, fatto che influisce sia sull'evapotraspirazione sia sulla traspirazione. Pur se questi lavori non hanno l'obiettivo di discriminare il tipo di alimentazione, i risultati sembrano confermare quelli ottenuti da Renou e coautori (2004b) e lasciano pertanto intravedere un possibile utilizzo del $\delta^{18}\text{O}$ quale mezzo di discriminazione dell'alimentazione al pascolo rispetto ad una alimentazione in stalla.

Carne. Il rapporto isotopico dell'ossigeno è stato misurato anche in altre matrici alimentari di origine animale, come per esempio nella frazione acquosa della carne. Anche in questo caso, il rapporto isotopico dell'ossigeno si è dimostrato un ottimo indicatore della provenienza geografica delle carni bovine (Nakashita et al., 2008). Studi condotti da Boner & Förstel (2004) e Renou e coautori (2004) hanno, infatti, dimostrato che anche per la carne esiste una correlazione diretta tra la composizione isotopica dell'acqua di bevanda ingerita dall'animale e quella dell'acqua corporea. Heaton e coautori (2008) hanno ottenuto simili risultati analizzando il $\delta^{18}\text{O}$ nella frazione lipidica della carne; questi risultati confermano, quindi, che per i valori di $\delta^{18}\text{O}$ esiste una forte correlazione tra il paese e la latitudine della regione di produzione dell'animale. Inoltre, Renou e coautori (2004a) hanno dimostrato che nella frazione acquosa della carne bovina c'è un arricchimento dell' ^{18}O legato al tipo di alimentazione, animali nutriti con insilato di mais presentano valori del $\delta^{18}\text{O}$ compresi tra -5,20 e -6,09‰ rispetto ad animali alimentati al pascolo, i quali presentano valori del rapporto isotopico $\delta^{18}\text{O}$ compresi tra -3,75 e -5,76‰, pur non essendo significativamente

correlati all'origine geografica. In più, gli stessi Autori hanno messo in luce un altro fattore che potrebbe influenzare il rapporto isotopico dell'¹⁸O cioè l'evapotraspirazione dell'acqua dal corpo dell'animale (via respiratoria e cutanea), in cui l'¹⁶O, che è l'isotopo più leggero, si perde più facilmente rispetto a l'¹⁸O che è l'isotopo più pesante. Un altro fattore che può influenzare il valore del rapporto isotopico dell'ossigeno è il processo di trasformazione e di stoccaggio della stessa carne (Heaton et al., 2008). In più gli Autori hanno riscontrato problemi legati sia alla reazione di pirolisi, la quale forma monossido di azoto, sia a una interferenza isobarica che provoca monossido di carbonio. Quindi, hanno ritenuto opportuno misurare il deuterio e l'¹⁸O presente nei lipidi della carne bovina, avendo cura di conservare i campioni al buio a una temperatura di -20°C in azoto fino al momento delle analisi onde evitare l'insorgere di reazioni di epossidazione.

3.4. Rapporto isotopico ¹⁵N/¹⁴N (δ^{15} N)

Frazionamento isotopico dell'Azoto in natura.

In natura l'azoto molecolare dell'aria viene trasformato attraverso processi fisici e attraverso l'attività di microrganismi in azoto inorganico (nitrati e ammoniaca) e in azoto organico (amminoacidi e proteine). Esse rappresentano le forme presenti e disponibili nel terreno.

Nella tabella 10 sono illustrati i diversi processi coinvolti nel ciclo dell'azoto ed i loro effetti sul rapporto isotopico nei composti che si originano dagli stessi processi.

Tabella 10. *Processi del ciclo dell'azoto che determinano frazionamento isotopico*

Processo	Descrizione	Frazionamento ‰
Fissazione	<ul style="list-style-type: none"> • reazioni che trasformano N molecolare dell'aria • attività batterica (enzima nitrogenasi nelle leguminose) 	-3‰ a +1‰ (<i>piante leguminose</i>) <i>Fogel & Cifuentes, 1993</i>
Assimilazione	Processo di incorporazione dei composti azotati da parte di microrganismi o piante	-0,5‰ <i>Hübner, 1986</i>
Dissimilazione	Reazioni metaboliche che sfruttano l'azoto assimilato	<i>Hübner, 1986</i>
Mineralizzazione	Reazione di trasformazione dell'azoto organico del terreno in ammonio	±1‰ <i>Hübner, 1986</i>
Nitrificazione	Processo ossidativo che produce nitrati di ammonio	-12‰ a -29‰ <i>Hübner, 1986</i>
Volatilizzazione	Reazione di volatilizzazione dell'ammonio come gas dal terreno all'atmosfera (molto accentuata in terreni alcalini)	+20‰ <i>Hübner, 1986</i>
Denitrificazione	Reazione di riduzione dei nitrati ad N ₂	Arricchimento di ¹⁵ N <i>Hübner, 1986</i>

I processi illustrati nella tabella 10 influenzano maggiormente la composizione dell'azoto nel suolo; tuttavia, anche altre componenti come la profondità del suolo, la vegetazione e il clima influenzano i valori di $\delta^{15}\text{N}$ nel terreno (Zuppi, 2002). In più, un terreno con elevata pendenza deprime il processo di denitrificazione portando a un impoverimento dell'isotopo ¹⁵N. Invece, comportano un arricchimento dell'isotopo ¹⁵N nel suolo sia situazioni di stress idrico e di vicinanza al mare (Heaton et al., 1987), sia una ottimale pratica di aratura (Zuppi, 2002). Nei terreni adibiti a coltura il fattore che influenza il tenore di ¹⁵N è la pratica della concimazione; pertanto, pratiche di concimazione intensiva con fertilizzante organico apportano un arricchimento in ¹⁵N nei composti azotati del suolo (Kreitler e Jones, 1975 citato da Werner et al., 2002). Inoltre, i fertilizzanti artificiali prodotti dalla fissazione di azoto atmosferico (urea, nitrato d'ammonio, nitrato di potassio) presentano un intervallo di $\delta^{15}\text{N}$ compreso tra -4‰ e

+4‰; i fertilizzanti di origine organica presentano un intervallo maggiore di $\delta^{15}\text{N}$ compreso tra +2‰ e +30‰.

I valori di $\delta^{15}\text{N}$ delle piante sono correlati a quelli dei nitrati e dell'ammonio presenti nel terreno nonché al frazionamento isotopico conseguente ai processi di *uptake* e soprattutto di assimilazione nei composti organici (Werner et al., 2002). Le piante leguminose o azoto fissatrici, quali trifoglio e erba medica, utilizzano come fonte di azoto (oltre ai nitrati e all'ammoniaca presenti nel terreno) l'azoto dell'aria che è isotopicamente più povero e quindi mostrano dei valori di ^{15}N bassi, intorno allo 0‰ (Yoneyama et al., 1995), cioè simile a quello dell'aria stessa. Peraltro le piante leguminose sono naturalmente più diffuse in terreni meno concimati.

Il valore del rapporto isotopico stabile dell'azoto nelle piante è compreso tra -0.28‰ e 7.1‰ (Knobbe et al., 2006; Camin et al., 2008 e Moreno-Rojas et al., 2008) e non sono state evidenziate differenze significative tra le piante C_3 e le piante C_4 (Heaton, 1987, cit. da Knobbe et al., 2006; Hübner 1986, cit. da Kornexl et al., 1997).

Variazione del $\delta^{15}\text{N}$ nei prodotti di origine animale.

L'elevata presenza dell'isotopo ^{15}N nel materiale biologico dell'animale e nei prodotti animali è fortemente correlata a quella della dieta (Kornexl et al., 1997; Manca et al., 2001; Piasentier et al., 2002). Si può ipotizzare che il rapporto isotopico dell'azoto $\delta^{15}\text{N}$ è un indice utile anche per la discriminazione dell'area di produzione. Steele & Daniel (1997) e De Niro & Epstein (1980) hanno dimostrato che nei composti animali, rispetto alla dieta, vi è un arricchimento di circa il 3‰ in $\delta^{15}\text{N}$, in quanto ogni stadio del metabolismo è accompagnato da un incremento di ^{15}N nei prodotti biosintetizzati, essendo l'isotopo più leggero ^{14}N eliminato con maggiore facilità.

Latte. Il valore del $\delta^{15}\text{N}$ nei prodotti lattiero-caseari riflette, attraverso le piante consumate dagli animali, la composizione isotopica del terreno (Camin e Versini 2001). Camin e Versini (2001) hanno osservato variazioni del rapporto isotopico $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nella caseina correlate alle condizioni pedologiche, geo-climatiche ed alle tecniche di fertilizzazione del suolo. Inoltre, hanno osservato un abbassamento del contenuto in ^{15}N nella caseina correlato ad un aumento, nel periodo estivo, dei processi di nitrificazione, mineralizzazione, assimilazione e denitrificazione dell'azoto nel suolo, fenomeni che contribuiscono ad abbassare il valore del rapporto isotopico $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nelle piante.

Versini e coautori (2000) e Camin e coautori (2001) hanno dimostrato che, anche attraverso la misura del rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$ si può distinguere il latte di montagna da quello di pianura; gli stessi autori hanno dimostrato che il $\delta^{15}\text{N}$ nel formaggio prodotto in montagna risulta relativamente basso.

Poiché non sono state evidenziate differenze significative tra le piante C_3 e le piante C_4 , come evidenziato in precedenza, i valori dei SIR dell'azoto nel latte risultano poco influenzati dalla presenza di mais nella dieta (tabella 11), al contrario di quanto avviene per i valori dei SIR del carbonio (tabella 8).

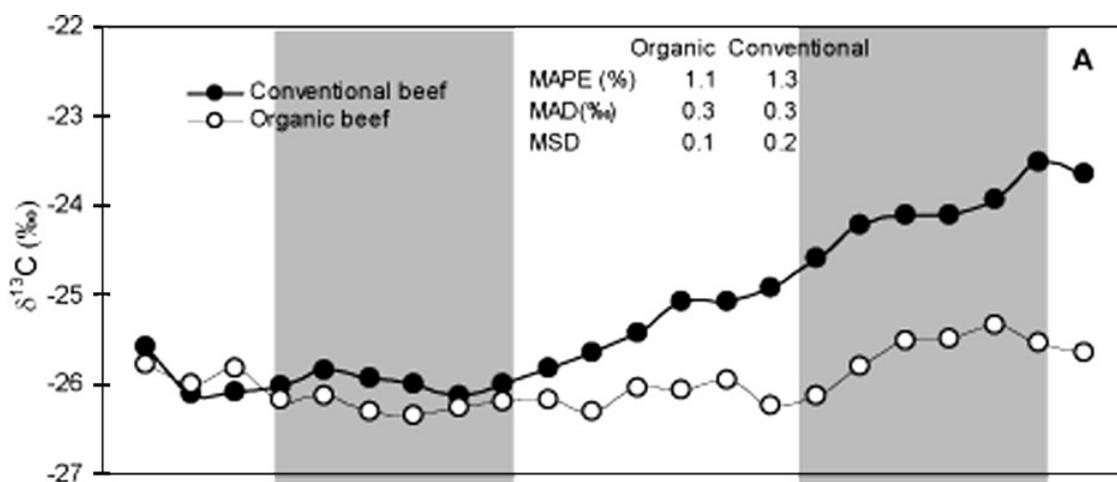
Tabella 11. Valori medi di $\delta^{15}\text{N}$ (‰) nelle diete e nel latte.

Alimento	$\delta^{15}\text{N}$ Dieta	$\delta^{15}\text{N}$ Latte	Riferimento
Foraggio fresco e fieno	1.4	3.7	<i>Knobbe et al., 2006</i>
Silomais (44% della dieta)	3.3	4.1	
Silomais	3.6	5.6	<i>Masud et al., 1999</i>
Frumento e orzo (50/50)	2.3	4.8	
Barbabietola	6.3	6.2	<i>Camin et al., 2008</i>
Mais 42-43% SS	2.4÷2.8	4.4÷5.0	
Mais 51-53% SS	2.4÷2.9	4.4÷5.3	

Carne.

Nella tabella 12 sono illustrati alcuni valori del rapporto isotopico stabile dell'azoto misurato sulla carne in funzione della dieta somministrata agli animali. Uno studio condotto da Bahar e coautori (2008) ha evidenziato che le carni di bovini alimentati con un sistema convenzionale hanno un valore medio di $\delta^{15}\text{N}$ di 7,0‰ poco variabile durante tutto l'anno invece, le carni di bovini alimentati con sistema organico presentano una maggiore variabilità e un valore medio di $\delta^{15}\text{N}$ più basso durante tutto l'anno (figura 7). I più bassi valori osservati con il sistema organico potrebbero essere legate al tipo di alimentazione, basata su erba di graminacee e trifoglio in estate e sulla presenza di granelle di leguminose in inverno (Rossman, Versini 1998 citato da Bahar et al., 2008).

Figura 7. Andamento del rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$ in animali alimentati con mangime convenzionale e mangime organico



Fonte: Bahar et al., 2008

Tabella 12. Valori medi di $\delta^{15}\text{N}$ (‰) nella carne in funzione della dieta.

Dieta	$\delta^{15}\text{N}$ ‰ Carne	Riferimento
Pascolo + granella cereali	6	
Granella di mais	6,2	<i>Heaton et al., 2008</i>
Mais	5,8	
Convenzionale	$7,8 \pm 0,4$	<i>Hebert & Wassenaar</i>
Organico	$6,6 \pm 0,4$	<i>2001</i>

3.5. Rapporto isotopico $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ($\delta^{34}\text{S}$)

Lo zolfo è un importante bioelemento implicato in fondamentali funzioni della vita. I ponti di di-solfuro sono fondamentali sia per la struttura secondaria e terziaria di molte proteine, sia perché sono una parte funzionale di molti siti degli enzimi e sia perché sono indispensabili nei sistemi di trasporto degli elettroni (Tanz et al., 2010). Krouse e coautori (1991), studiando il rapporto isotopico dello zolfo, hanno evidenziato che, nelle piante, la concentrazione media dello zolfo, a livello mondiale, è inferiore a 1‰ rispetto a quello misurato nella biomassa animale che non supera il 2‰. Nelle piante la maggiore quantità di zolfo organico si presenta sotto forma di due amminoacidi, la cisteina e la metionina.

Lo zolfo ricopre un ruolo importante, anche, per determinare l'origine dei prodotti alimentari mediante la misura del rapporto isotopico stabile ($\delta^{34}\text{S}$). Sia nelle piante che nei campioni di origine animale, nella fattispecie in campioni di carne sgrassata, la misura del $\delta^{34}\text{S}$ si effettua sulle proteine solubile (Tanz et al., 2010).

Camín e coautori (2007) e Rossmann e coautori (2007) in recenti studi hanno dimostrato che lo zolfo presente nelle piante si trasferisce nei tessuti animali senza subire particolari frazionamenti isotopici.

In letteratura non esistono lavori i quali dimostrano che gli animali non sono in grado di ridurre e sintetizzare lo zolfo, ma lo devono ricevere con la dieta. Le maggiori fonti di solfato sono i vegetali e l'acqua potabile.

Richards e coautori (2003) hanno condotto il loro lavoro di ricerca su due cavalli nutriti con una alimentazione sperimentale controllata. Da questo studio si evince che, i valori del rapporto isotopico stabile dello zolfo misurati sia nella dieta dell'animale (a base di piante C3) e sia nella cheratina del crine evidenziano tra loro un piccolo frazionamento isotopico ($\delta^{34}\text{S} = 1\text{‰}$). Di contro, in animali alimentati con una dieta a base di piante C4 (che rischia di contenere per l'animale un basso contenuto di proteine digeribili) il frazionamento isotopico è più alto $\delta^{34}\text{S} = 4\text{‰}$.

OBIETTIVI DEL LAVORO

Fin dai tempi antichi l'uomo ha sempre vissuto di allevamento, apportando nell'arco degli anni delle innovazioni che hanno sempre più modificato le esigenze dell'uomo e dell'animale, come ad esempio le nuove tecniche di allevamento e la formulazione di concentrati che apportano un maggiore livello energetico e proteico all'animale. Di contro tutto questo ha innalzato notevolmente i costi di gestione dell'allevamento.

È noto che, l'alimento principe del sistema di allevamento di animali in biologico è stato il pascolo. Tuttavia, nelle aree del Mediterraneo, per ragioni climatiche, la disponibilità di pascolo è spesso un fattore limitante dei sistemi di produzione animale. Di conseguenza, nella pratica zootecnica, gli animali non sono allevati sempre al pascolo ma completano il loro accrescimento in stalla ove sono alimentati con diete ricche in energia per favorire la deposizione di grasso; tale pratica prende il nome di finissaggio.

L'originalità della mia ricerca di Dottorato, condotta nell'arco temporale di tre anni, consiste nel valutare la possibilità di tracciare il sistema di alimentazione, mediante l'uso dei SIR. Sono stati simulati due diversi periodi di finissaggio, breve (14 giorni) e lungo (37 giorni), in confronto ad animali che vengono alimentati o solo al pascolo o solo in stalla. Inoltre, altro aspetto originale della suddetta ricerca consiste nell'impiego esclusivo di piante C3 nell'alimentazione degli animali in antitesi al tipo di alimentazione comunemente riportato in letteratura in cui si confrontano piante C3 e piante C4.

In questa prima fase sperimentale di ricerca si analizzano le seguenti matrici:

sangue (plasma ed eritrociti) e carne, al fine di effettuare una correlazione tra componenti in vivo e post-mortem.

Oggi, la possibilità di tracciare un periodo di finissaggio direttamente dalla carne potrebbe essere uno strumento estremamente importante per le certificazioni del sistema di alimentazione degli animali. Ad esempio si ricorda il caso dell'agnello Welsh IGP, un prodotto che deve essere ottenuto esclusivamente da agnelli alimentati con solo latte materno e pascolo. In più, poter tracciare il sistema di alimentazione attraverso il sangue permette di tracciare il tipo di alimentazione dell'animale in vivo.

Il secondo obiettivo perseguito nell'ambito dello stesso progetto di ricerca consiste nell'indagare la cinetica dei rapporti isotopici nel periodo immediatamente conseguente alla variazione brusca dell'alimentazione.

In letteratura è riportata qualche esperienza simile sul latte vaccino (Boutton et al., 1988; Wilson et al., 1988), in cui sono state valutate le variazioni del SIR del carbonio conseguenti al passaggio brusco di alimentazione da piante C3 a piante C4 e viceversa.

In questo secondo obiettivo, l'originalità della ricerca consiste nell'osservare la cinetica del SIR nel sangue in animali alimentati esclusivamente con piante C3.

La parte in vivo della prova sperimentale è stata condotta presso una azienda della Calabria sita in località San Costantino e le analisi sperimentali sono state condotte, sempre da me, presso il laboratorio sperimentale del centro **IASMA**, *Research Center Agrifood Quality Department*, in San Michele all'Adige (TN).

MATERIALI E METODI

5.1. Animali ed alimentazione sperimentali

La prova sperimentale in vivo è stata condotta in una azienda della Calabria (38 ° 38 'N, 16 ° 04' E) sita in località S. Costantino, tra Novembre 2008 e Aprile 2009. Sono stati allevati quaranta agnelli maschi di razza Merinizzata Italiana, nati il 16 (\pm 10 giorni) del mese di Ottobre e svezzati a circa sessanta giorni di età (18 Dicembre) dalle loro madri. Durante il periodo transitorio di adattamento, durato quindici giorni, gli animali sono stati abituati ad una progressiva sostituzione della dieta, passando da un concentrato di svezzamento e latte materno alla dieta sperimentale. Quindi, gli animali sono stati divisi in quattro gruppi sperimentali in base alla loro alimentazione. Come si evince dalla tabella 15, dal 2 gennaio ha avuto inizio la fase di alimentazione sperimentale (2 gennaio = giorno 1 della alimentazione sperimentale). Dieci agnelli (gruppo stalla, S) sono stati tenuti in box singoli e nutriti, per tutti gli 89 giorni della prova sperimentale, con un concentrato costituito per il 64% da orzo, il 34% da cece e il 2% di un integratore minerale vitaminico; inoltre è stato anche somministrato circa 100 g/d di fieno polifita. La dieta sperimentale assunta dagli animali è stata settimanalmente adeguata in modo da consentire incrementi medi giornalieri simili a quelli rilevati negli animali del gruppo pascolo. In media gli animali del gruppo stalla (S) hanno ricevuto 600 g/d di mangime e circa 100 g/d di fieno polifita. Dieci agnelli (gruppo pascolo, P) sono stati condotti giornalmente, e per tutti gli 89 giorni della prova sperimentale, al pascolo su un prato polifita naturale costituito in prevalenza da circa l'80% di graminacee e il 20% da leguminose (6-7 h/d, ore di pascolamento giornaliero; pascolo recintato, pascolamento continuo); qui gli animali hanno mangiato ad libitum.

Gli altri venti agnelli sono stati divisi in due gruppi; dieci agnelli dopo un periodo di cinquantadue giorni al pascolo, hanno subito un brusco cambio di alimentazione, passando dall'alimentazione al pascolo a quella in stalla in cui ricevevano lo stesso mangime sperimentale del gruppo S. Questo periodo è durato trentasette giorni (gruppo pascolo-stalla 37 giorni, P-S37). I restanti dieci agnelli dopo un periodo di settantacinque giorni al pascolo, hanno subito un brusco cambio di alimentazione, passando dall'alimentazione al pascolo a quella in stalla con lo stesso mangime sperimentale del gruppo S. Questo periodo è durato quattordici giorni (gruppo pascolo-stalla 14 giorni, P-S14). Gli agnelli del gruppo S sono stati allevati in box singoli coperti, invece, gli agnelli dei gruppi P-S37 e P-S14, nel periodo di pascolamento erano alloggiati in box multipli coperti, mentre nel periodo di finissaggio sono stati ricoverati in box singoli coperti. Gli agnelli del gruppo P la sera sono stati alloggiati in box multipli coperti. Tutti gli agnelli sono stati pesati settimanalmente per poter calcolare la razione alimentare giornaliera degli animali alimentati in stalla. Gli animali in stalla avevano sempre a disposizione l'acqua di bevanda. Il 1° aprile, cioè dopo ottantanove giorni di prova sperimentale gli agnelli sono stati macellati.

Nella tabella 13 è riportato lo schema dei giorni di alimentazione della prova:

Tabella 13. *Schema giorni di dieta alimentare*

Fase	Periodo	Durata (giorni)	Alimentazione
Pre-sperimentale	18 dic. - 01 gen.	15	Concentrato di svezzamento + latte materno
Stalla (S) o pascolo (P)	02 gen. - 31 mar.	89	Concentrato sperimentale o pascolo
P-S37 (<i>fase al pascolo</i>)	02 gen. - 22 feb.	52	Pascolo
P-S37 (<i>fase in stalla</i>)	23 feb. - 31 mar.	37	Concentrato sperimentale
P-S14 (<i>fase al pascolo</i>)	02 gen. - 17 mar.	75	Pascolo
P-S14 (<i>fase in stalla</i>)	18 mar. - 31 mar.	14	Concentrato sperimentale

Durante la prova in vivo sono stati effettuati dei prelievi di sangue, finalizzati ai due obiettivi tracciabilità del sistema di alimentazione e cinetica di variazione del rapporto isotopico a seguito del brusco cambio di alimentazione.

Relativamente al primo obiettivo, un campione di sangue è stato prelevato da ciascun animale in prova il giorno prima della macellazione, allo scopo di potere correlare i dati ematici con quelli del muscolo. Relativamente al secondo obiettivo, i prelievi sono stati eseguiti sul gruppo P-S14, dal giorno in cui è avvenuto il passaggio brusco dal pascolo alla stalla, sino al giorno precedente la macellazione, secondo la cadenza riportata nella tabella 14. La scelta è ricaduta su questo gruppo per ridurre la possibile influenza della alimentazione della fase pre-sperimentale sulla composizione isotopica del sangue. Gli animali di questo gruppo, infatti, si alimentavano al pascolo già da 75 giorni.

Di seguito, nella tabella 14, sono riportati i giorni in cui è stato effettuato il prelievo di sangue su tutti gli animali in vivo:

Tabella 14. Schema dei giorni di prelievo sangue per gli animali del gruppo P-S14.

day 75	inizio fase di alimentazione in stalla per il gruppo P-S14
day 76	prelievo sangue
day 78	prelievo sangue
day 81	prelievo sangue
day 89	giorno prima della macellazione

5.2. Campionamento e tecniche di conservazione

Alimenti: Per tutta la durata del periodo sperimentale sono stati effettuati: un campionamento di fieno e concentrato sperimentale; sette campionamenti di pascolo. I campioni sono stati opportunamente essiccati in stufa ventilata a 60°C per quattro giorni e successivamente macinati con griglia di dimensioni pari a 1,0 mm quindi, conservati in contenitori a chiusura ermetica.

Sangue: Tutti i campionamenti di sangue sono stati effettuati al mattino, prima della somministrazione della dieta o dell'immissione al pascolo, prelevando dalla vena giugulare 10 ml di sangue con provette in EDTA. Subito dopo, il sangue è stato centrifugato per 15 minuti a 4°C a 3000 g. Plasma ed eritrociti così separati sono stati conservati in provette Eppendorf a -20°C sino al momento delle analisi. La metodologia di trattamento dei campioni ricalca quella eseguita da Norman e coautori, (2009).

Carne: Gli animali sono stati macellati giorno 01 aprile 2009, all'età media di 167 giorni presso uno stabilimento di macellazione pubblico a norma per gli ovini, sito a quindici chilometri dall'azienda. Durante la macellazione è stato effettuato il

campionamento di circa 50 grammi di muscolo *Longissimus dorsi* (10°-13° costola) dalla mezzena sinistra, a caldo. I campioni, avvolti in un foglio di alluminio, sono stati confezionati sotto vuoto e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi. La metodologia di trattamento dei campioni si basa su quanto eseguito nella prova sperimentale condotta da Moreno-Rojas e coautori (2008).

5.3. Metodiche analitiche

La determinazione dei rapporti isotopici nei campioni di alimenti, plasma, eritrociti e carne è stata eseguita presso il laboratorio del centro IASMA Research Center, Agrifood Quality Department, San Michele all'Adige (TN), sotto la guida della dott.ssa Federica Camin e del tecnico di laboratorio Luca Ziller.

Di ogni componente in analisi si è pesata una quantità tale da ottenere un contenuto in carbonio, azoto o ossigeno simile a quello degli standard utilizzati nell'analisi, al fine di garantire una maggiore precisione nei risultati. La quantità di campione ottimale viene calcolata in base al valore dell'area del picco, riportato sul report di analisi, di un campione prova in modo da eguagliarla a quella dello standard interno.

Alimenti

Tutti gli alimenti campionati sono stati essiccati in stufa ventilata a 60°C per quattro giorni e successivamente macinati in un mulino con griglia di dimensioni pari a

1,0 mm. Sono stati pesati in media 13,25 mg di campione macinato con una bilancia microanalitica avente una precisione pari a 0,002 mg, in microcapsule ($\varnothing = 4$ mm; h = 6 mm) monouso di stagno per la determinazione del $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e del $\delta^{34}\text{S}$ e di argento per la misura del $\delta^{18}\text{O}$ e del $\delta^2\text{H}$. Il rapporto isotopico stabile di C, N, O, H e S è stato misurato con lo Spettrometro di Massa Isotopica.

Sangue: plasma e eritrociti

I campioni di plasma congelati sono stati liofilizzati (48 h) con liofilizzatore Hetosicc Laboratory Type CD 52-1. Sono stati pesati 0,5 mg di campione liofilizzato con una bilancia microanalitica avente una precisione pari a 0,002 mg, in microcapsule ($\varnothing = 4$ mm; h = 6 mm) monouso di stagno per la determinazione del $\delta^{13}\text{C}$ e del $\delta^{15}\text{N}$ e di argento per la misura del $\delta^{18}\text{O}$. Le capsule sono state chiuse con una pinzetta e pressate bene per eliminare la presenza di aria all'interno. Le capsule sono state poste nel tamburo dell'autocampionatore dello Spettrometro di Massa Isotopica (IRMS) per analizzare il rapporto isotopico di C e N.

Lo stesso procedimento è stato seguito per gli eritrociti liofilizzati.

Carne

Ciascun campione di carne (circa 50 grammi) congelato è stato liofilizzato, per 48 ore, con liofilizzatore Hetosicc Laboratory Type CD 52-1 e successivamente macinato. Il campione così trattato è stato sottoposto a due fasi di sgrassatura con una quantità totale di 150 ml di etere etilico (per facilitare l'estrazione si omogenizza con Ultraturrax per tre minuti a 20500 giri) centrifugando ogni volta a 2000 giri per quattro minuti per separare la frazione eterea contenente appunto i grassi della carne. Se dopo la seconda estrazione il campione presenta ancora un colore giallo intenso (determinato da un

elevato quantitativo di grasso) è opportuno estrarre nuovamente. La fase eterea è stata filtrata e l'etere è stato fatto evaporare con Rotavapor (40°C) recuperando così il grasso della carne. Dopo essere stati centrifugati i campioni sono stati messi in un bagnetto per 12 h a 60°C. Sono stati pesati 0,5 mg di campione con una bilancia microanalitica avente una precisione pari a 0,002 mg, in microcapsule ($\varnothing = 4$ mm; h = 6 mm) monouso di stagno per la determinazione del $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e del $\delta^{34}\text{S}$, e analizzati i rapporti isotopici stabili di C, N e S con la Spettrometro di Massa Isotopica (IRMS). Per calcolare il rapporto isotopico del deuterio e dell'ossigeno il campione (0,5 mg) è stato pesato in microcapsule di argento. Una quantità di 0.320 mg di grasso è stata pesate in microcapsule di stagno ed analizzata con lo Spettrometro di Massa Isotopica per rilevare il rapporto isotopico del C.

5.3.1. Descrizione tecnica degli strumenti utilizzati e dei principi di funzionamento.

Liofilizzatore

In figura 8 è raffigurato il liofilizzatore Hetosicc Laboratory Type CD 52-1. Esso è costituito da un condensatore in cui si trova una serpentina interna a temperatura di -50, -60°C, la quale ha lo scopo di bloccare i vapori dovuti alla sublimazione del ghiaccio (passaggio da acqua solida a vapore) grazie alla presenza di una pompa a vuoto rotativa (circa 1; 0,1 mBar).

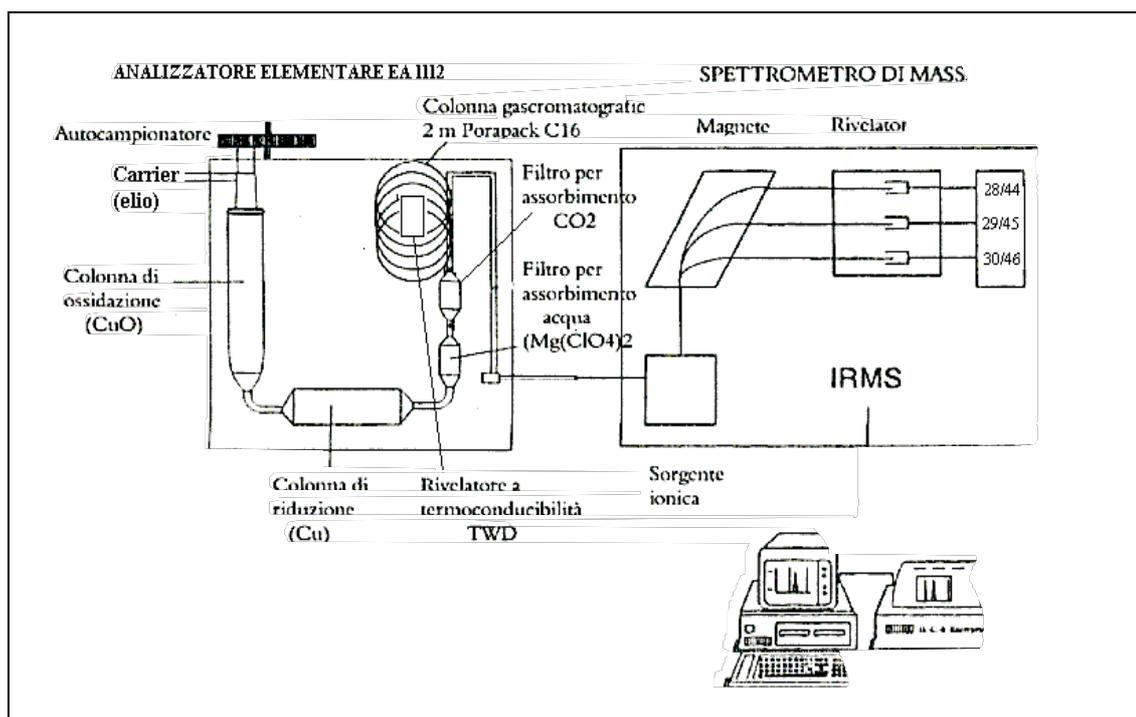
Figura 8. *Liofilizzatore Hetosicc Laboratory Type CD 52-1*



Spettrometro di Massa Isotopica (IRMS Isotope Ratio Mass Spectrometer)

Per eseguire le misurazioni del rapporto isotopico di C, N e O si devono utilizzare due strumenti interfacciati tra loro: sia un analizzatore elementare o un pirolizzatore con una colonna gascromatografica per la separazione dei gas; sia uno spettrometro di massa isotopica. In questo modo il campione subisce prima una fase di combustione o pirolisi, ottenendo così le rispettive molecole di gas CO_2 , N_2 e CO , successivamente subisce l'analisi spettroscopica dei diversi isotopomeri delle speci considerate. La figura 9 illustra le due strumentazioni ed il loro collegamento.

Figura 9. Analizzatore elementare interfacciato con uno spettrometro di massa



Analizzatore Elementare di Azoto, Carbonio e Zolfo (Finnigan™ FlashEA 1112)

L'analizzatore elementare permette la combustione degli analiti con formazione rispettivamente dei gas CO₂ e N₂ o CO. Nelle nostre condizioni operative e cioè per l'analisi del rapporto isotopico del carbonio e dell'azoto, le fasi operative sono le seguenti:

1. l'analisi inizia con l'introduzione del campione solido nel tamburo dell'autocampionatore. Il campione arriva all'interno del reattore di combustione, mantenuto alla temperatura di 900°C, sotto un flusso continuo di elio, utilizzato come carrier. Il gas carrier (He) è arricchito con ossigeno il quale permette la combustione del campione. L'effetto sinergico dell'alta temperatura e della presenza di ossigeno causa una combustione istantanea, chiamata "flash"

combustion” la quale converte tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti di combustione. La seconda parte del reattore di combustione è riempita con dei catalizzatori (Cr_2O_3 - Co_3O_4) i quali completano l’ossidazione con formazione di gas, CO_2 , N_2 , N_xO e H_2O ;

2. i gas prodotti dalla combustione, vengono flussati, sempre dal gas carrier (He), nel reattore di riduzione, questo è riempito con rame metallico ridotto mantenuto ad una temperatura costante di 680°C . Il reattore ha la funzione di eliminare l’eccesso di O_2 e ridurre gli ossidi di azoto elementari NO_x a N_2 .

Entrambi i due reattori sono costituiti da tubi di quarzo posti all'interno di un forno, riscaldati da un elemento elettrico e isolati con materiale refrattario. Le temperature di ciascuna camera sono misurate con una termocoppia Pt Pt/Rh 10%.

3. successivamente, si incontra un filtro assorbente (tubo in pyrex) costituito da magnesio perclorato, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ che trattiene l’ H_2O . Nel caso dell’analisi dell’azoto si ha anche una trappola ad ascarite (NaOH -asbesto) per trattenere la CO_2 ;
4. quindi, le molecole gassose raggiungono la colonna gascromatografica impaccata che è posizionata insieme al rivelatore, entrambe si trovano all’interno di una camera termoregolata elettronicamente. La colonna impaccata è una Porapak QS, 80-100 mesh, 6x4 mm (OD/ID) lunga tre metri. Essa ha una

fase stazionaria "mista" costituita da polimeri porosi di etilvinil benzene in crosslinking con divinilbenzene. Il polimero può essere disattivato con un processo di silanizzazione: infatti, i gruppi SiOH possiedono una grande affinità con le molecole organiche e tendono a trattenerle creando così problemi di asimmetria dei picchi cromatografici. La colonna opera qui la separazione dei gas (N₂ e CO₂);

5. alla fine della colonna gascromatografica c'è un rivelatore a termoconducibilità (*TCD Thermo Conductibility Detector*) o a doppio filo caldo (*HWD Hot Wire Detector*). Il rivelatore è costituito da due sensori, attraversati da una debole corrente elettrica. Un sensore è lambito di gas puro (N₂ o CO₂) e l'altro dal gas in uscita dalla colonna (He). Il principio sul quale si basa il funzionamento dello strumento è la variazione di resistenza dei due sensori in funzione della temperatura. Essendo i due sensori posizionati all'interno di celle termostate (T=160°C) sono soggette ad un unico fenomeno che determina un cambiamento di temperatura e cioè la conducibilità termica del gas flussato (He), restituendo così un segnale elettrico il quale sarà indirizzato al registratore.

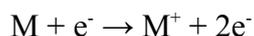
Per l'analisi del rapporto isotopico dello zolfo come SO₂ si deve modificare la configurazione dello strumento rispetto a quella precedentemente descritta. Si utilizza una sola colonna di combustione-riduzione riempita con l'agente ossidante (CuO) e con l'agente riducente (Cu) ad una temperatura di 1000 °C. La temperatura di 1000°C evita che la temperatura dell'agente riducente (Cu) non sia in nessuna parte inferiore agli 830°C, temperatura alla quale si può formare rame solfato. All'uscita della colonna di ossidazione-riduzione è posto un filtro contenente Mg(ClO₄)₂ dove l'H₂O viene

assorbita. Il flusso di gas raggiunge quindi, la colonna gascromatografica impaccata termostata a 70°C. La colonna gascromatografica è una Porapak QS, 80-100 mesh, 6x4 mm (OD/ID) x 0.8 metri, avente un trattamento della superficie metallica in Sulfinert® per minimizzare i fenomeni di assorbimento della SO₂ da parte del metallo.

Spettrometro di massa isotopica (FinniganTM DELTA PLUS XP)

Le molecole gassose una volta separate raggiungono lo spettrometro di massa isotopica, costituito da tre componenti essenziali:

- *Sorgente ionica.* È del tipo ad “urto elettronico” (figura 10). Gli elettroni vengono emessi da un filamento caldo di torio e accelerati da un potenziale elettrico applicato tra il filamento e l'anodo. Nella camera di ionizzazione le molecole incontrano un fascio perpendicolare di elettroni generando ioni monopositivi a carica unitaria ottenuti secondo la seguente reazione:



dove M rappresenta la molecola di analita e M⁺ il suo ione radicale con lo stesso peso della molecola. Questi ioni monopositivi mediante degli *split* vengono indirizzati e accelerati verso il flight tube.

Figura 10. Sorgente ionica

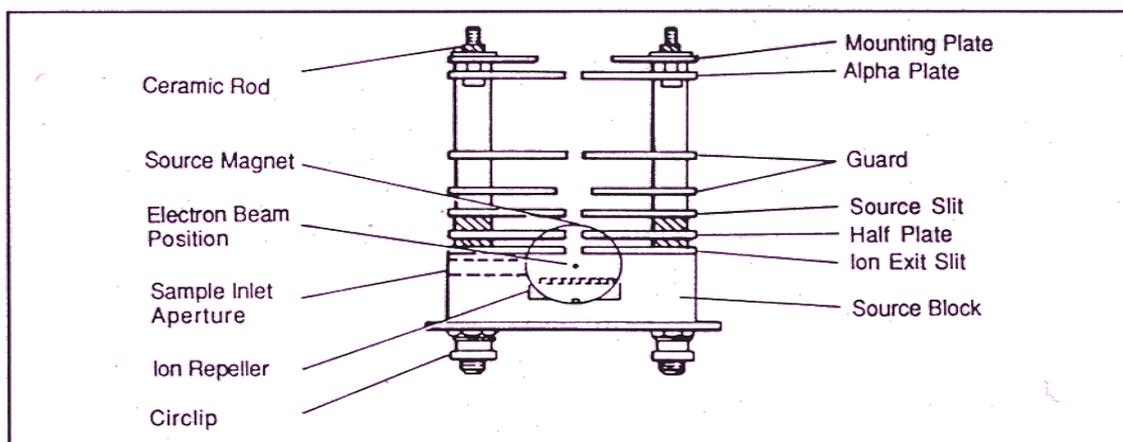


Figure 2.6 - Ion Source

- *Flight tube.* Il fascio di ioni viene accelerato lungo il tubo di volo, semicircolare, posto tra i poli di un magnete permanente, qui, tramite una pompa diffusiva, si crea un alto vuoto (10^{-9} mbar) al fine di assicurare ad ogni ione un cammino libero nel tubo di volo evitando collisioni durante la traiettoria. La traiettoria descritta dagli ioni dipende dalle due forze in gioco, nello specifico dalla forza magnetica e dalla forza centripeta. Nello spettrometro di massa isotopica vi è un magnete il quale determina una diversa accelerazione degli ioni indirizzandoli verso tre collettori detti gabbie di Faraday.
- *Collettore ionico o rivelatore (gabbia di Faraday)* (Figura 11). Il tubo di volo forma un arco per far sì che le particelle che lo colpiscono non vengano riflesse verso l'entrata della coppa. Qui il fascio ionico viene convertito in impulso elettrico e poi amplificato. La corrente ionica della gabbia è proporzionale al numero di ioni incidenti che colpiscono il collettore nell'unità di tempo. Lo spettrometro di massa isotopica è fornito di tre collettori con tre diverse

fenditure di risoluzione. La fenditura della sorgente, che è quella più stretta, accetta il fascio di ioni dell'isotopo di massa centrale mantenendo dunque una buona risoluzione e eliminando ioni indesiderati; la fenditura alfa (a potenziale nullo) e la fenditura di risoluzione, che sono le più larghe, ricevono i fasci degli ioni di massa maggiore e minore, permettendo di accettare fasci di ioni di gas differenti senza l'ausilio di collettori mobili (Figura 12).

Figura 11. *Schema di funzionamento separatore delle masse nello spettrometro*

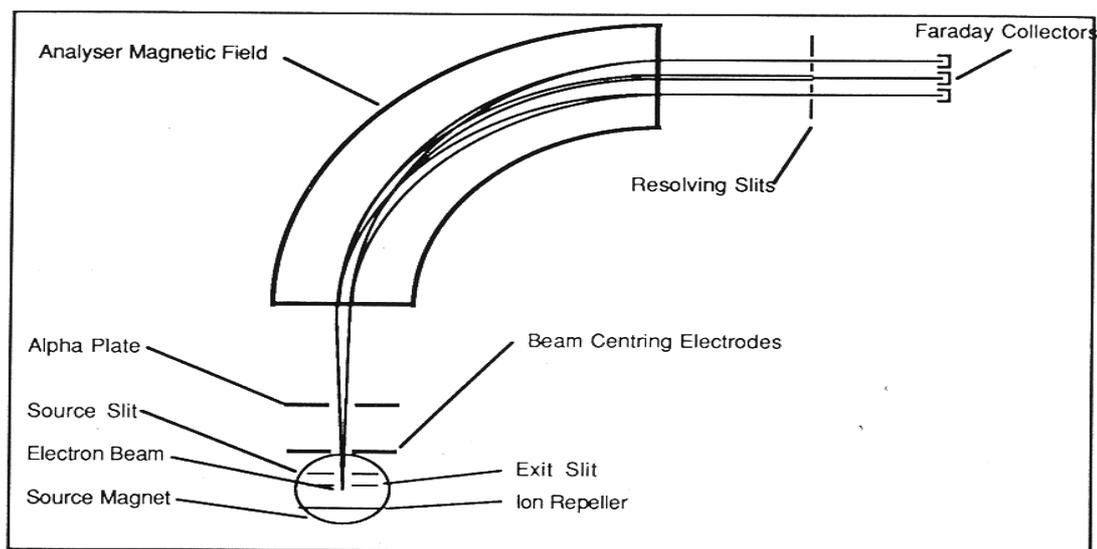


Figure 1.1 - Mass Separation Diagram

Figura 12. Schema dei tre collettori del SIRA serie II

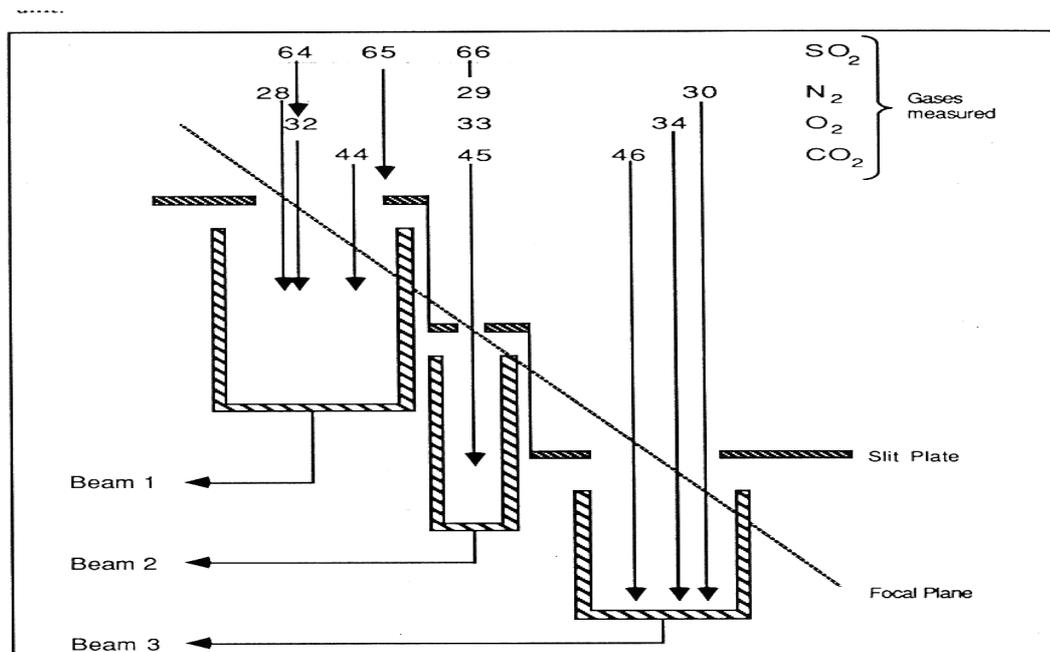


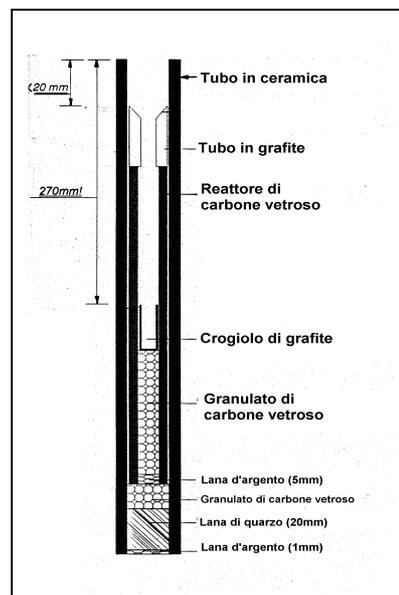
Figure 2.8 - Universal Collector Schematic

Analizzatore elementare di Deuterio e Ossigeno. FinningTM TC/EA

Con questa analisi si misura l'ossigeno molecolare infatti si utilizza una pirolisi a $T=1450^{\circ}\text{C}$. Il campione si inserisce nel tamburo dell'autocampionatore da qui passa alla colonna di pirolisi. La colonna esternamente è costituita da un rivestito di ceramica, all'interno vi è un tubo costituito esternamente da ossido di alluminio (allumina Al_2O_3) e da un reattore di pirolisi interno di carbone e quarzo vetroso. Inoltre, per garantire la durata del reattore, al suo interno sono inseriti pezzetti di grafite (*Glassy carbon* che sono donatori di carbonio). Ad alte temperature la grafite cede O_2 . Le molecole arrivano alla colonna gascromatografica attraverso una sola colonna impaccata a setacci molecolari con diametro di 5 \AA ed è lunga sessanta centimetri. La colonna è in grado di separare il CO dall' N_2 le quali hanno la stessa massa. La fase stazionaria è costituita da un solido poroso (granuli di silicato di alluminio), qui le molecole del gas penetrano e sono trattenute e adsorbite per un certo tempo. La separazione delle molecole avviene in

base alle dimensioni delle stesse molecole. In figura 13 è illustrato lo strumento e il particolare della colonna di pirolisi.

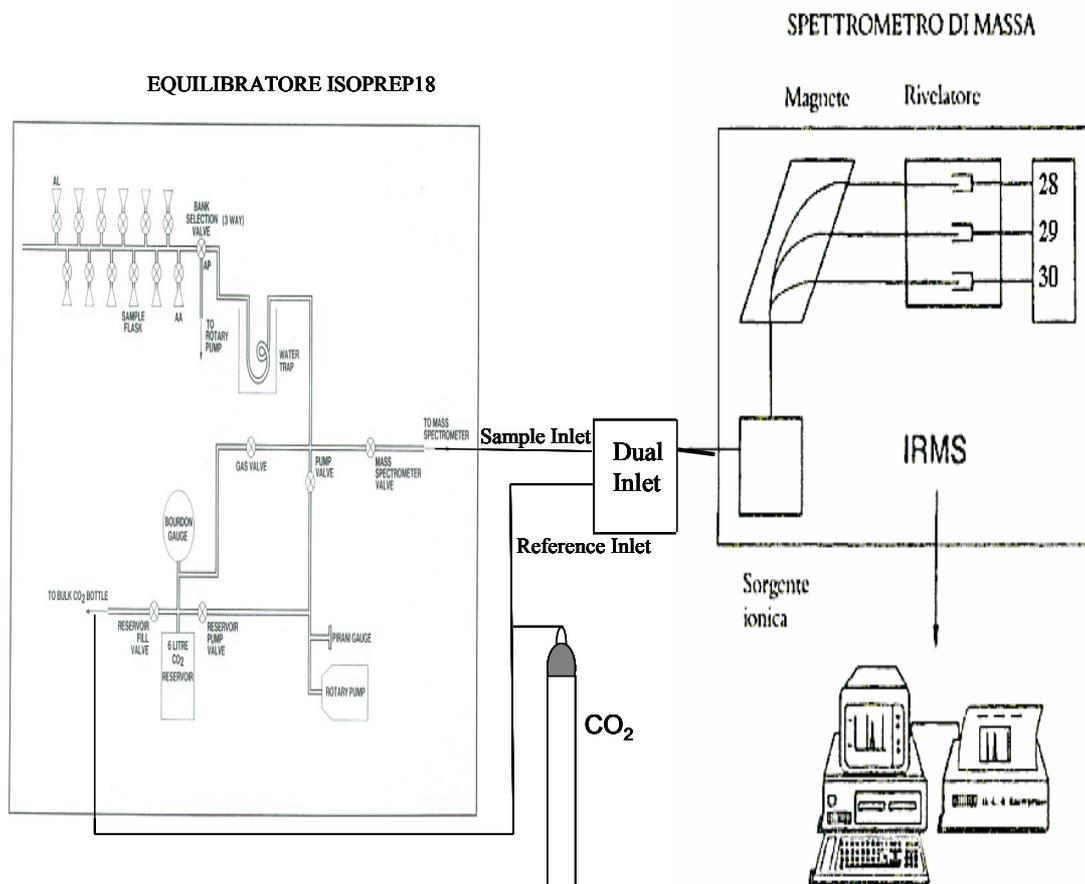
Figura 13. *Pirolizzatore e colonna di pirolisi*



Equilibratore per ^{18}O (Elemental Analyser Direct Injected)

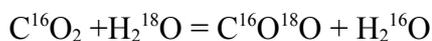
Il rapporto isotopico $\delta^{18}\text{O}$ nell'acqua contenuta nei campioni di plasma è stato determinato mediante lo spettrometro di massa isotopica (IRMS) interfacciato con un equilibratore per la CO_2 (Figura 14).

Figura 14. *Equilibratore Isoprep 18*



L'analisi prevede una prima fase di equilibratura dell'acqua del campione con CO₂ a titolo noto. L'equilibratura avviene nell'*Isoprep 18*, esso è dotato di una rampa oscillante costituita da 24 valvole, alle quali sono agganciate speciali beute di piccole dimensioni a collo stretto, contenenti ciascuna 2 ml di campione. Prima dell'analisi si opera un preventivo degasaggio dei campioni; le valvole si aprono e mediante una pompa rotativa ad olio viene aspirata l'aria e la CO₂ eventualmente presenti. L'aspirazione procede lentamente per 200 secondi attraverso un capillare molto sottile (flusso viscoso) in modo da evitare frazionamenti isotopici e eventuali aspirazioni di liquido. Successivamente nelle beute si insuffla CO₂ (ultra pura) a pressione di 600 mbar, di cui è noto il tenore del rapporto isotopico $\delta^{18}\text{O}$, precedentemente misurato in

raffronto ad una CO₂ a titolo certificato di ¹⁸O. Dopo chiuse le valvole la rampa dello strumento inizia ad oscillare lentamente, in questo modo si dà inizio ad un processo di equilibratura dell'acqua del campione con la CO₂ secondo la seguente reazione:



Questa fase di scambio in oscillazione dura 5 ore, così da permettere un scambio quantitativo tra ¹⁸O presente nell'acqua del campione e la CO₂. La temperatura di equilibratura (fondamentale per il processo) è di 25°C, come consigliata dai costruttori dello stesso strumento.

Trascorso questo periodo, si prosegue con l'analisi spettroscopica e quindi, le beute vengono aperte una per volta dallo stesso strumento in modo che la CO₂ equilibrata giunge alla sorgente dello spettrometro, previo passaggio attraverso una trappola capace di catturare le presunte impurità d'acqua. La trappola è posta in alcool etilico a -90°C, temperatura che si raggiunge con l'ausilio di un refrigerante ad immersione.

Lo spettrometro è corredato di un doppio sistema di accesso alla camera di ionizzazione definito *dual flow system*, che permette di misurare alternativamente e confrontare tra loro sia la CO₂ equilibrata col campione e sia la CO₂ di riferimento a titolo noto contenuta nella bombola. Per ogni campione è effettuato un ciclo di 12 misure, campione contro standard, in modo da raggiungere una precisione dello 0.1‰.

Ai rivelatori arrivano raggi corrispondenti a ioni di massa su carica 44 (¹²C¹⁶O₂), 45 (¹³C¹⁶O₂) e 46 (¹²C¹⁸O¹⁶O). Il rapporto tra il raggio ionico a massa 46 e quello a massa 44 corrisponde al rapporto ¹⁸O/¹⁶O del campione.

Il rapporto ¹⁸O/¹⁶O viene espresso in delta per mille (δ¹⁸O‰) rapportandolo a quello di uno standard internazionale (V-SMOW), secondo la seguente formula (vedi capitolo 3):

$$\delta^{18}\text{O} \text{‰} = \frac{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{campione}} - {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{std}}}{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{std}}} * 1000$$

5.3.2. Pesata e incapsulamento del campione

I campioni per essere analizzati ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$, δD , $\delta^{18}\text{O}$) devono essere pesati in microcapsule mediante bilancia microanalitica. Vengono utilizzate microcapsule di stagno monouso ($\varnothing = 4\text{mm}$; $h = 6\text{mm}$) per la determinazione del $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$ e di argento per la misura del $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$. Le capsule vengono chiuse con una pinzetta e pressate per eliminare l'aria residua. Solamente per la determinazione dello $\delta^{34}\text{S}$ all'interno della capsula viene aggiunto V_2O_5 (vanadio), un catalizzatore, per favorire la combustione del campione, in quantità pari al peso del campione.

Di ogni componente in analisi ne viene pesata una quantità tale da ottenere un contenuto del gas in esame simile a quello degli standard utilizzati nell'analisi, in quanto questo garantisce una maggiore precisione nei risultati. La quantità di campione ottimale viene calcolata in base al valore dell'intensità del picco di un campione di prova in modo da eguagliarla a quella dello standard interno.

5.3.3. Analisi strumentale

Prima di procedere all'analisi è regola necessaria impostare, per lo più mediante software, una serie di parametri caratteristici del rapporto isotopico da misurare.

Nell'analizzatore elementare vengono regolate:

- la pressione sia del gas carrier e sia dell'ossigeno (nel caso di “*flash combustion*”);

- la temperatura delle colonne;
- la temperatura del forno di termostatazione della colonna gas-cromatografica;
- elemento/i in analisi.

Nello spettrometro di massa è necessario impostare diversi parametri indicati di seguito in tabella 15.

Tabella 15. Parametri da impostare prima dell'analisi nell'IRMS

	Parametro	Intervallo Permesso	Effetto ottimizzazione (Tuning)
Sorgente ionica	Corrente della trappola	0-2 mA	Permette di regolare l'intensità del fascio ionico, variando il numero di elettroni incidenti.
	Voltaggio del repulsore degli ioni	-15 a +50 V	Determina la velocità con cui gli ioni vengono lanciati verso il tubo di volo.
	Corrente della sorgente (Electron volts)	0-5 mA	
	HT (voltaggio d'accelerazione)	0-5 kV	Permette di focalizzare i fasci ionici di una determinata massa nei rispettivi collettori.
	Voltaggio dei metà piatti	0-55%	Controlla l'ampiezza del fascio ionico e di conseguenza la sua focalizzazione.
Gas di trasporto	Pressione del gas	0-300 kPa	Determina la velocità di trasporto del campione al rivelatore, permettendo di variare l'inizio della misura.

Adesso si prosegue con la fase di “*centratura del picco*”, attraverso il voltaggio di accelerazione (HT). Quest'ultimo è determinato attraverso l'analisi di un campione di prova del gas di riferimento (CO₂) e la successiva scansione dell'area. Il valore di HT corrisponde al centro del picco dell'area. L'ultima operazione è idonea a creare una

nuova lista con i campioni in esame. Al fine di ottenere valori confrontabili tra l'analizzatore elementare e la massa è sufficiente tarare il campione rispetto allo standard di riferimento. In questo modo, si misura di fatto la percentuale dell'isotopo analizzato. Finita l'analisi lo strumento fornisce il report analitico con dati attinenti al rivelatore e allo spettrometro di massa.

In tabella 16 sono riportati gli standard primari e secondari delle varie specie isotopiche.

Tabella 16. Standard di riferimento, standard primari e secondari delle varie specie isotopiche.

δ	Standard di riferimento	Standard primario	Valori di $\delta\%$	Standard secondario	Valori di $\delta\%$
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	V-PDB ⁰	NBS-22 ¹	$\delta^{13}\text{C} = -29.80$	Caseina	$\delta^{13}\text{C} = -21.84$
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	AIR ²	IAEA-NO ₃ ³	$\delta^{15}\text{N} = 4.70$	Caseina	$\delta^{15}\text{N} = 7.23$
$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	CDT ⁴	IAEA-SO-5 ⁵ NBS 127 ⁶	$\delta^{34}\text{S} = 0.5$ $\delta^{34}\text{S} = 20.3$	Caseina	$\delta^{34}\text{S} = 2.68$
$^2\text{H}/^1\text{H}$	V-SMOW ⁷	NBS-22	$\delta^2\text{H} = -120$	Caseina	$\delta^2\text{H} = -113.00$
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	V-SMOW	IAEA-CH-6 ⁸	$\delta^{18}\text{O} = 36.4$	Acqua	$\delta^{18}\text{O} = 0.54$

⁰Belemnite americana del cretaceo superiore della PeeDee Formation, South Carolina.

¹Olio preparato dalla Chevron Oil Company, La Habra, California.

²Aria

³Potassio nitrato sale preparato da A. Mariotti, Pierre and Maria Curie University, Parigi, Francia.

⁴Canyon Diablo Triolite

⁵Bario solfato preparato da R. Krouse, University of Calgary, Canada, and S. Halas, University of Lublin, Poland.

⁶Bario solfato preparato da J. R. O'Neil, U.S. Geological Survey

⁷Acqua, Standard Mean Ocean Water, corrisponde ad un'acqua ipotetica che possiede i rapporti di ossigeno e idrogeno uguali ai rapporti isotopici medi dell'acqua di oceano (Craig, 1961).

⁸Zucchero di canna (chiamato ANU Sucrose) preparato da H. Pollach, Australian National University, Canberra

La limitata disponibilità di PDB ha spinto la IAEA (Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica) a calibrare altri standard (detti primari). Ogni laboratorio tara poi degli standard interni (detti secondari o working standard) contro gli standard primari forniti dalla IAEA.

5.4. Elaborazione statistica

I dati ottenuti dalla prova sperimentale sono stati analizzati mediante procedura General Linear Model (GLM) utilizzando il software Minitab versione 14 (1995). L'analisi della varianza univariata è stata utilizzata per valutare l'effetto della dieta sulla distribuzione isotopica di ogni elemento analizzato. In particolare il modello di ANOVA applicato sui valori di rapporto isotopico del carbonio e dell'azoto misurati nel sangue, ha incluso sia la dieta degli animali (P, P-S37, P-S14, S) e sia la frazione di sangue (plasma, eritrociti) come fattori sperimentali fissi. Quando l'interazione non è significativa ($P > 0.05$) essa è stata esclusa dal modello. Invece, i dati del rapporto isotopico sulle proteine della carne e sulla frazione lipidica della carne sono stati analizzati con una ANOVA monofattoriale, considerando ancora la dieta come fattore fisso. In più, per confrontare i valori medi, sono stati effettuati confronti a coppie con l'uso del test di Tukey ($p < 0.05$).

Per quanto riguarda la cinetica di variazione dei rapporti isotopici nel sangue a seguito del cambio di alimentazione, l'analisi statistica è stata eseguita applicando un modello bifattoriale per i rapporti isotopici del carbonio e dell'azoto ed un modello monofattoriale per il SIR dell'ossigeno. Nel primo caso, il substrato (plasma o eritrocita) ed il giorno del prelievo (5 date di prelievo) sono stati inseriti nel modello come fattori fissi e l'animale come fattore random. Nel caso dell'ossigeno, avendo a disposizione soltanto il SIR valutato sugli eritrociti, il modello statistico ha considerato solo il giorno del prelievo. Anche in questo caso, le medie sono state confrontate mediante il test di Tukey ($p < 0.05$).

RISULTATI E DISCUSSIONI

I risultati dell'esperimento di cui sopra sono in fase di pubblicazione; risultati e discussioni di questa pubblicazione sono riportati nelle pagine seguenti.

6.1. Obiettivo tracciabilità

Alimenti

In letteratura sono molti gli autori che hanno analizzato i rapporti isotopici di diversi elementi chimici come C, N, O e H negli alimenti destinati al bestiame. Wilson e coautori (1988), Schwert e coautori (2005), De Smet e coautori (2004) hanno dimostrato che nelle piante C3 i valori di $\delta^{13}\text{C}$ misurati nel concentrato sono più alti rispetto ai valori di $\delta^{13}\text{C}$ misurati nel pascolo (foraggio fresco). Nelle foraggere azotofissatrici il $\delta^{15}\text{N}$ varia da 0.5‰ a 3.3‰, nelle graminacee foraggere da 0.4‰ a 7.1 (dati da Camin et al., 2008). Nei concentrati il range varia tra 0.8‰ e 4.2‰ (Knobbe et al., 2006). Quanto riportato in letteratura rispecchia a pieno ciò che le analisi isotopiche della presente prova sperimentale ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) hanno evidenziato. In tabella 17 si mettono a confronto i valori di diversi rapporti isotopici misurati nelle diete sperimentali somministrate agli animali durante la prova in campo.

Table 17. Rapporto isotopico di C, N, O, H e S (‰) per gli alimenti
(* Orzo 64%; Cece 34%; IMV 2%)

	n. campioni	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{34}\text{S}$
Pascolo	7	-30,47	1,07	22,45	-97,47	6,3
Fieno	1	-28,10	1,00	24,82	-94,90	-2,52
Concentrato*	1	-25,30	3,00	28,68	-57,90	-7,43

In generale, dalla tabella 17 è emerso che la dieta a base di pascolo mostra valori bassi di $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ e valori alti di $\delta^{34}\text{S}$ rispetto ai valori misurati nella dieta a base di concentrato. Inoltre, una considerazione interessante va fatta in riferimento al rapporto isotopico dell'idrogeno, dell'ossigeno e dello zolfo. Per esempio, in un recente lavoro Camin e coautori (2008) hanno dimostrato che nei foraggi il range del rapporto isotopico dell'idrogeno ($\delta^2\text{H}$) oscilla da -123 a -99‰ e nei concentrati oscilla da -85 a -32‰; confrontando questi valori con quelli ottenuti dalla suddetta prova sperimentale (tabella 18) si può dedurre che, i valori del rapporto isotopico $\delta^2\text{H}$, nel presente lavoro, rientrano in questi range e quindi sono paragonabili ai valori riportati in letteratura. Anche, i valori del rapporto isotopico $\delta^{18}\text{O}$ (tabella 18) rientrano nell'intervallo di valori osservati nel lavoro di Camin e coautori (2009); gli Autori mostrano range che oscillano da 19,8 a 22,6‰ nei foraggi e da 24,1 a 26,1‰ nei concentrati.

In letteratura non esistono molti dati sul rapporto isotopico $\delta^{34}\text{S}$. Paragonando i dati del rapporto isotopico ottenuti nella dieta del gruppo stalla con il valore di 3,7‰ misurato in un recente lavoro di Bahar e coautori (2009) in una dieta a base di orzo, si evince che nelle nostre condizioni sperimentali, il valore è di gran lunga inferiore ai valori ottenuti dai suddetti Autori. Secondo Camin e coautori (2007), i principali fattori che incidono sul rapporto isotopico dello zolfo sono da attribuire all'origine geologica del terreno e alla distanza della zona di coltivazione dal mare, quest'ultimo fattore causa la deposizione di solfato sui foraggi con un effetto aerosol (*sea-spray effect*). Considerando che l'azienda dove è stata condotta in vivo la suddetta prova sperimentale, è posta a circa 3 km dal mare, si può ipotizzare un arricchimento dell'isotopo più pesante di zolfo nell'erba.

Sangue

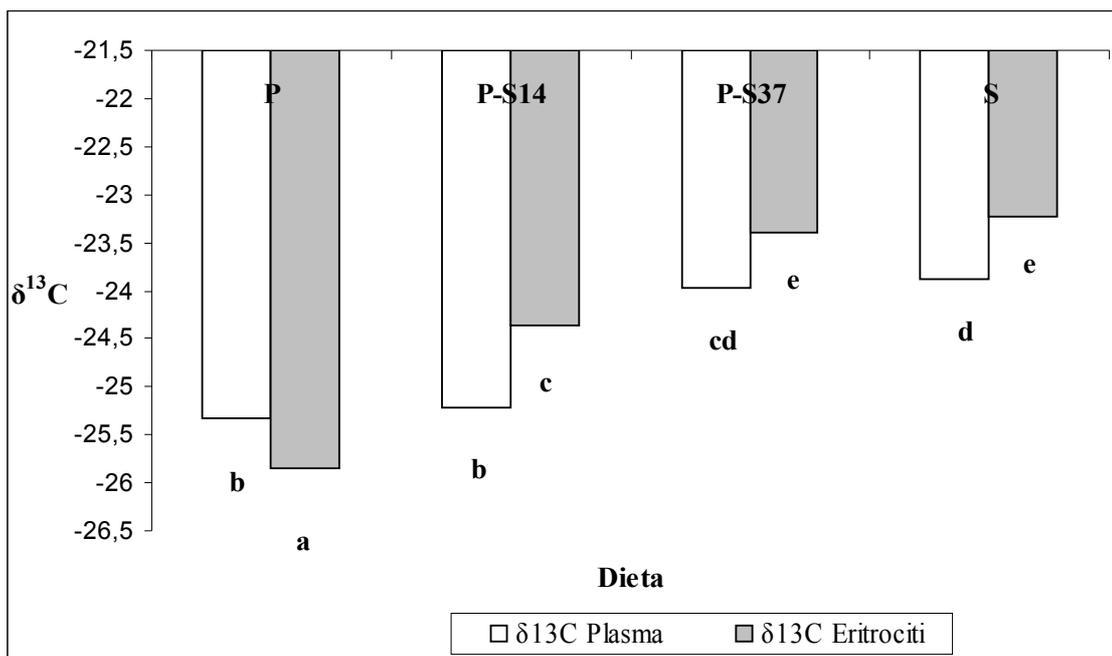
Dall'esame isotopico sui campioni di sangue prelevati nel corso della prova sperimentale sono scaturiti i risultati riportati in tabella 18. I valori di P mostrano chiaramente un significativo effetto di entrambi i fattori sperimentali considerati. Infatti, i valori dei rapporti isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sono notevolmente influenzati dal regime alimentare dell'animale e dal substrato.

Tabella 18. Valori del rapporto isotopico di $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ del sangue nella dieta e nei tessuti

	Effetto dieta				Effetto substrato		P		SEM	
	P	P-S14	P-S37	S	Plasma	Eritrociti	Dieta (D)	Substrato (S)		
$\delta^{13}\text{C}$	-25.59	-24.79	-23.68	-23.55	-24.59	-24.21	0,0005	0,0005	0,0005	0,049
$\delta^{15}\text{N}$	6,27	6,26	5,88	5,55	5,85	6,13	0,0005	0,0005	0,001	0,031

Il valore del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ misurato dal sangue di animali alimentati al pascolo risulta essere inferiore rispetto al valore misurato in animali alimentati in stalla, in più si osserva un trend crescente con il diminuire del numero di giorni spesi al pascolo ($r = -0.746$; $p < 0.0005$). Questo risultato concorda con i valori dei SIR osservati negli alimenti; infatti il pascolo presenta valori minori rispetto al concentrato. Viceversa si verifica per il rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$, per il quale si osservano valori più alti nel sangue di animali alimentati al pascolo rispetto ai valori misurati su animali alimentati in stalla, con una progressiva diminuzione di valore al diminuire del numero di giorni spesi al pascolo ($r = 0.675$; $p < 0.005$).

Figura 15. Rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ misurato in plasma e eritrociti in funzione della dieta



P = Pascolo; *P-S14* = pascolo-stalla 14 giorni; *P-S37* = pascolo-stalla 37 giorni; *S* = Stalla

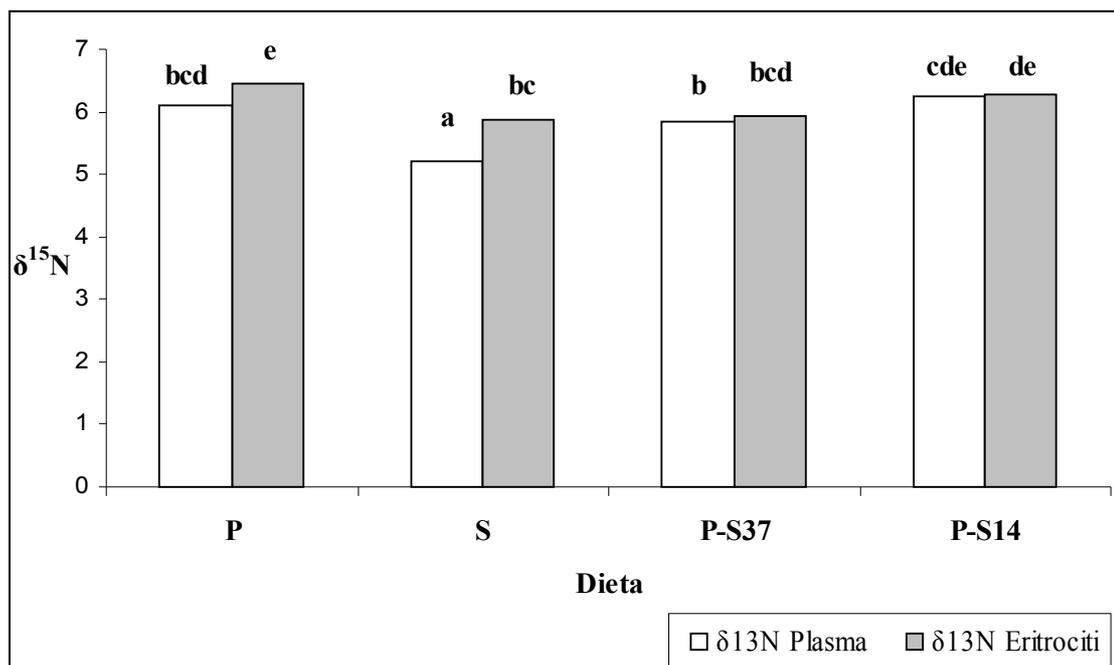
a, b, c, d, e = lettere diverse indicano medie significativamente differenti ($p < 0.05$)

Nella figura 15 si mette in evidenza l'effetto dell'interazione tra la dieta e il substrato. Il rapporto isotopico del $\delta^{13}\text{C}$ sia nel plasma che negli eritrociti mostra un valore significativamente più basso nei gruppi P e P-S14 rispetto ai gruppi P-S37 e S. Animali sottoposti ad un breve periodo di alimentazione in stalla (gruppo P-S14), presentano valori del rapporto isotopico stabile $\delta^{13}\text{C}$ negli eritrociti significativamente più alti rispetto ad animali alimentati solo al pascolo (gruppo P), ma significativamente più bassi rispetto ad animali sottoposti ad un lungo periodo di alimentazione in stalla (gruppo P-S37) e ad animali alimentati esclusivamente in stalla (gruppo S). Confrontando il valore del $\delta^{13}\text{C}$ due substrati entro ciascun gruppo, si può osservare che esso è significativamente minore negli eritrociti rispetto al valore misurato nel plasma nel gruppo P, mentre negli altri gruppi sperimentali è sempre significativamente maggiore negli eritrociti rispetto ai valori misurati nel plasma.

Nel gruppo P-S37, il lungo periodo di alimentazione in stalla (37 giorni) successivo all'alimentazione al pascolo è stato sufficiente a far sì che il valore del rapporto isotopico stabile sia nel plasma che negli eritrociti risultasse diverso rispetto ai valori osservati negli animali allevati esclusivamente al pascolo. Invece, nel gruppo (P-S14), sottoposto ad un breve periodo di alimentazione in stalla (14 giorni), il cambio di alimentazione è risultato rilevabile solo negli eritrociti.

Sulla base di quanto osservato dalle analisi sperimentali e in accordo con la letteratura consultata, si può affermare che, il rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ misurato negli eritrociti permette di tracciare in modo ottimale i bruschi cambiamenti di alimentazione rispetto al rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ misurato nel plasma. Si ricorda, così come descritto nei capitoli precedenti, che il rapporto isotopico stabile del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) varia in funzione della dieta somministrata all'animale e che, in particolare la variazione è particolarmente evidente quando si verifica un netto passaggio da una alimentazione a base di piante C3 ad una costituita da piante C4 o viceversa. La risposta che si ottiene è immediata. Per esempio Norman e coautori (2009) hanno stimato che il cambiamento repentino di alimentazione nel plasma di ovini si può osservare in soli tre giorni; invece, Boutton e coautori (1988) hanno stimato un periodo di quattro giorni e Wilson e coautori (1988) sette nel latte di vacca. Simili risultati sono stati osservati nel latte bovino e nelle urine con un graduale cambiamento della dieta (Knobbe et al., 2006). Però, se la variazione di alimentazione è solo a carico di piante con lo stesso ciclo fotosintetico (o solo C3 o solo C4), il rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ misurato nel plasma degli ovini non ha rilevato differenze significative neanche dopo diciotto giorni di prova sperimentale (Norman et al., 2009).

Figura 16. $\delta^{15}\text{N}$ misurato in plasma ed eritrociti in funzione della dieta



P = Pascolo; *P-S14* = pascolo-stalla 14 giorni; *P-S37* = pascolo-stalla 37 giorni; *S* = Stalla
a, b, c, d, e = lettere diverse indicano medie significativamente differenti ($p < 0.05$)

Nella figura 16 sono stati messi a confronto i valori del rapporto isotopico stabile dell'azoto misurati su plasma ed eritrociti in funzione della dieta alimentare.

Nel plasma si nota che, i valori del rapporto isotopico stabile $\delta^{15}\text{N}$ misurati in agnelli alimentati al pascolo non sono significativamente differenti dai valori misurati nei due gruppi di agnelli alimentati in stalla nella fase finale della prova (P-S37; P-S14); inoltre, gli animali alimentati in stalla mostrano valori significativamente più bassi del $\delta^{15}\text{N}$ rispetto ai valori misurati in animali alimentati al pascolo.

Negli eritrociti si nota che i valori del rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$ misurato in animali alimentati al pascolo (P) e i valori misurati in animali sottoposti ad un breve periodo di

alimentazione in stalla con il concentrato (P-S14) sono significativamente più elevati rispetto ai valori misurati in animali alimentati in stalla (S); invece, in animali sottoposti al più lungo periodo di alimentazione in stalla (P-S37) e in animali alimentati in stalla (S) non sono emersi valori significativamente differenti del rapporto isotopico stabile $\delta^{15}\text{N}$.

In generale si può affermare che nel gruppo S, il rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$ è significativamente più elevato negli eritrociti rispetto a quello misurato nel plasma. Dalla interpretazione di questi risultati si può dedurre che anche i SIR dell'azoto misurati negli eritrociti variano a seguito del cambiamento della dieta da pascolo a concentrato. Questi cambiamenti sono evidenti solo nel caso di un lungo periodo di alimentazione in stalla con il concentrato. Al contrario, nel plasma, nessuno dei due periodi di alimentazione in stalla è stato sufficiente per ottenere valori diversi di $\delta^{15}\text{N}$ rispetto ad agnelli alimentati al pascolo. Questi risultati che concordano con quanto dimostrato da Knobbe e coautori (2006) che hanno dimostrato che solo dopo quarantanove giorni dal cambiamento dell'alimentazione (da mais a erba fresca), nelle urine, un derivato ematico, di questi animali si osservavano valori diversi del rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$.

Carne e grasso

I campioni di carne contengono alte quantità di azoto e zolfo a causa dell'elevato contenuto proteico, quindi prima dell'analisi isotopica si è ritenuto opportuno effettuare la separazione delle proteine dai lipidi attraverso il Soxhlet così come illustrato nei capitoli precedenti. Le analisi sono state condotte sul residuo sgrassato (Camin et al., 2007).

Dalla misura del rapporto isotopico stabile $\delta^{13}\text{C}$, effettuata su campioni di carne sgrassata e sulla frazione lipidica della stessa (grasso) (tabella 19), è emerso quanto riportato in letteratura; cioè la dieta influenza tutti i rapporti isotopici misurati sia sulla carne sgrassata e sia sulla frazione lipidica della stessa carne.

Tabella 19. *Misure dei rapporti isotopici stabili nella carne e nel grasso.*

	Pascolo	P-S14	P-S37	Stalla	P	SEM
<i>carne sgrassata</i>						
$\delta^{13}\text{C}$	-24,5 a	-24,0 b	-23,2 c	-22,9 d	< 0,0005	0,106
$\delta^{18}\text{O}$	15,5 b	15,4 b	14,0 a	13,5 a	< 0,0005	0,18
$\delta^2\text{H}$	-89 a	-84 b	-84 b	-90 a	< 0,0005	0,554
$\delta^{15}\text{N}$	6,3 bc	6,4 c	6,0 b	5,7 a	< 0,0005	0,061
$\delta^{34}\text{S}$	5,4 d	4,7 c	3,4 b	1,8 a	< 0,0005	0,235
<i>grasso estratto dalla carne</i>						
$\delta^{13}\text{C}$	-29,8 a	-28,2 b	-27,3 c	-27,3 c	< 0,0005	0,202

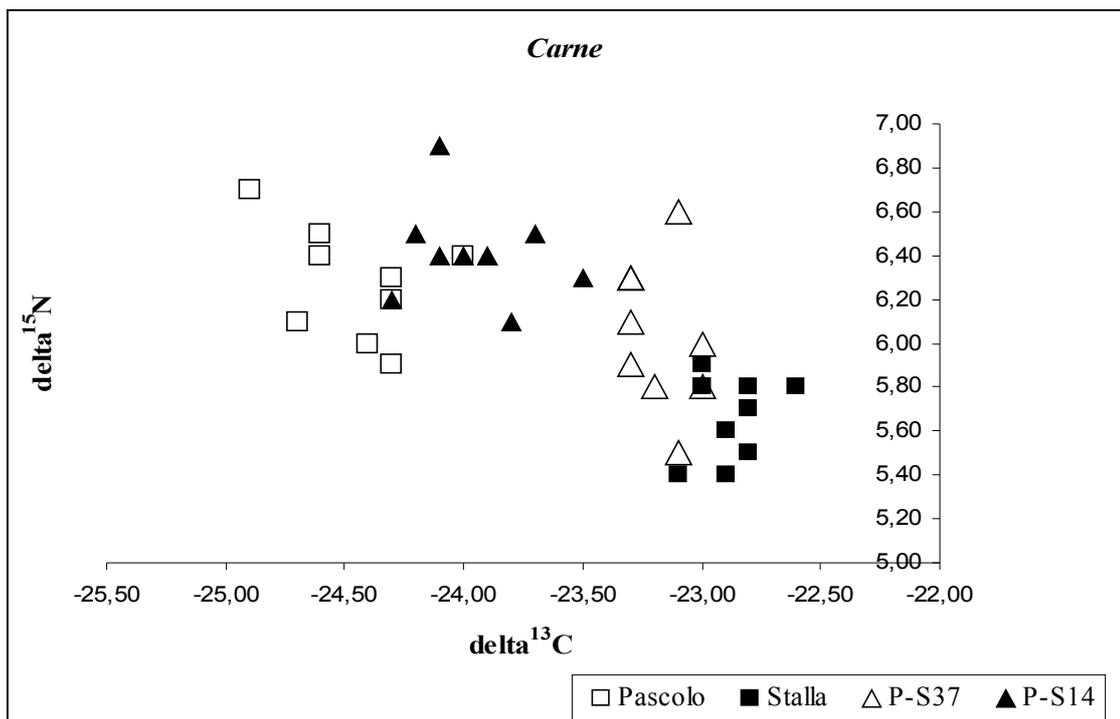
Dalle analisi sperimentali è emerso che i valori medi del rapporto isotopico di diversi composti C, H, N, O e S sono paragonabili con i valori osservati in agnelli allevati utilizzando diversi sistemi di alimentazione (Camin et al., 2007; Perini et al., 2009; Sacco et al., 2005; Moreno-Rojas et al., 2008; Piasentier et al., 2003). Inoltre, così come illustrato in tabella 19, i valori del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ nella carne sono risultati significativamente differenti ($p < 0,05$) tra le quattro diete.

Per gli animali del gruppo pascolo si sono ottenuti valori più bassi $\delta^{13}\text{C}$ rispetto ai valori misurati nel gruppo stalla. Animali alimentati solo in stalla (S) mostrano valori alti del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ perché, come precedentemente detto, le piante C3 presenti nel concentrato ostentano valori meno negativi di $\delta^{13}\text{C}$ rispetto al pascolo. Nei gruppi P-S14 e P-S37 si misurano valori intermedi. I valori del rapporto isotopico della carne

osservati nei gruppi S e P-S37 sono chiaramente distinti da quelli degli altri due gruppi, come è evidente nella figura 17.

La figura 17 mette in relazione il rapporto isotopico del carbonio e dell'azoto misurati nella carne sgrassata in relazione alle quattro diete sperimentali.

Figura 17. Rapporto isotopico del carbonio e dell'azoto nella carne sgrassata



Negli animali sottoposti al più lungo periodo di alimentazione in stalla, gruppo P-S37, il valore minimo del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ (-23,30), risulta essere più elevato rispetto al valore massimo (-23,50) misurato in animali che hanno subito il più breve periodo di alimentazione con concentrato, gruppo P-S14. In media, il rapporto isotopico misurato sulla carne di animali alimentati solo al pascolo (P) è significativamente differente dal valore misurato in animali sottoposti ad un breve periodo di cambio di

alimentazione (P-S14) ($p < 0.05$, tabella 19) anche se si può osservare una sovrapposizione dei risultati (figura 17).

Dall'analisi dei dati sperimentali misurati sulla carne è scaturita una interessante e significativa correlazione negativa del $\delta^{13}\text{C}$ con i giorni di alimentazione al pascolo trascorsi dall'animale ($r = -0,864$; $p < 0,0005$). In base alla letteratura consultata, risultati simili non sono mai stati descritti in letteratura; solo un recente studio condotto da Moreno-Rojas e coautori (2008) ha evidenziato una discriminazione tra la carne di animali alimentati al pascolo e la carne di animali alimentati con concentrato, utilizzando una alimentazione costituita solo da piante C3.

Esaminando, ancora, i dati sperimentali è interessante notare che il rapporto isotopico del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) misurato nella carne ostenta una elevata e significativa correlazione con entrambi i substrati ematici, plasma ($r = 0,848$; $p < 0,0005$) e eritrociti ($r = 0,933$; $p < 0,0005$). In un lavoro precedente, De Smet e coautori (2004) hanno ottenuto valori di r elevati (0,92-0,99) nell'analisi delle correlazioni esistenti tra i vari tessuti (carne, plasma, sangue, fegato, capelli) campionati al momento della macellazione.

Anche, il rapporto isotopico del carbonio misurato sulla frazione lipidica della carne è stato significativamente influenzato dalla dieta. Il $\delta^{13}\text{C}$ misurato in animali alimentati al pascolo (gruppo P) è risultato significativamente più basso sia rispetto, al rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ rilevato in animali che hanno subito un periodo di alimentazione in stalla con il concentrato, più o meno lungo, e sia rispetto ad animali alimentati solo in stalla (gruppo S). Tuttavia, gli animali appartenenti al gruppo P-S37 e gli animali appartenenti al gruppo S mostrano tra loro valori simili di $\delta^{13}\text{C}$ ($p > 0,05$). Quindi, nelle nostre condizioni sperimentali, nel grasso estratto dalla carne, il più lungo periodo di utilizzazione del concentrato (37 giorni) è stato sufficiente a dissimulare il precedente periodo di alimentazione al pascolo.

Il valore del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ misurato nella carne è sempre stato superiore rispetto al valore misurato nella frazione lipidica (-23,61 vs -28,03 rispettivamente, $p < 0,0005$). Risultati simili sono stati precedentemente osservati nella carne di ovini (Perini et al., 2009; Piasentier et al., 2003; Moreno Rojas et al., 2008).

Come già precedentemente osservato da Bahar e coautori (2005), i valori di $\delta^{13}\text{C}$ misurati nella carne e nella frazione lipidica ostentano una correlazione significativa ($r=0.85$, $p < 0,0005$). È interessante notare che, nelle nostre condizioni sperimentali, il rapporto isotopico del carbonio nella frazione lipidica della carne non è stato influenzato dal contenuto di lipidi intramuscolari della carne ($r=0,246$, $p > 0.05$; dati non mostrati).

Anche il rapporto isotopico stabile dell'azoto misurato sulla carne è risultato influenzato significativamente ($p < 0,0005$) dal sistema di alimentazione dell'animale (tabella 19). In media, il valore del $\delta^{15}\text{N}$ è significativamente più alto sia negli animali alimentati al pascolo (P) e sia negli animali sottoposti ad un periodo variabile di alimentazione in stalla con concentrato, rispetto ad animali alimentati solo in stalla (S). Nella figura 17 si evidenzia che tra il gruppo P ed il gruppo S si osservano poche sovrapposizioni di dati, invece i due gruppi alimentati prima al pascolo e poi in stalla si stabilizzano in una posizione intermedia e mostrano numerosi casi di sovrapposizione di dati con il gruppo P; infatti la carne degli animali allevati al pascolo presenta valori non significativamente diversi da quella dei due gruppi P-S. La carne di animali sottoposti ad un breve periodo di alimentazione in stalla (P-S14) mostra valori del rapporto isotopico stabile dell'azoto significativamente ($p < 0,05$) più elevati rispetto ai valori misurati sulla carne di animali che utilizzano per un lungo periodo il concentrato in stalla (P-S37). Questo aumento del $\delta^{15}\text{N}$ potrebbe essere imputabile allo stress

nutrizionale indotto dal brusco cambiamento di alimentazione, passando da una dieta a base di pascolo ad una dieta a base di concentrato (Fuller et al., 2005, citato da Harrison et al., 2010).

In conclusione, nelle nostre condizioni sperimentali, non è stato possibile distinguere la carne degli animali con breve periodo di alimentazione in stalla da quella di animali alimentati solo al pascolo. Tuttavia, i nostri risultati confermano che gli animali allevati al pascolo producono una carne con un diverso $\delta^{15}\text{N}$ rispetto ai valori misurati nella carne di animali alimentati in stalla con concentrato; risultati simili sono stati ottenuti in un recente lavoro condotto da Moreno-Rojas e coautori (2008).

Il $\delta^{15}\text{N}$ misurato nella carne in funzione del sistema di alimentazione è stata studiata da molti autori (Perini et al., 2009; Piasentier et al., 2003; Camin et al., 2007). Schmidt e coautori (2005) e Bahar e coautori (2008) hanno scoperto che la carne bovina proveniente da sistemi convenzionali presenta valori più elevati di $\delta^{15}\text{N}$ rispetto ai valori misurati nella carne prodotte con sistemi biologici.

Infine, è interessante evidenziare che i valori del rapporto isotopico $\delta^{15}\text{N}$ misurato sia nella carne e sia nel sangue sono significativamente correlati tra loro, però il coefficiente di correlazione r del plasma è risultato superiore rispetto a quello degli eritrociti ($r = 0,879$, $p < 0,0005$ e $r = 0,622$, $p < 0,0005$, rispettivamente).

Analizzando il $\delta^{18}\text{O}$, si possono distinguere due gruppi di dati: il primo gruppo è rappresentato da valori dei SIR dell'ossigeno misurati nella carne di animali alimentati al pascolo e da quelli che hanno utilizzato il concentrato per il più breve periodo (P-S14); entrambi i due gruppi di animali mostrano valori significativamente più alti rispetto sia ai valori dei SIR misurati nella carne di animali alimentati in stalla e sia ai

valori dei SIR misurati nella carne di animali che subiscono il più lungo periodo di alimentazione in stalla (P-S37) (Tabella 19).

Così come visto per l'azoto, anche, i valori del rapporto isotopico $\delta^{18}\text{O}$ misurati nella carne sono stati influenzati significativamente dalla lunghezza del periodo di alimentazione al pascolo ($r = 0,715$, $p < 0,0005$). Questi risultati suggeriscono che il rapporto isotopico di $\delta^{18}\text{O}$ nella carne può essere usato come ottimo marker fisico per tracciare il passaggio dal sistema di alimentazione al pascolo al sistema di alimentazione in stalla con concentrato, però solo nel caso di un periodo più lungo di finissaggio, cioè 37 giorni. Inoltre, questi risultati indicano chiaramente che nella carne di animali alimentati al pascolo si generano diversi valori del rapporto isotopico $\delta^{18}\text{O}$ rispetto alla carne di animali alimentati in stalla. In base alla letteratura consultata, questo è il primo lavoro a trattare l'effetto della somministrazione di pascolo sul rapporto isotopico $\delta^{18}\text{O}$ della carne sgrassata in condizioni sperimentali di alimentazione controllata. Una tendenza analoga è stata osservata in precedenza da Perini e coautori (2009) in una indagine sui sistemi di produzione di carne di agnelli europei. Un aumento del valore di $\delta^{18}\text{O}$ a causa di una dieta a base di foraggi freschi è già stato osservato nell'acqua del latte di vacca (Kornexl et al., 1997; Renou et al. 2004a; Engel et al., 2007) e nell'acqua della carne bovina (Boner & Förstel, 2004; Renou et al., 2004b).

Nelle nostre condizioni sperimentali, i valori del rapporto isotopico dell'idrogeno $\delta^2\text{H}$ sembrano non essere attendibili indicatori di tracciabilità del sistema di alimentazione. Infatti, i valori del rapporto isotopico $\delta^2\text{H}$ in agnelli alimentati al pascolo e in agnelli alimentati in stalla sono significativamente ($p < 0,05$) più bassi rispetto ai

valori misurati in agnelli che subiscono un cambio di alimentazione passando dal pascolo all'impiego del concentrato in stalla (tabella 17). In letteratura i risultati scientifici sono discordanti. Infatti, mentre Perini e coautori (2009) ritengono che la dieta non influenzi il $\delta^2\text{H}$ nella carne sgrassata, i risultati di Harrison e coautori (2010) suggeriscono che l'idrogeno alimentare sia la fonte principale di variazione di questo rapporto. Sono quindi necessari ulteriori studi per approfondire questi aspetti.

Dalla tabella 17 si evince che il pascolo mostra valori più elevati del rapporto isotopico dello zolfo, rispetto ai valori misurati sul concentrato. I quattro gruppi sperimentali presentano valori significativamente ($p < 0,05$) diversi: i valori più alti si riscontrano in animali alimentati al pascolo e i valori più bassi si riscontrano in agnelli alimentati in stalla (tabella 19). È stato osservato un significativo aumento del $\delta^{34}\text{S}$ in funzione della lunghezza del periodo che gli animali trascorrono al pascolo ($r=0.94$; $p<0,0005$). Questi risultati suggeriscono che i valori del rapporto isotopico dello zolfo, nella carne sgrassata possono essere un mezzo per rilevare l'esistenza di un periodo di finissaggio nella carne di animali alimentati con foraggio verde e possono distinguere la carne di animali alimentati al pascolo dalla carne di animali alimentati in stalla con concentrato.

Dalla letteratura fino ad ora esaminata, emerge che questo è il primo lavoro sperimentale che riporta un effetto significativo della alimentazione sul $\delta^{34}\text{S}$ misurato nella carne di animali allevati in condizioni di alimentazione controllata presenta effetti significativi della dieta. Nei lavori condotti da Perini e coautori (2009) e Camin e coautori (2007) non è stato osservato alcun effetto del sistema di alimentazione sul rapporto isotopico dello zolfo della carne.

6.2. Obiettivo cinetica di variazione dei SIR conseguente alla variazione di alimentazione

Obiettivo di questo esperimento è stato quello di valutare la velocità di variazione dei rapporti $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ nel sangue in conseguenza di una brusca variazione della dieta.

A tale scopo si è ritenuto opportuno considerare solo il gruppo di agnelli che dopo un periodo di settantacinque giorni al pascolo è stato alimentato in stalla per i rimanenti 14 giorni, cioè gli animali del gruppo P-S14. Durante questa ultima fase, gli agnelli hanno utilizzato lo stesso mangime sperimentale del gruppo S. In sintesi: il giorno 0 corrisponde al giorno in cui gli animali hanno bruscamente cambiato sistema di alimentazione ed hanno ricevuto lo stesso concentrato somministrato al gruppo stalla. Pertanto, il prelievo del sangue eseguito al mattino presto, prima della somministrazione della nuova dieta, riflette le condizioni di alimentazione al pascolo, mentre a partire dal giorno 1 potevano cominciare a manifestarsi delle variazioni. È opportuno ricordare che la dieta comprendeva esclusivamente piante C3, sia nella fase di alimentazione al pascolo che in quella in stalla.

L'analisi statistica (tabella 20) ha messo in evidenza delle importanti differenze tra carbonio ed azoto, che emergono in particolare esaminando la figura 18.

Tabella 20. Effetti principali del tipo di tessuto (eritrocita vs plasma) e del giorno di alimentazione in stalla (0, 1, 3, 6, 13 d) sui valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

	Valore di P			SEM
	Tessuto	Giorno	Tessuto x Giorno	
$\delta^{13}\text{C}$	0.504	0.001	< 0.0005	0.060
$\delta^{15}\text{N}$	< 0.0005	< 0.0005	0.002	0.036

L'esame della figura 18 mette in evidenza che il $\delta^{13}\text{C}$ nel plasma non ha subito significative variazioni nel corso dei 13 giorni di osservazione. Il SIR del carbonio negli eritrociti, invece, è cresciuto significativamente in seguito al cambiamento di dieta. Infatti, già al sesto giorno successivo al brusco cambio di alimentazione il valore di $\delta^{13}\text{C}$ negli eritrociti è risultato significativamente più alto rispetto a quando gli agnelli erano alimentati al pascolo. Nel successivo controllo, effettuato tredici giorni dopo il brusco cambio di alimentazione, il valore del $\delta^{13}\text{C}$ negli eritrociti è cresciuto ulteriormente ed è risultato significativamente più basso rispetto al dato precedente. L'aumento del valore del $\delta^{13}\text{C}$ negli eritrociti riflette il diverso rapporto isotopico del pascolo e del mangime concentrato somministrati agli animali ($\delta^{13}\text{C} = -30.47$ e -25.30 ‰, rispettivamente).

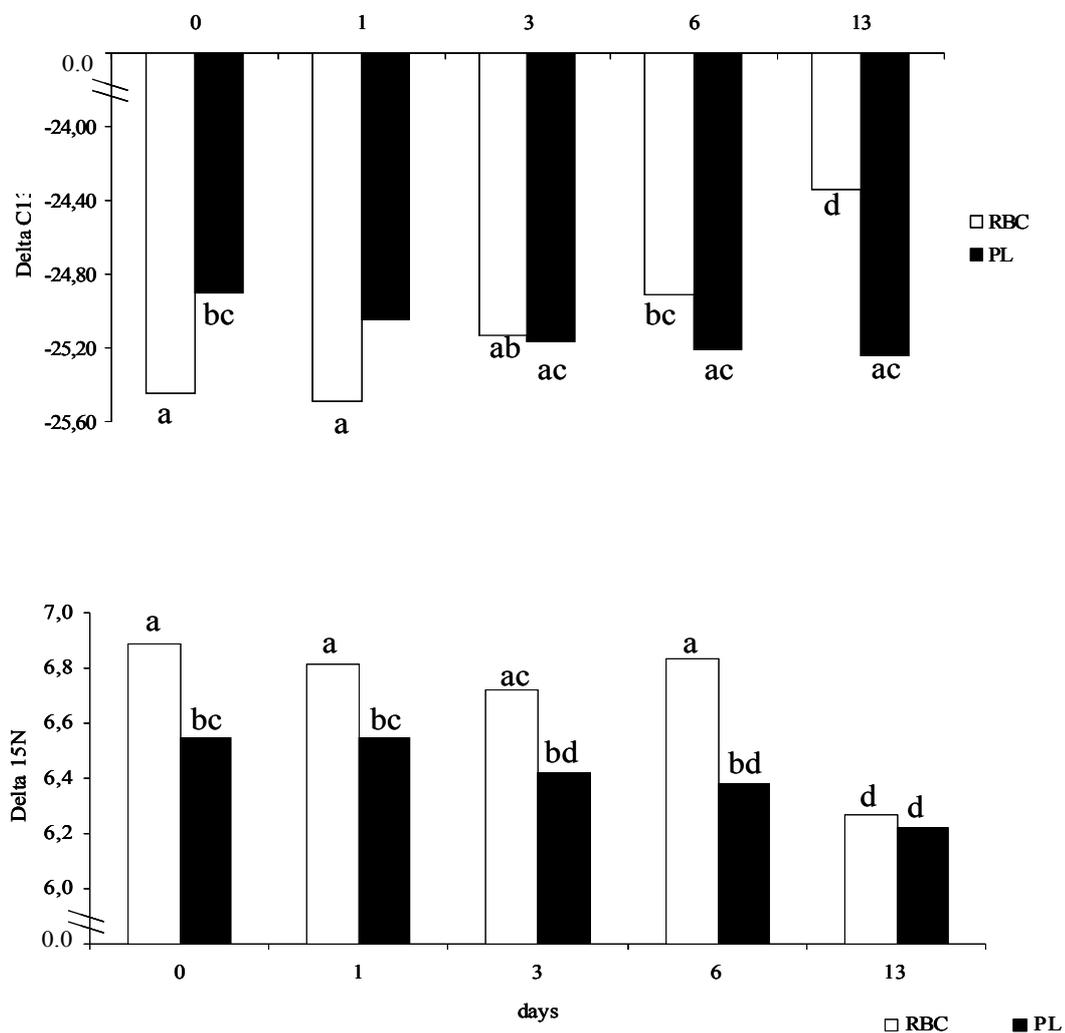
Pochi lavori in letteratura indagano sulla variazione dei rapporti isotopici in tessuti o escreti animali a seguito di cambiamenti alimentari. Hildebrand e coautori (1996, citato da De Smet et al., 2004) hanno osservato negli orsi risultati opposti a quelli trovati nella presente tesi. Infatti, nel loro caso, il SIR del carbonio nel plasma si equilibrava con la nuova dieta entro dieci giorni dalla variazione, mentre quello degli eritrociti continuava a cambiare anche dopo quaranta giorni. Anche Metges e coautori (1990) hanno studiato le variazioni del $\delta^{13}\text{C}$ nel siero ematico di vacche ed hanno riscontrato dei valori molto vicini a quelli della nuova dieta prelevando il sangue 14 giorni dopo il cambio di dieta (C3 vs C4 e viceversa). Le variazioni del rapporto isotopico del carbonio nella dieta si riflettono in tempi brevi anche nel caso delle urine, che possono essere considerate un derivato ematico. Wilson e coautori. (1988) hanno trovato che il valore del $\delta^{13}\text{C}$ delle urine prelevate al 6° ed al 7° giorno successivo al cambio brusco di alimentazione rifletteva quello della nuova dieta. Nel caso di cambiamento graduale di alimentazione (Knobbe et al., 2006), la stabilizzazione del

SIR del carbonio nelle urine è stata osservata, come nel latte, entro i tre giorni successivi al completamento della variazione stessa.

Le esperienze sopra riportate concordano sul fatto che nel plasma e nelle urine il rapporto isotopico del carbonio si modifica entro le due settimane successive alla variazione di dieta, differentemente da quanto osservato nel presente lavoro.

Per quanto riguarda il SIR dell'azoto, invece, si è osservato un significativo decremento dei valori sia nel plasma che negli eritrociti. Per entrambi i substrati considerati, sono stati necessari tredici giorni di alimentazione in stalla per ottenere dei valori di $\delta^{15}\text{N}$ significativamente diversi rispetto ai valori rilevati sugli animali che avevano consumato il pascolo per 75 giorni. Coerentemente con i risultati ottenuti sulla carne, abbiamo osservato un decremento dei valori dei rapporti isotopici nei due substrati ematici, nonostante si sia passati da un alimento con minore $\delta^{15}\text{N}$ ad uno con più alto rapporto ($\delta^{15}\text{N} = 1.07$ e 3.00% , rispettivamente per pascolo e per concentrato).

Figura 18. Andamento di $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ negli eritrociti (RBC, barre bianche) e nel plasma (PL, barre nere) in agnelli sottoposti a cambio di alimentazione da pascolo (giorno 0) a concentrato (giorni da 1 a 13). Le lettere diverse indicano diversità statistica nei valori medi.



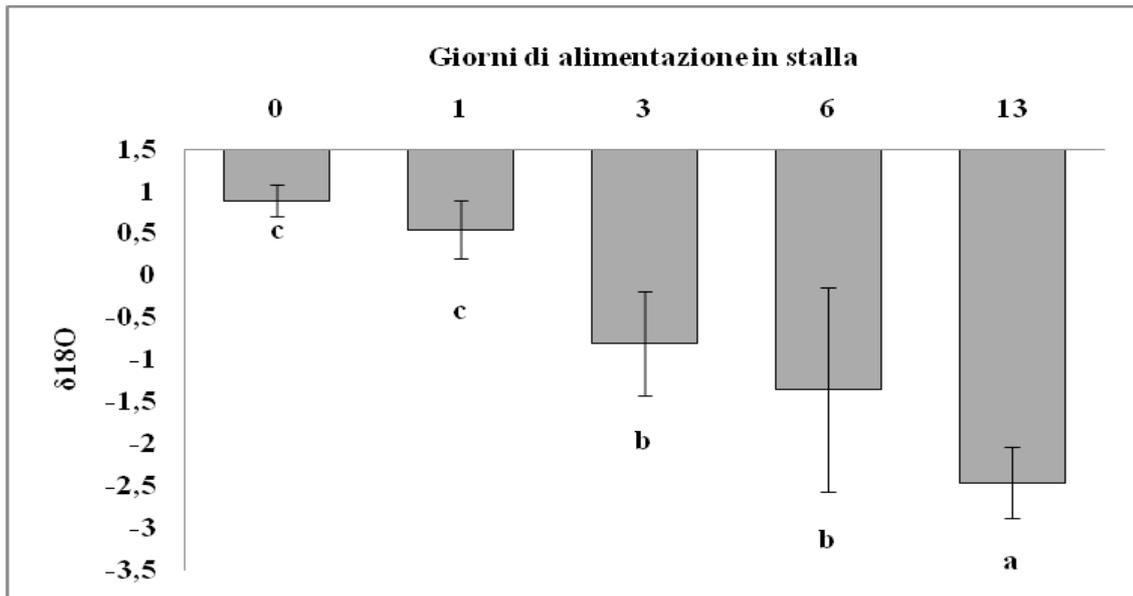
Il SIR dell'ossigeno negli eritrociti è stato significativamente influenzato dal numero di giorni di alimentazione in stalla ($p < 0.0005$; SEM 0.202); la figura 19 riporta l'andamento del $\delta^{18}O$ misurato negli eritrociti. I risultati sono estremamente interessanti. Infatti, il brusco passaggio dal pascolo al concentrato ha determinato un forte decremento del valore del SIR dell'ossigeno negli eritrociti, tale che già dopo soli tre giorni di diversa alimentazione esso sia risultato significativamente differente

rispetto al giorno zero. Il valore del $\delta^{18}\text{O}$ negli eritrociti è ulteriormente diminuito sino all'ultimo giorno di osservazione.

Il confronto tra i risultati osservati sugli eritrociti e quelli osservati sulla carne mette in evidenza una analogia ed una differenza. Sia negli eritrociti che nella carne abbiamo osservato una diminuzione dei valori del $\delta^{18}\text{O}$ all'aumentare del numero di giorni trascorsi in stalla. Tuttavia, nel caso della carne, i 14 giorni di alimentazione con concentrato non hanno permesso di ottenere un valore di $\delta^{18}\text{O}$ significativamente diverso tra P-S14 e P, che hanno mostrato entrambi valori statisticamente più alti rispetto ai gruppi P-S37 e S. Si può quindi ragionevolmente ipotizzare che 14 giorni di alimentazione in stalla siano stati sufficienti per modificare il $\delta^{18}\text{O}$ degli eritrociti ma insufficienti per modificare tale rapporto nella frazione proteica del muscolo.

È interessante osservare la alta variabilità nei dati rilevati nei giorni 3 e 6, variabilità che si riduce ritornando su valori simili a quelli rilevati nel giorno 1 in corrispondenza dell'ultimo controllo.

Figura 19. Andamento di $\delta^{18}O$ negli eritrociti di agnelli sottoposti a cambio di alimentazione da pascolo (giorno 0) a concentrato (giorni da 1 a 13).
Le lettere diverse indicano diversità statistica nei valori medi.



CONCLUSIONI

I risultati delle due prove sperimentali presentano alcuni aspetti innovativi degni di ulteriori approfondimenti.

Per quanto riguarda l'obiettivo tracciabilità del sistema di alimentazione, i risultati ottenuti indicano che i rapporti isotopici del carbonio e dello zolfo, rilevati nella carne sgrassata, hanno permesso di evidenziare i due brevi periodi di cambiamento alimentare. Infatti, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{34}\text{S}$ hanno permesso di separare i due gruppi alimentati con il sistema pascolo-stalla sia dagli animali alimentati esclusivamente al pascolo che da quelli alimentati solo in stalla per tutto il periodo sperimentale.

Secondo Bahar e coautori (2009) il muscolo non è un tessuto idoneo per individuare brevi periodi di variazioni alimentari indotti poco prima della macellazione. Tuttavia i risultati ottenuti in questa prova sembrano andare nella direzione opposta. Infatti, nelle nostre condizioni sperimentali, le differenze nei valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{34}\text{S}$ negli alimenti utilizzati hanno permesso di creare delle differenze nei rapporti isotopici del muscolo tali da differenziare i diversi gruppi. È importante evidenziare che questi risultati sono stati ottenuti utilizzando un regime alimentare razionato. Si può ipotizzare che in condizioni alimentari che garantiscono elevati incrementi medi giornalieri, "l'incremento nella massa di tessuto di nuova formazione possa permettere un più veloce equilibrio verso la nuova dieta rispetto al solo turnover metabolico" (Phillips & Eldridge, 2006) enfatizzando ulteriormente il fenomeno da noi osservato.

È importante sottolineare, in merito al SIR del carbonio, che i risultati osservati derivano dall'impiego esclusivo di piante C3 nell'alimentazione degli agnelli.

Un altro risultato innovativo riguarda l'elevata correlazione evidenziata tra il $\delta^{13}\text{C}$ della carne e quello degli eritrociti, che pertanto potrebbero essere considerati dei buoni mezzi per stimare il rapporto isotopico della carne. Tuttavia, i risultati ottenuti indicano che il SIR degli eritrociti può essere utilizzato senza dubbio per distinguere sistemi di alimentazione esclusivamente al pascolo da quelli esclusivamente in stalla. Nei sistemi misti, pascolo e stalla, invece, l'uso del $\delta^{13}\text{C}$ negli eritrociti non è attendibile. Infatti con i dati della seconda prova abbiamo visto che il $\delta^{13}\text{C}$ degli eritrociti cambia velocemente: già al sesto giorno successivo al cambiamento di alimentazione esso presenta un valore significativamente differente rispetto al valore iniziale e continua a cambiare sino al 13° giorno successivo al cambio di dieta. I dati della prima prova forniscono una ulteriore conferma: infatti il $\delta^{13}\text{C}$ degli eritrociti del gruppo P-S14 differisce significativamente da quello del gruppo P e dei gruppi P-S37 ed S che, invece, sono eguali tra loro. Ciò induce ad ipotizzare che nel periodo di tempo intercorso tra i 14 ed i 37 giorni di nuova alimentazione, si sia avuto il completo assestamento di questo parametro.

Il rapporto isotopico dell'ossigeno ha permesso di differenziare la carne degli animali allevati esclusivamente al pascolo da quelli alimentati esclusivamente in stalla, risultato che viene osservato per la prima volta in letteratura. Il cambio di alimentazione, cioè il sistema misto pascolo-stalla, non è stato invece individuabile nella carne. Infatti nel caso del periodo più breve di alimentazione in stalla la carne ha assunto valori eguali a quelli degli animali allevati solo al pascolo, mentre nel caso del

periodo più lungo la carne ha assunto gli stessi valori degli animali allevati esclusivamente in stalla. Il $\delta^{18}\text{O}$ rilevato negli eritrociti con la seconda prova mette in evidenza la estrema velocità di cambiamento del parametro. Infatti il SIR dell'ossigeno negli eritrociti è cambiato molto velocemente, già al terzo giorno successivo al cambio di dieta, ed ha continuato a diminuire sino all'ultimo giorno di osservazione sperimentale. Anche se eritrociti e muscolo presentano un diverso metabolismo e quindi un diverso turnover, è evidente che anche nel muscolo la sostituzione dell'ossigeno avviene abbastanza velocemente, tanto che 37 giorni di alimentazione in stalla, cioè il più lungo tra i due periodi di sperimentazione, permettono di mascherare la precedente alimentazione al pascolo e non differenziano questi animali da quelli alimentati sempre in stalla.

Ringraziamenti

Ringrazio tutte le persone che ho conosciuto e mi hanno sostenuta durante la mia permanenza al Centro di Ricerca IASMA di San Michele all'Adige (TN); in modo particolare il mio ringraziamento è volto sia alla dott.ssa Federica Camin che ha saputo seguirmi e consigliarmi e sia a Luca Ziller ottimo mentore ma soprattutto grande amico.

Ringrazio la Facoltà di Agraria in Reggio Calabria e l'azienda zootecnica di Vibo Valencia che mi hanno permesso di svolgere la prova sperimentale in campo e ringrazio tutte le persone che ho conosciuto durante questo percorso le quali hanno reso piacevole e meno pesante il mio lavoro di ricerca.

Ringrazio la Facoltà di Agraria in Catania e la prof.ssa Luisa Biondi che mi hanno permesso di svolgere il presente dottorato di ricerca.

La fine è un grande inizio...

BIBLIOGRAFIA

- Angerosa F., Bréas O., Contento S., Guillou C., Reniero F. & Sada E., 1999. Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 1013–1017.
- Aurousseau B., Bauchart D., Calichon E., Micol D., Priolo A., 2004. Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the M. *Longissimus thoracis* of lambs. *Meat Science*, 66, 531–541.
- Aurousseau B., Bauchart D., Galot A. L., Prache S., Micol D., Priolo A., 2006. Indoor fattening of lambs raised on pasture: 2. Influence of stall finishing duration on triglyceride and phospholipid fatty acids in the *Longissimus thoracis* muscle. *Meat Science*, 76, 417-427.
- Bahar B., Moloney A. P., Monahan F. J., Harrison S. M., Zazzo A., Scrimgeour C. M., Begley I. S., Schmidt O., 2009. Turnover of carbon, nitrogen and sulphur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: implication for isotopic authentication of meat. *Journal Animal Science*, 87, 905-913.
- Bahar B., Monahan F. J., Moloney A. P., O’Kiely P., Scrimgeour C. M., Schmidt O., 2005. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 1937-1942.
- Bahar B., Schmidt O., Moloney A.P., Scrimgeour C.M., Begley I.S., Monahan F.J., 2008. Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef. *Food Chemistry*, 106, 1299-1305.
- Becker E. M., Christensen J., Frederiksen C. S., Haugaard V. K., 2003. Front-Face Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in Analysis of Yogurt: Rapid

- Analysis of Riboflavin. *J. Dairy Sci.* 86, 2508-2515.
- Benson S., Lennard C., Maynard P. & Roux C., 2006. Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry – A review. *Forensic Science International*, 157(1), 1–22.
- Besle J. M., Lamaison J. L., Dujol B., Pradel P., Fraisse D., Viala D., Martin B., 2005. Flavonoids and other phenolics in milk as a putative tool for traceability of dairy production systems. In: J. F. Hocquette and S. Gigli, Editors, *Indicators of Milk and Beef Quality*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. vol. 112, pp. 345–350.
- Besle J. M., Lamaison J. L., Pradel P., Fraisse D., Viala D., Martin B., 2004. Les flavonoïdes, des fourrages au lait. In: Proc. 11emes Renc. Rech. Rumin., Paris, France, pp. 67–70.
- Biondi L., Nudda A., Mele M., 2010. Metodi analitici per la tracciabilità geografica e di processo dei prodotti lattiero-caseari. In: Sicurezza e tracciabilità nei sistemi di produzione del latte. A cura di Cassandro M., Mele M., Trevisi E., Aracne Editrice s.r.l., Roma.
- Boner M. & Forstel H., 2004. Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 301-310.
- Boutton T. W., Tyrrell H. F., Patterson B. W., Varga G. A., Klein P. D., 1988. Carbon kinetics of milk formation in Holstein cows in late lactation. *Journal Animal Science*, 66, 2636-2645.
- Brescia M. A., Kosir I. J., Caldarola V., Kidric J. & Sacco A., 2003. Chemometric classification of Apulian and Slovenian wines using ¹H NMR and ICP-OES together with HPICE data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 21–26.
- Bricout J., Koziat J., 1985. Detection of the addition of sugar to orange juice by isotopic

- analysis. *Science Alimentary*, 5, 197-204.
- Camin F., Bontempo L., Heinrich K., Horaceck M., Kelly S. D., Schlicht C., Thomas F., Monahan F. J., Hoogewerff J., Rossmann A., 2007. Multi-element (H, C, N, S) stable isotope characteristics of lamb meat from different European regions. *Analysis Bio-analysis Chemistry*, 389, 309-320.
- Camin F., Coloru G. C., Depentori D., Franco M. A., Manca G., Versini G., 2001. Dieta-origine geografica, latte e formaggio: riscontri con l'analisi isotopica. In: *Proced. III International Meeting ANFOSC "I formaggi d'alpeggio e loro rintracciabilità"*, 132-145, Bella (PZ), Italy.
- Camin F., Larcher R., Perini M., Bontempo L., Bertoldi D., Gagliano G., Nicolini G., Versini G., 2010. Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chemistry* 118, 901–909.
- Camin F., Perini M., Colombari G., Bontempo L., Versini G., 2008. Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios of milk. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 22, 1690-1696.
- Camin F., Versini G., Gagliano G., Concolato G. & Grandi C., 2001. Regional origin assignment of italian orange juices by multielement and multicomponent stable isotope ratio analysis. 6th International Symposium on Food Authenticity and Safety. Nantes, France.
- Cerbulis J., Flanagan V. P., Farrell J. H. M., 1985. Composition of the hydrocarbon fraction of goats' milk. *J. Lipid Res.* 26, 1438–1443.
- Clark I. & Fritz P., 1997. *Environmental isotopes in hydrogeology*. New York: Lewis Publishers, 35–78.
- Commission of the European Union (2000) *Weissbuch zur Lebensmittelsicherheit*

- [Standard Book of Food Safety],
http://www.europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_de.pdf,
accessed on 30 September 2004.
- Cornu A., Carnat A. P., Martin B., Coulon J. B., Lamaison J. L., Berdague J. L., 2001b. Solid phase microextraction of volatile components from natural grassland plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49 (1), 203–209.
- Cornu A., Kondjoyan N., Begnaud F., Micol D., Renou J. P., Berdague J. L., 2001a. Les terpenes des viandes, traceurs de l'alimentation et de l'origine géographique des animaux. In: Proc. emes Renc. Rech. Rumin., Paris, France, 61.
- Cozzolino D., De Mattos D., Vaz Martins D., 2002. Visible/near infrared reflectance spectroscopy for predicting composition and tracing system of production of beef muscle. *Animal Science*, 74, 477–484.
- Crittenden R. G., Andrew A. S., LeFournour M., Young M. D., Middleton H., Stockmann R., 2007. Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. *International Dairy Journal*, 17, 421-428.
- Croissant A. E., Washburn S. P., Dean L. L. and Drake M. A., 2007. Chemical Properties and Consumer Perception of Fluid Milk from Conventional and Pasture-Based Production Systems. *Journal Dairy Science* 90:4942–4953.
- Dawson T. E., Mambelli S., Plamboeck, A. H., Templer, P. H., Tu K. P., 2002. Stable isotopes in plant ecology. *Annu. Rev. Ecology. System*, 33, 507–559.
- De Feo, V., Quaranta E., Fedele V., Claps S., Rubino R., Pizza C., 2006. Flavonoids and terpenoidi in goat milk in relation to forage intake. *Ital. J. Food Sci.* 18, 85-92.
- De Niro M. J. & Epstein S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 495-506.

- De Niro M. J. and Epstein. S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica. Cosmochimica. Acta* 45:341–351.
- De Niro M. J., Epstein S., 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 197, 261–263.
- De Smet S., Balcaen A., Claeys E., Boeckx P., Van Cleemput O., 2004. Stable carbon isotope analysis of different tissues of beef animals in relation to their diet. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 18, 1227-1232.
- 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"* pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 219 del 20 settembre 2003.
- Decreto Ministero delle Politiche Agricole e Forestali 24 luglio 2003. *"Disciplina del sistema di rintracciabilità del latte al fine di assicurare la più ampia tutela degli interessi del consumatore"* pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 179 del 4 Agosto 2003.
- Decreto Ministero delle Politiche Agricole e Forestali 30 agosto 2000. *"Indicazioni e modalità applicative del regolamento (CE) n. 1760/2000 sull'etichettatura obbligatoria e su quella facoltativa delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine"* pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 268 del 16 novembre 2000.
- Descalzo A. M., Insani E. M., Biolatto A., Sancho A. M., García P. T., Pensel N. A. & Josifovich J. A., 2005. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science*, 70, 35–44.
- Deslandes D., Gariépy C., Houde A., 2001. Review of microbiological and biochemical effects of skatole on animal production. *Livestock Production Science* 71, 193–200.

- Dian P. H. M., Andueza D., Jestin M. Prado I. N., Prache S., 2008. Comparison of visible reflectance spectroscopy to discriminate between pasture-fed and lamb carcasses. *Meat Science*.
- Drake M. A., McIngvale S. C., Cadwallader K. R. & Civille G. V., 2001. Development of a descriptive sensory language for Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 66, 1422–1427.
- Drake M. A., Yates M. D., Gerard P. D., Delahunty C. M., Sheehan E. M., Turnbull R. P., Dodd T. M., 2005. Comparison of differences between lexicons for descriptive analysis of Cheddar cheese flavour in Ireland, New Zealand, and the United States of America. *International Dairy Journal*, 15, 473–48.
- Dunbar J., Wilson A. T., 1982. Determination of geographic origin of caffeine by stable isotope analysis. *Anal. Chemistry*, 54, 590-592.
- Elgersma A., Ellen G., Van der Horst H., Boer H., Dekker P. R., Tamminga S., 2004. Quick changes in milk fat composition from cows after transition from fresh grass to a silage diet. *Animal Feed Science Technology*, 117 (1), 13–27.
- Elmore J. S., Mottram D. S., Enser M. & Wood J. D., 2000. The effects of diet and breed on the volatile compounds of cooked lamb. *Meat Science*, 55(2), 149–159.
- Elmore J. S., Warren H. E., Mottram D. S., Scollan N. D., Enser M., Richardson R. I., 2004. A comparison of the aroma volatiles and fatty acid compositions of grilled beef muscle from Aberdeen Angus and Holstein–Friesian steers fed diets based on silage or concentrates. *Meat Science*, 68(1), 27–33.
- Engel E., Ferlay A., Cornu A., Chilliard Y., Agabriel C., Bielicki G., Martin B., 2007. Relevance of isotopic and molecular biomarkers for the authentication of milk according to production zone and type of feeding of the cow. *Journal Agric. Food Chemistry*, 55, 9099-9108.

- Enser M., Hallet K. G., Hewett B., Fursey, G. A., Wood J. D. & Harrington G., 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relating to production system and implication for human nutrition. *Meat Science*, 49, 329–341.
- Fogel M. L., Cifuentes L. A., 1993. Isotope fractionation during primary production. In: Engel, M. H., Macko, S. A. (Eds.), *Organic Geochemistry. Principles and Applications*. Plenum Press, New York, London, pp. 73–98.
- Franke B. M., Gremaud G., Hadorn R., Kreuzer M., 2005. Geographic origin of meat – elements of an analytical approach to its authentication. *Eur. Food Res. Technology*, 221, 493-503.
- Fraser K., Lane G. A., Morris G. A. and Cullen N. G., 2006. Effects of facial eczema on indole flavour compounds in dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. Vol 66.
- French P., Stanton C., Lawless F., O'Riordan E. G., Monahan F. J., Caffrey P. J., Moloney A. P., 2000. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grass, grass silage, or concentrate-based diets. *Journal Animal Science*, 78, 2849–2855.
- Galimov E. M., 1966. Isotopic composition of the carbon of soil CO₂. *Geokhimiya* 9, 1110-1118.
- Galimov E. M., 1985. *The Biological Fractionation of Isotopes*. Academic Press: New York.
- Galvin K., Morrissey P. A., Kerry J. P., Buckley D. J. & Moloney A. P., 2000. Volatile composition of beef as influenced by forage and concentrate- based diets. In *Proceedings of the 46nd international congress of meat science and technology*, Buenos Aires, Argentina 162–163.
- Gatellier P., Mercier Y., Juin H. & Renerre M., 2005. Effect of finishing mode (pasture-

- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *Meat Science*, 69(1), 175–186.
- Gebbing T., Schellberg J., Kühbauch W., 2004. Switching from grass to maize diet changes the C isotope signature of meat and fat during fattening of steers. In Proc. 20th general meeting of the European Grassland Federation. *Grassland Science in Europe*, 9 1130-1132. Lucern: European Grassland Federation.
- Giraudon S., Danzart M. & Merle M. H., 2000. Deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy and stable carbon isotope ratio analysis/mass spectrometry of certain monofloral honeys. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists Intl*, 83, 1401–1409.
- Gonzales-Martin I., Gonzales-Perez C., Hernandez Mendez J. & Sanchez Gonzales C., 2001. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Science*, 58, 25–30.
- Gonzales-Martin I., Gonzales-Perez C., Hernandez Mendez J., Marques-Marcia E. & Sanz Poveda F., 1999. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. *Meat Science*, 52, 437–441.
- Gonzalves A., Armenta S., De La Guardia M., 2009. Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 11, 1295-1311.
- Hansel A. & Mar, T. D., 2004. Foreword. *International Journal of Mass Spectrometry*, 239, vii–viii.
- Harrison S. M., Schmidt O., Moloney A. P., Kelly S. D., Rossmann A., Schellenberg A., Camin F., Perini M., Hoogewerff J., Monahan F. J., 2010. Tissue turnover in ovine muscle and lipids as recorded by multiple (H, C, O, S) stable isotope ratios. *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem. In press.

- Harrison S. M., Zazzo A., Bahar B., Monahan F. J., Moloney A. P., Scrimgeour C. M., Schmidt O., 2007. Using hooves for high-resolution isotopic reconstruction of bovine dietary history. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 21, 4, 479-486.
- Heaton H. T. E., 1987. The $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of plants in South Africa and Namibia: relationship to climate and coastal/saline environments. *Oecologia*, 74, 236–246.
- Heaton K., Kelly S. D., Hoogewerff J., Woolfe M., 2008. Verifying the geographical origin of beef: the application of multi-element isotope and trace element analysis. *Food Chemistry*, 107, 506-515.
- Hebert C. E. & Wassenaar L. I., 2001. Stable nitrogen isotopes in waterfowl feathers reflect agricultural land use in Western Canada. *Environmental Science and Technology*, 35, 3482–3487.
- Herbert S., Mouhous Riou N., Devaux M. F., Riaublanc A., Bouchet B., Gallant J. D., 2000. Monitoring the identity and the structure of soft cheeses by fluorescence spectroscopy. *Le Lait*, 80, 621–634.
- Hubner H., 1986 Isotope effects of nitrogen in the soil and biosphere. In: Fritz P, Fontes JC (eds) *Handbook of environmental isotope geochemistry*, vol 2. Elsevier, Amsterdam, pp 361-425.
- Ibanez E., Cifuentes A., 2001. New analytical techniques in food science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41, 413–450.
- Keen A. R. & Wilson R. D., 1992. Pasture feeding—a contribution of additional flavour nuances to milk fat and meat flavour. In *Milk fat flavour forum*. 24, 31. Palmerston North, New Zealand: New Zealand Dairy Research Institute.
- Kelly S. D., 2003. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In M. Lees (Ed.), *Food authenticity and traceability*. 156-183. Cambridge: woodhead Publishing.

- Knobbe N., Vogl J., Pritzkow W., Panne U., Fry H., Lochotzke H. M., Preiss-Weigert A., 2006. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 104-108.
- Kornexl B. E., Rossmann A., Schmidt H. L., 1996. Improving fruit juice origin assignment by combined carbon and nitrogen isotope ratio determination in pulps. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 202, 55–59.
- Kornexl B. E., Werner T., Rossmann A., Schmidt H. L., 1997. Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients—a possible tool for origin assignment and quality control. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 205, 19-24.
- Kotz & Treichel, 2003. *Chimica*. EdiSes II edizione.
- Kreitler C. W. & Jones D. C., 1995. Natural soil nitrate: the cause of the nitrate contamination of groundwater in Runnels County, Texas. *Ground Water*, 13, 53-62.
- Krouse H. R.; Stewart J. W. B.; Grinenko V. A., 1991. Pedosphere and biosphere. In *Stable Isotopes: Natural and Anthropogenic Sulfur in the Environment*, SCOPE 43; Krouse, H. R., Grinenko, V. A., Eds.; Wiley: New York, pp 267-306.
- Kuzdzal-Savoie S., Kuzdzal W., 1961. Influence de la mise a l’herbe des vaches laitières sur les indices de la matière grasse du beurre et sur les teneurs en différents acides gras poly-insaturés. *Lait* 41, 369–398.
- Lane G. A. & Fraser K., 1999. A comparison of phenol and indole flavour compounds in fat, and of phenols in urine cattle fed pasture or grain. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42(4), 289–296.
- Lane G. A., Fraser K., Kolver E. S., Rowan D. D., Allen J. M., Mills O. E., Abraham A. S., Olney S. D., 2002. Effect of a total mixed ration diet on the concentration of amino acid-derived volatiles in milk. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 62: 242-245.

- Larick D. K. & Turner B. E., 1990. Headspace volatiles and sensory characteristics of ground beef from forage- and grain-fed heifers. *Journal of Food Science*, 54(3), 649–654.
- Larick D. K., Hedrick H. B., Bailey M. E., Williams J. E., Hancock D. L., Garner G. B., Morrow R. E., 1987. Flavor constituents of beef as influenced by forage and grain-feeding. *Journal Food Science* 52 (2), 245–251.
- Lucas A., Agabriel C., Martin B., Ferlay A., Verdier-Metz I., Coulon J. B., 2006. Relationships between the conditions of cow's milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese, 86, 177–202.
- Makkar Harinder P. S., 2008. A review of the use of isotopic and nuclear techniques in animal production. *Animal Feed Science and Technology* 140 (2008) 418–443.
- Manca G., Camin F., Coloru G. C., Del Caro A., Depentor D., Franco M. A. & Versini G., 2001. Characterization of the geographical origin of Pecorino Sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1404-1409.
- Manca G., Franco M. A., Versini G., Camin F., Rossmann A., Toia A., 2006. Correlation between multielement stable isotope ratio and geographical origin in Peretta cows' milk cheese. *Journal Dairy Science*, 89, 831-839.
- Männel T. T., Auerswald K., Schnyder H., 2007. Altitude gradients of grassland carbon and nitrogen isotope composition are recorded in the hair of grazers. *Global Ecology and Biogeography*, Vol. 16, 5, 583-592.
- Mariotti A., Germon J. C., Hubert P., Kaiser P., Letolle R., Tardieux A. & Tardieux P., 1981. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil*, Vol. 62, 413-430.

- Martin B., Cornu A., Kondjayan N., Ferlay A., Verdier-Metz I., Pradel P., Rock E., Chilliard Y., Coulon J. B., Berdague J. L., 2005. Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows. In: Hocquette, J.F., Gigli, S. (Eds.), Proceedings of the European Association of Animal Production Publication on Indicators of Milk and Beef Quality, vol. 112. Bled, Slovenia, pp. 127–136.
- Martin G. J., Guillou C., Martin M. L., Cabanis M. T., 1988. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 36, 316-322.
- Maruri J. L. & Larick D. K., 1992. Volatile concentration and flavor of beef as influenced by diet. *Journal of Food Science*, 57(6), 1275–1281.
- Masud Zainal, Vallet Claude and Martin Gerard J., 1999. Stable Isotope Characterization of Milk Components and Whey Ethanol. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 47, 4693-4699.
- Meija J., Mounicou S. & Caruso J. A., 2004. Plasma spectrometry for elemental speciation and characterization in beverages. *Journal of AOAC International*, 87(1), 205–224.
- Metges C., Kempe K., Schmidt H. L., 1990. Dependence of the carbon-isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the $\delta^{13}\text{C}$ value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition*, 63, 187-196.
- MINITAB, versione 14, 1995. Reference Manual. Minitab Inc., State College, PA.
- Minson D. J., Ludlow M. M., Troughton J. H., 1975. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair farm cattle grazing tropical and temperate pastures. *Nature*, 256, 602.
- Moreno-Rojas, J. M., Vasta V., Lanza A., Luciano G., Ladroue V., Priolo A., 2008. Stable isotopes to discriminate lambs fed herbage or concentrate both obtained from

- C3-plants. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 3701-3705.
- Mottram D. S., 1998. Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62, 415–424.
- Naczk, M., & Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 95–111.
- Nakashita R., Suzuki Y., Akamatsu F., Iizumi Y., Korenaga T., Chikaraishi Y., 2008. Stable carbon, nitrogen and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. *Analytica Chimica Acta*, 617, 148-152.
- Nixon L. N., Wong E., Johnson C. B. & Birch E. J., 1979. Nonacidic constituents of volatiles from cooked mutton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(2), 355–359.
- Norman H. C., Wilmot M. G., Thomas D. T., Masters D. G, Revell D. K., 2008. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C3 annual pastures and saltbush or C4 perennial grasses. *Livestock Science*, 11.
- Norman H. C., Wilmot M. G., Thomas M. D., Masters D. G., Revell D. K., 2009. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C3 annual pastures and saltbush or C4 perennial grasses. *Livestock Science*, 121, 162-172.
- Nozière P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P., Doreau M., 2006b. Carotenoids in ruminants: from forages to dairy products. *Animal Feed Science Technology*, 131, 418–450.
- Perini M., Camin F., Bontempo L., Rossmann A., Piasentier E., 2009. Multielement (H, C, N, O, S) stable isotope characteristics of lamb meat from different Italian regions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 2573-2585.
- Phillips D. L. & Eldridge P. M., 2006. Estimating the timing of diet shifts using stable isotopes. *Oecologia*, 147, 195-203.

- Piasentier E., Valusso R., Camin F., Versini G., 2003. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*, 64, 239-247.
- Pillonel L., Badertscher R., Froidevaux P., Haberhauer G., Hölzl S., Horn P., Jakob A., Pfammatter E., Piantini U., Rossmann A., Tabacchi R., Bosset J. O., 2003. Stable isotope ratios, major, trace and radioactive elements in emmental cheeses of different origins. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 36, 615-623.
- Pillonel L., Luginbuhl W., Picque D., Schaller E., Tabacchi R. & Bosset J. O., 2003. Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese. Mid- and Near-Infrared spectroscopy. *European Food Research and Technology*, 216, 174–178.
- Pillonel L., Tabacchi R. & Bosset J. O., 2003. Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese. Summary of a screening study. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 94, 60–69.
- Prache S., Cornu A., Berdagué J. L. & Priolo A., 2006. Traceability of grass-feeding in small ruminants meat and milk: A review. *Options Méditerranéennes, Series A, No. 67*.
- Prache S, Cornu A, Berdague J. L., Priolo A., 2005. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research* 59 157–168.
- Prache S., Priolo A., Grolier P., 2003b. Effect of concentrate finishing on the carotenoid content of perirenal fat in grazing sheep: its significance for discriminating grass-fed, concentratefed and concentrate-finished grazing lambs. *Animal Science* 77, 225–233.
- Prache S., Theriez M., 1999. Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science* 69, 29–36.

- Prache, S., Priolo, A., Grolier, P., 2003a. Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass feeding. *Journal Animal Science* 81, 360–367.
- Priolo A., Bella M., Biondi L., Fasone V., Galofaro V., Scerra M., Valvo M. A., Lanza M., 2004a. Suckling lamb fatty acids as affected by ewes feeding system. In: *Proceedings of the 50th ICoMST, Helsinki, Finland*, pp. 1152–1154.
- Priolo A., Bella M., Lanza M., Galofaro V., Biondi L., Barbagallo D., Ben Salem H., Pennisi P., 2005. Carcass and meat quality of lambs fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium* L.) with or without polyethylene glycol or concentrates. *Small Ruminant Research* Vol. 50, 157-168.
- Priolo A., Ben Salem H., Atti N., Nefzaoui A., 2002b. Polyethylene glycol in concentrate or feedblocks to deactivate condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. 2. Effects on meat quality of Barbarine lambs. *Animal Science* 75, 137–140.
- Priolo A., Cornu A., Prache S., Krogmann M., Kondjoyan N., Micol D., Berdagu'e J. L., 2004b. Fat volatile tracers of grass feeding in sheep. *Meat Science* 66, 475–481.
- Priolo A., Micol D. & Agabriel J., 2001. Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour. A review. *Animal Research*, 50, 185–200.
- Priolo A., Prache S., Micol D., Agabriel J., 2002. Reflectance spectrum of adipose tissue to trace grass feeding in sheep: influence of measurement site and shrinkage time after slaughter. *Journal Animal Science* 80, 886–891.
- Priolo A., Vasta V., Fasone V., Lanza C. M., Biondi L., Bella M., Whittington F. M., 2009. Meat odour and flavour and indoles concentration in ruminal fluid and adipose tissue of lambs fed green herbage or concentrate with or without tannins. *Animal*.

Raes K., Balcaen A., Dirinck P., De Winne A., Claeys E., Demeyer D., 2003. Meat quality, fatty acid composition and flavour analysis in Belgian retail beef. *Meat Science*, 65(4), 1237–1246.

Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002. *“Stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare”*.

Regolamento (CE) n. 1830/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003. *“concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE”* pubblicato nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea il 18.10.2003.

Regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001 *“stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura”* pubblicato nella Gazzetta Ufficiale C.E. n. 278 del 23 ottobre 2001.

Regolamento (CE) n. 509/2006 del Consiglio del 20 marzo 2006. *“Relativo alle specialità tradizionali garantite dei prodotti agricoli e agroalimentari”*.

Regolamento (CE) n. 510/2006 del Consiglio del 20 marzo 2006. *“Relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli e alimentari”* pubblicato nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 31.3.2006.

Regolamento (CEE) n. 2676/90, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità

Europea 1990, n. 272 del 03 ottobre 1990.

Regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio n. 1760/2000 del 17 luglio 2000.

“Istituisce un sistema di identificazione e di registrazione dei bovini e relativo all'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine, e che abroga il regolamento (CE) n. 820/97 del Consiglio” pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea del 11 agosto 2000, n. L 204. Entrato in vigore il 14 agosto 2000.

Regolamento di Commissione (EC) n. 822/97, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea 1997.

Reniero F., Ziller L., Franco M. A., Del Caro A., Vacca V., 1993. Caratterizzazione dei mieli Italiani di diversa provenienza (Trentino Alto-Adige e Sardegna) mediante il rapporto 13C/12C. Riv. Merceol, 32,39-48.

Renou J. P., Bielicki G., Deponge C., Gachon P., Micol D., Ritz P., 2004b. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: Part II: Beef meat. Food Chemistry, 86, 251-256.

Renou J. P., Deponge C., Gachon P., Bonnefoy J. C., Coulon J. B., Garel J. P., Vèritè R., Ritz P., 2004a. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. Food Chemistry, 85, 63-66.

Richards M. P., Fuller B. T., Sponheimer M., Robinsont and Ayliffe L., 2003. Sulphur Isotopes in Palaeodietary Studies: a Review and Results from a Controlled Feeding Experiment. International Journal of Osteoarchaeology *Int. J. Osteoarchaeol.* **13**: 37–45. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/oa.654.

- Rossmann A., 2001. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Reviews International*, Vol. 17, 347-381.
- Rossmann A., Haberhauer G., Hölzl S., Horn P., Pichlmayer F., Voerkelius S., 2000. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *Eur. Food Res. Technol.*, 211, 32-40.
- Rossmann A., Kornexl B. E., Versini G., Pichlmayer F. & Lamprecht G., 1998. Origin assignment of milk from alpine regions by multielement stable isotope ratio analysis (SIRA). *Journal of Food Science and Nutrition*, Vol. 1, 9-21.
- Rossmann A., Rieth W., Schmidt H. L., 1994. Stable isotope ratio determination and its combination with conventional analyses (RSK values) for fruit juice authenticity control. In *Methods To Detect Adulteration of Fruit Juice Beverages*; Nagy, S., Wade, R. L., Eds.; Agscience: Anburndale, FL, Vol. I, pp 28-40.
- Roy N. C., Fraser K., Lane G. A., Sinclair B. R., McNabb W. C., 2004. Polyethylene glycol increases intestinal absorption and hepatic uptake of indole and skatole in sheep fed sulla. *Journal Animal Feed Science* 13, 339–342.
- Roy N.C., Fraser K., Lane G. A., Reynolds G. W., Deighton M. H., Peters J. S., Sinclair B.R., Death A. F., McNabb W. C., 2002. The effects of condensed tannins on the net fluxes of skatole and indole across the mammary gland and their secretion in milk of lactating ewes fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium*). *Australian Society of Animal Production* 24: 181–189.
- Sacco D., Brescia M. A., Buccolieri A., Caputi Jambrenghi A., 2005. Geographical origin and breed discrimination of Apulian lamb meat samples by means of analytical and spectroscopic determination. *Meat Science*, 71, 542-548.
- Schmidt H. L., Rossmann A., Voerkelius S., Schnitzler W. H., Georgi M., Grassmann J., 2005. Isotope characteristics of vegetables and wheat from conventional and

- organic production. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 41, 223–228.
- Schmidt H. L., Werner R. A. & Rossmann A., 2001. ^{18}O pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry*, 58, 9–32.
- Schreurs N. M., Tavendale M. H., Lane G. A., Barry T. N. & McNabb W. C., 2004. Effect of white clover (*Trifolium repens*), perennial grass (*Lolium perenne*) and *Lotus corniculatus* on in vitro skatole and indole formation. In Proceedings of the 25nd biennial conference of the Australian society of animal production, animal production in Australia, 4–8, Victoria, Australia pp. 164–167.
- Schreurs N. M., Tavendale M. H., Lane G. A., Barry T. N., Marotti D. M. and McNabb W. C., 2003. Postprandial indole and skatole formation in the rumen when feeding white clover, perennial ryegrass and *Lotus corniculatus*. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 63: 14-17.
- Schwertl M., Auerswald K., Schäufele R., Schnyder H., 2005. Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production systems? *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 109, 153-165.
- Sebastian I., Viallon-Fernandez C., Berge P., Berdague J. L., 2003. Analysis of the volatile fraction of lamb fat tissue: influence of the type of feeding. *Science Alimentary* 23, 497–511.
- Serrano E., Prache S., Chauveau B., Pradel P., Agabriel J. and Micol D., 2006. Traceability of grass-feeding in young beef using carotenoid pigments in plasma and adipose tissue. *Animal Science* 82, 909–918.
- Steele K. W. & Daniel R. M., 1978. Fractionation of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of ^{15}N for tracer studies. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 90, 7–9.
- Suzuki J., Bailey M. E., 1985. Direct sampling capillary GLC analysis of flavor

- volatiles from ovine fat. *Journal. Agriculture Food Chemistry* 33, 343–347.
- Tanz N and Schmidt H. L., 2010. $\delta^{34}\text{S}$ -Value Measurements in Food Origin Assignments and Sulfur Isotope Fractionations in Plants and Animals. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 3139–3146.
- Tavendale M. H, Lane G. A, Schreurs N. M, Fraser K. and Meagher L. P., 2005. The effects of condensed tannins from *Dorycnium rectum* on skatole and indole ruminal biogenesis for grazing sheep. *Aust Journal of Agriculture Science*. 56:1331-1337.
- Tranchida P. Q., Dugo P., Dugo G. & Mondello L., 2004. Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 3–16.
- Urbach G., 1990. Effect of feed on flavor in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 73(12), 3639–3650.
- Vasta V. & Priolo A., 2006. Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. *Meat Science*, 73, 218–228.
- Vasta V., Nudda A., Cannas A., Lanza M., Priolo A., 2007. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*.
- Vasta V., Pennisi P., Lanza M., Barbagallo D., Bella M., Priolo A., 2007. Intramuscular fatty acid composition of lambs given a tanniniferous diet with or without polyethylene glycol supplementation. *Meat Science*, 76, 739–745.
- Versini G., Camin F., Carlin S., Depentorio D., Gasperi F. & Ziller L., 2000. Accertamenti innovativi per la caratterizzazione e tutela delle produzioni tipiche di montagna. L'analisi chimica isotopica e dell'aroma. In: *Procede. V Convivio ANFOSC "Formaggi d'alpeggio: il pascolo, l'animale, la razza, il prodotto"* (pp. 145-158). Cavalese (TN), Italy.

- Versini G., Camin F., Carlin S., Detentori D., Gasperi F., Ziller L., 2003. Accertamenti innovativi per la caratterizzazione e tutela delle produzioni tipiche di montagna. L'analisi chimica isotopica e dell'aroma. Atti del Convegno "Formaggi d'alpeggio: il pascolo, l'animale, la razza, il prodotto" Cavalese (TN).
- Versini G., Monetti A., Reniero F., 1997. Monitoring authenticity and regional origin of wines by natural stable isotope ratios analysis. In *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*; Watkins, T. R., Ed.; ACS Symposium Series 661; American Chemical Society: Washington, DC; pp 113-130.
- Viallon C., Martin B., Verdier-Metz I., Pradel P., Garel J. P., Coulon J. B., Berdagué J. L., 2000. Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Lait*, 80, 635–641.
- Werner Roland A, Schmidt Hanns-Ludwig, 2002. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. *Phytochemistry* 61, 465–484.
- White J. W., Winters K., Martin P. & Rossmann A., 1998. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists Intl.*, 81, 610–619.
- Wilson G. F., MacKenzie D. D. S., Brookes I. M., 1988. Importance of body tissues as sources of nutrients for milk synthesis in the cow, using ^{13}C as a marker. *British Journal of Nutrition*, 60, 605-617.
- Wolter R., 1988. Besoins vitaminiques des ruminants. *INRA Production Animal*, 1 (5), 311–318.
- Wood J. D., Enser M., 1997. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Brit. Journal Nutrition*. 78, S49–S60.
- Wood J. D., Richardson R. I., Nute G. R., Fisher A. V., Campo M. M., Kasapidou E.,

- Sheard P. R., Enser M., 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 66, 21–32.
- Yang A., Larsen T. W., Tume R. K., 1992. Carotenoid and retinal concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoids transport in sheep, goats and cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 43, 1809–1817.
- Yoneyama T., 1995. Nitrogen metabolism and fractionation of nitrogen isotopes in plants. In E. Wada, T. Yoneyama, M. Minagawa, T. Ando, & B. D. Fry(Eds.). *Stable isotopes in the biosphere* pp. 92-102.
- Young O. A., Berdague J. L., Viallon C., Rousset-Akrim S. & Theriez M., 1997. Fat-borne volatiles and sheep meat odour. *Meat Science*, 45(2), 183–200.
- Young O. A., Lane G. A., Priolo A., Fraser K., 2003. Pastoral and species flavour in lambs raised on pasture, lucerne or maize. *Journal Science Food Agriculture.* 83, 93–104.
- Zazzo A., Harrison S. M., Bahar B., Moloney A. P., Monahan F. J., Scrimgeour C. M., Schmidt O. 2007. Experimental determination of dietary carbon turnover in bovine hair and hoof. *Can. J. Zool.*, 85, 1239-1248.
- Zazzo A., Moloney A. P., Monahan F. J., Scrimgeour C. M. and Schmidt O., 2008. Effect of age and food intake on dietary carbon turnover recorded in sheep wool. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 22: 2937–2945.
- Zuppi G. M., 2002. Tracing Nitrogen Sources. *Appunti di lezioni dell'Università di Cà Foscari di Venezia (Dipartimento di Scienze Ambientali).*