

# Impiego di sottoprodotti agroindustriali per il controllo dei nematodi gastrointestinali nei piccoli ruminanti



RUGGERO AMATO<sup>1</sup>, ALESSANDRO NAPPA<sup>1</sup>, GIUSEPPE MARTONE<sup>2</sup>,  
MIRELLA SANTANIELLO<sup>1</sup>, LUIGIA DI DONATO<sup>1</sup>, MARTINA NOCERINO<sup>1</sup>,  
GIUSEPPE CRINGOLI<sup>1</sup>, LAURA RINALDI<sup>1</sup>, ANTONIO BOSCO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II (CREMOPAR), Via Delpino 1, 80137 Napoli, Italia.

<sup>2</sup> Università Mercatorum, Facoltà di Scienze Tecnologiche e dell'Innovazione, Roma, Italia.

## ABSTRACT

L'impiego di sottoprodotti agroindustriali con potenziali attività antielmintiche, in associazione con la somministrazione di chemioterapici antiparassitari utilizzati in maniera razionale, potrebbe rivelarsi una delle strategie alternative per il controllo dei nematodi gastrointestinali (NGI) e di conseguenza per combattere l'antielmintico resistenza (AR). In questo scenario l'utilizzo di prodotti naturali ad attività antielmintica diventa una risorsa strategica per gli allevatori che hanno bisogno di massimizzare la propria produzione. Bisogna infatti considerare che le infestioni da elminti causano perdite produttive che ammontano a diversi milioni di euro nel settore dei piccoli ruminanti. Gli antielmintici naturali, se efficaci, sono prodotti senza tempi di sospensione e che al momento non danno luogo a fenomeni di resistenza o di inquinamento ambientale come invece capita per i farmaci antielmintici che rilasciano residui metabolici nell'ambiente. Lo spettro di antielmintici naturali derivati dai sottoprodotti, tuttavia, è vasto e complesso e viene spesso trattato senza tener conto di eventuali effetti secondari dei prodotti somministrati anche se minimi, di difficoltà di lavorazione e stoccaggio e di una serie di problemi logistici che potrebbero rendere questi prodotti non utilizzabili in campo. Questa review, con una disamina di test *in vitro* e *in vivo*, si pone come obiettivo l'analisi critica delle prospettive più concrete legate all'utilizzo di sottoprodotti agroalimentari utilizzati in Europa e nel bacino del Mediterraneo che dimostrino un potenziale antielmintico.

## PAROLE CHIAVE

Natural anthelmintic; agro-industrial by-products; anthelmintic resistance; plant secondary compounds; gastrointestinal nematodes.

## INTRODUZIONE

L'allevamento dei piccoli ruminanti, in Italia, è di grandissima importanza sia da un punto di vista economico-sociale, per la loro capacità di produrre rendita anche in aree marginali e difficilmente praticabili, che etnografico dato che i prodotti derivanti dai piccoli ruminanti hanno un profondo legame con le tradizioni. Le perdite economiche che gli elminti arrecano alle produzioni hanno un peso rilevante, soprattutto se si paragona il fatturato annuo complessivo del settore dei piccoli ruminanti, che ammonta a 739 milioni di euro, al costo annuo delle infestioni da elminti che arriva a circa 30 milioni di euro in Italia, mentre a livello europeo le perdite raggiungono i 686 milioni di euro [2,3].

Al contempo il problema dell'antielmintico resistenza (AR) è tale da aver stimolato la piena partecipazione del mondo scientifico a cercare valide alternative al farmaco antielmintico, e da aver dunque incoraggiato la nascita di reti internazionali come

la COST Action 16230-COMBAR (Combatting Anthelmintic Resistance in Ruminants - COMBAR, <https://www.combar-ca.eu/>), progetti di ricerca tra cui LIFEMICLIFEED (Mitigating climate impact of small ruminants through innovative feeding approaches, <https://www.lifemiclifefeed.eu/it>) e consorzi internazionali tra cui STAR-IDAZ (International Research Consortium on Animal Health; <https://www.star-idaz.net>) e LiHRA (Livestock Helminth Research Alliance; <https://www.lihra.eu>), nonché strumenti, piattaforme e progetti di diffusione delle informazioni e supporto decisionale tra cui DISCONTOOLS (DISease CONTROL TOOLS; <https://www.discon-tools.eu>) e SPARC (Sustainable PARAsite Control in Grazing Ruminants; <https://wormsparc.com/>) [4]. A livello nazionale il controllo delle parassitosi rientra nel sistema di categorizzazione del rischio aziendale "Classyfarm" (<https://www.classyfarm.it>) ed è uno degli obiettivi di ricerca di società scientifiche del settore ovino e caprino come la SIPAOC (Società Italiana di Patologia e di Allevamento degli Ovini e dei Caprini; <https://www.sipaoc.it/>).

Per meglio comprendere le difficoltà legate alla gestione e al trattamento dei nematodi gastrointestinali (NGI) bisogna considerare che difficilmente in campo si riscontrano situazioni idea-

li, in cui in un allevamento è presente un solo genere di NGI. È invece la norma trovare più generi e/o specie differenti di elminti che sono all'origine di un'azione infiammatoria/traumatica e privativa dei principi nutritivi, con ripercussioni negative sull'accrescimento, sulla fecondità, sullo stato di salute e più in generale sulla capacità produttiva e sul benessere degli animali [5,6].

Bisogna infatti ricordare che la presenza di più generi/specie di elminti in uno stesso ospite facilita l'instaurarsi dell'antielmintico resistenza a causa della maggior difficoltà nella scelta del dosaggio e della molecola antiparassitaria da utilizzare.

## ANTELINTICO RESISTENZA E SOTTOPRODOTTI

Spesso sottostimata, l'AR, ovvero la capacità ereditabile di un elminto di resistere ad un antielmintico, è molto diffusa ma spesso indagata in modo approfondito soltanto nei paesi che hanno realmente percepito questo pericolo e che ne stanno su-

bendo le inevitabili conseguenze. Infatti, buona parte degli studi condotti in Europa in relazione all'AR sono stati svolti nel nord Europa, concentrandosi prevalentemente sulla problematica nel settore ovino [7]. In Italia, nonostante l'AR sia fortunatamente in una fase "precoce" rispetto ad altri paesi, alcuni studi hanno evidenziato che l'insorgenza dell'AR verso i benzimidazolici (BZ) negli allevamenti dei piccoli ruminanti è in aumento in questi ultimi anni [8] rispetto alla piena efficacia dei farmaci antielmintici registrata fino ad un decennio fa [9]. Gli *stakeholders* nazionali e internazionali hanno pertanto riconosciuto il rischio emergente di AR e convenuto che occorre intraprendere azioni concrete (diagnosi con tecniche standardizzate; uso strategico dei farmaci con trattamenti selettivi; approcci di controllo integrati e complementari basati sull'utilizzo di sostanze naturali e razze geneticamente resistenti) al fine di prevenire l'AR [10].

Tra i prodotti di origine naturale che potrebbero avere un effetto antielmintico vi sono i "sottoprodotti agroalimentari", ovvero residui di produzione dell'industria agroalimentare. Il riutilizzo e la valorizzazione dei sottoprodotti non soltanto è fon-



**Sottoprodotti del pomodoro**



**Sottoprodotti degli agrumi**



**Sottoprodotti dell'uva**



**Sottoprodotto delle olive**

damentale da un punto di vista ambientale ma anche da quello sanitario, dato che spesso i prodotti di scarto sono in realtà ricchissimi di biomolecole ad azione antelmintica, tra cui flavonoidi, tannini e terpeni. Esistono tuttavia una serie di problemi legati all'uso dei sottoprodotti quali la difficoltà di somministrazione, la scarsa omogeneità nella loro composizione, la difficoltà di approvvigionamento, la scarsa palatabilità di alcuni prodotti, l'eventuale presenza di molecole pericolose [11]. Questa review si pone come principale obiettivo quello di analizzare i sottoprodotti (Fig. 1) che abbiano dimostrato efficacia *in vivo* oltretutto *in vitro*, che siano prodotti in Europa e nel bacino del Mediterraneo e che vengano lavorati in quantità tali da poter essere concretamente utilizzati nella lotta integrata agli elminti nei piccoli ruminanti.

## COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTIELMINTICA

L'efficacia antelmintica dei prodotti in esame è stata associata alla presenza di una serie di metaboliti secondari delle piante (*Plant Secondary Compounds* - PSC) presenti in un gran numero di famiglie botaniche. Ad esempio, il potenziale utilizzo della cicoria (*Cichorium intybus*) per le sue proprietà antelmintiche è stato correlato alla presenza di sesquiterpeni lattonicici, mentre le proteinasi sono state reputate responsabili dell'attività antelmintica in diverse piante tropicali [12]. Alcune specie foraggiere della famiglia delle leguminose (*Fabaceae*) contenenti tannini condensati (TC) sono state utilizzate come mo-

delli per esplorare gli effetti antelmintici di questa particolare classe di PSC [13]. La valutazione dell'efficacia dei PSC contro i parassiti si basa generalmente su una serie di test *in vitro*, seguiti in alcuni casi da studi *in vivo*, in condizioni sperimentali controllate. Lo studio di queste alternative ai farmaci ha portato ad una serie di conclusioni: la presenza di foraggi contenenti TC nella dieta dei ruminanti può influenzare la dinamica delle infestazioni da NGI, interrompendo alcune fasi del ciclo di vita dei NGI. L'attività antiparassitaria è stata associata alla presenza di TC e anche di altri polifenoli correlati, come i flavonoidi, che sono precursori biosintetici dei TC. Inoltre, a differenza dei farmaci antelmintici, i mangimi nutraceutici non vengono "imposti" (somministrati con la forza) ma "proposti" agli animali. Pertanto, gli effetti antelmintici di prodotti contenenti PSC dipendono dall'assunzione volontaria di mangime da parte degli animali, dalla durata per cui i PSC (o gli alimenti che li contengono) vengono somministrati e dalla quantità di PSC stessi presenti nella razione alimentare [14].

## COMPOSTI BIOATTIVI VEGETALI

I polifenoli sono composti organici costituiti da gruppi fenolici associati e, quelli naturali, svolgono nelle piante una serie di funzioni tra cui antimicrobica, antifungina e protettiva nei confronti di alcuni parassiti delle piante. Se intesi da un punto di vista esclusivamente "nutraceutico" l'efficacia dei polifenoli è ancora dubbia, infatti non vengono assorbiti tal quali ma a seguito di una prima metabolizzazione a carico della microflora intestinale che produce un enzima, la tannasi, che scinde i tannini [15] e di una seconda metabolizzazione epatica [16]. I tannini, una specifica classe di polifenoli, godono di particolare interesse da parte dei parassitologi grazie agli ottimi effetti dimostrati *in vitro* da alcuni composti contenenti i tannini stessi [14]. Queste molecole tuttavia presentano alcune problematiche, in particolare se somministrati in dosi eccessive possono risultare fattori anti-nutrizionali, diminuendo sia l'ingestione volontaria da parte degli animali (a causa del sapore non particolarmente gradito) [17] sia la digeribilità delle proteine, legandosi a queste e rendendole non facilmente assimilabili [18].

Per di più queste sostanze evaporano a temperature relativamente basse (circa 60 °C) e in alcuni processi di estrazione vengono perse producendo un estratto con un contenuto di polifenoli inferiore a quello atteso che potrebbe dunque dare adito a risultati diversi da quanto aspettato. Inoltre, per quanto riguarda i processi di estrazione, bisogna ricordare che molti polifenoli sono lipofili, per cui negli estratti acquosi potrebbe essere presente un panel di polifenoli diverso da quello che ci si potrebbe aspettare da una determinata biomassa vegetale. In aggiunta hanno scarsissima palatabilità, tanto che i PSC potrebbero essere prodotti dalle piante appositamente per scoraggiare gli erbivori al consumo [19].

I terpeni sono molecole aromatiche ampiamente prodotte nelle piante, basti pensare che un terzo del database del *Dictionary of Natural Products* (<http://dnp.chemnetbase.com/>) è occupata dalle molecole del cosiddetto "terpenoma". I terpeni sono molecole lipofile e altamente volatili che spesso si trovano, insieme ad altri composti organici volatili, negli oli essenziali. I terpeni, come dimostrato da diversi studi, hanno una moderata efficacia antelmintica, arrivando a ridurre sia le dimensioni che la produzione di uova di alcuni NGI, tra cui *Haemoncus con-*



Figura 2 - Lavorazione e sottoprodotti delle nocciole.

*tortus*, inducendo tuttavia una diminuzione della sostanza secca ingerita allo stesso dosaggio identificato come terapeutico (50 mg/kg per un periodo di 45 giorni) [20]. L'incapsulamento dei terpeni vegetali, avendo a che fare con ruminanti, risulta ancora una volta una soluzione pratica ed efficace per "salvaguardare" il PSC in questione e permettere il bypass del ruminante, in modo da arrivare quanto più inalterato possibile a contatto con i nematodi [21].

## EFFICACIA ANTIELMINTICA DEI SOTTOPRODOTTI AGROINDUSTRIALI

### Sottoprodotti della nocciola

La nocciola (*Corylus avellana*) è largamente coltivata a livello globale. I paesi che affacciano sul Mediterraneo, in particolare Turchia e Italia, sono tra i maggiori produttori al mondo [22]. Dalla lavorazione delle nocciole si ricavano vari sottoprodotti come guscio, perisperma e pannello (che deriva dall'estrazione dell'olio dal seme) che rappresentano una parte importante della produzione delle nocciole (Fig. 2). Il solo guscio esterno costituisce il 50% del peso della nocciola e, pur disponendo di un certo contenuto di molecole biologicamente attive, l'utilizzo più appropriato potrebbe essere come combustibile a basso costo [23]. Inoltre, alcuni dei maggiori produttori di questo frutto e dei suoi sottoprodotti sono paesi in cui si pratica ancora una zootecnia di tipo estensivo e a tratti pastorale, realtà in cui l'autoproduzione di un composto efficace nei confronti dei NGI potrebbe contribuire concretamente al benessere degli animali. Il sottoprodotto più abbondante della nocciola, dunque, è il guscio esterno che è composto prevalentemente da lignina (40-50 %) con un contenuto in tannini e polifenoli in genere decisamente inferiore all'endocarpo (2,8% versus 32,6%) [24]. Considerando anche il volume occupato dai gusci, la difficoltà di trattarli per i processi di estrazione e la scarsa palatabilità da parte degli animali, i gusci di nocciola non sono buoni candidati come prodotti nutraceutici ad attività antielmintica. Di maggior interesse, ai fini dell'uso antielmintico, è invece il perisperma, ovvero la sottile pellicola scura che racchiude la nocciola. Il perisperma rappresenta uno scarto abbondante, leggero, poco voluminoso e piuttosto grasso (fino al 12% del peso totale) [25] della produzione di nocciole pelate. I problemi principali di questo sottoprodotto sono proprio la conservazione, a causa della presenza di grassi che possono facilmente andare incontro a irrancidimento, nonché il suo utilizzo tal quale nella razione degli animali anche in questo caso a causa dei grassi abbondanti. Ciononostante, la grande abbondanza di tannini, fino a 357,8 mg/g [24], la possibilità di realizzare estratti de-grassati e quindi facili da conservare e la facilità di trasporto della biomassa tra luogo di produzione e di estrazione/lavorazione rendono questo sottoprodotto un potenziale alleato nella lotta integrata agli elminti.

Benché la nocciola generi un buon quantitativo di sottoprodotti, e nonostante questi ultimi siano ricchi di PSC (soprattutto il perisperma), per quanto riguarda i test *in vitro* non è stato possibile reperire alcuna pubblicazione significativa relativa all'utilizzo di detti sottoprodotti.

Anche sul fronte dei test *in vivo*, sono piuttosto rari i lavori relativi all'utilizzo di sottoprodotti della coltivazione delle nocciole come antielmintico; uno studio di qualche anno fa [26] ha affrontato il tema analizzando le modifiche subite dai tan-

nini non rumino-protetti, somministrati in una dieta normoproteica, lungo il tratto digestivo degli agnelli. I risultati ottenuti sono interessanti poiché fino all'85% dei tannini presenti nella dieta era assente nelle feci, il che vuol dire che gli stessi sono stati metabolizzati dalla flora batterica dell'animale o assorbiti dalle pareti intestinali. Considerando la diminuzione dei tannini lungo il tratto digerente appare chiaro che in qualsiasi caso una prima importante modifica ha luogo nel ruminante; i tannini passano infatti da 5 gr/100 gr di sostanza secca (SS) del mangime a 1 gr/100 gr di SS nell'ingesta presente nel ruminante, un dato utile per sviluppare un dosaggio razionale per l'utilizzo *in vivo*. In un altro studio è stato paragonato l'utilizzo di pellettato di lupinella con l'aggiunta o meno di perisperma di nocciola post-pelletizzazione per il controllo di NGI negli ovini [27]. In sintesi, il pellet di lupinella non ha dato risultati soddisfacenti, dimostrando sin dalle prime analisi un basso quantitativo di polifenoli (0,9%), mentre l'aggiunta di perisperma di nocciola si è dimostrata utile nel ridurre fino al 60% l'eliminazione delle uova di NGI non aumentando tuttavia la mortalità dei nematodi adulti; si potrebbe dunque dedurre che in questo caso l'effetto principale sia stato la riduzione dell'ovodeposizione.

### Sottoprodotti della melagrana

Il melograno (*Punica granatum*) viene coltivato in tutti i paesi con un clima temperato, in particolare paesi che affacciano sul bacino del Mediterraneo, USA e India. La melagrana viene utilizzata principalmente nell'industria delle bevande, per ottenere un succo ricco di antiossidanti, e in quella della cosmesi. Da queste produzioni si ottengono sostanzialmente due sottoprodotti: le bucce e gli arilli (i semi che vengono privati del succo) (Fig. 3). Le bucce rappresentano circa il 50% del totale in peso del frutto e contengono una cospicua quantità di tannini e polifenoli (da cui il sapore fortemente amaro) fino a 245,47 mg/g di sostanza secca [28], arrivando ad avere un contenuto di flavonoidi 12,4 volte superiore al succo e ai semi [29]. Hanno una scarsissima palatabilità a causa del sapore fortemente amaro [30] il che li rende ottimi candidati alla somministrazione come estratto più che tal quali.

Gli arilli invece vengono sottoposti a spremitura, per cui perdono una cospicua parte di polifenoli e tannini che vengono "dilavati" con la spremitura stessa, risultando sostanzialmente in semi legnosi e di minore interesse parassitologico a causa del minor contenuto di biomolecole (i livelli di lignina e di cellulosa sono, rispettivamente, 21,44 e 18,71 % sulla sostanza secca) [31].

La pianta di *Punica granatum* è stata oggetto di studio come agente medicinale grazie al suo potenziale terapeutico, infatti varie parti della pianta (la corteccia, le foglie, i frutti e la buccia) hanno dimostrato una utilità medicinale [32]. Diversi studi *in vitro* hanno indicato i potenziali benefici derivanti dall'inclusione della melagrana nei mangimi dei ruminanti. In particolare, in alcuni di questi studi gli estratti della melagrana sono stati testati per valutare l'effetto antielmintico (nello specifico delle bucce di melagrana) contro l'infestazione da *H. contortus* nelle capre.

Hassan et al. (2020) [33], tramite un test *in vitro* (*Adult Worm Motility Test* - AWMt), hanno valutato l'effetto dell'estratto di melagrana sulla motilità degli adulti di *H. contortus*, saggiando varie concentrazioni del PEE (50, 100, 200 e 400 mg/ml) e annotando la motilità e la mortalità dei nematodi a diversi intervalli di tempo (0, 2, 4, 6 e 24 ore). È stato notato che al-

l'aumentare della concentrazione dell'estratto e del tempo di esposizione, aumentava anche la mortalità dei nematodi. La concentrazione di 400 mg/ml presentava un'attività antielmintica significativa, infatti a questa concentrazione, il numero medio di nematodi mobili era pari a  $10 \pm 0,00$  a 0 ore, 4 ore dopo l'esposizione era sceso a  $6,7 \pm 0,67$  e 24 ore dopo l'esposizione era sceso a  $0,33 \pm 0,33$ .

In seguito, è stata valutata microscopicamente la parete corporea dei nematodi adulti dopo l'esposizione alle varie concentrazioni di estratto. I nematodi incubati in presenza di 100 mg/ml di estratto per 24 ore avevano subito una distorsione della cuticola e mostravano grandi vacuoli nella muscolatura cuticolare; ad una concentrazione di 200 mg/ml di estratto il danno è diventato maggiore. Gli effetti più evidenti sono stati ottenuti con una concentrazione di 400 mg/ml, concentrazione per cui la cuticola aveva perso il suo aspetto normale mostrando una superficie rugosa e i fasci muscolari si presentavano disgregati.

Nello stesso studio l'efficacia larvicida dell'estratto è stata valutata sulle larve di *H. contortus* tramite un test *in vitro* (*Larval Mortality Assay* - LMA) con ottimi risultati, registrando una mortalità di  $23,3 \pm 0,88$  e  $25,0 \pm 0,00$  a 200 e 400 mg/ml, rispet-

tivamente, dopo 24 ore di esposizione. L'effetto larvicida più potente è stato registrato a 400 mg/ml con un tasso di mortalità del 100% 24 ore dopo l'esposizione.

In un recente studio di Castagna et al. (2020) [34] è stato testato un macerato acquoso ottenuto dai frutti e dalle bucce, ottenendo una significativa attività ovicida valutata con un test *in vitro* (*Egg Hatch Test* - EHT) contro i NGI delle pecore. In questo caso, tutte le concentrazioni testate *in vitro* sono risultate efficaci nel ridurre la schiusa delle uova di NGI [34].

Appare evidente quindi che gli studi condotti su *P. granatum* hanno fornito, *in vitro*, risultati di efficacia particolarmente convincenti, tanto che si potrebbe prendere in considerazione la sua introduzione nei programmi di controllo antielmintici. Per quel che riguarda l'uso *in vivo*, la melagrana e in particolare il suo macerato, rientra tra i rimedi tradizionali adottati in alcuni paesi, tra cui Italia e Turchia, per trattare le parassitosi degli animali da reddito. Recentemente è stato utilizzato un estratto acquoso di melagrana nel trattamento di ovini infestati da NGI [35]. In questo caso il frutto è stato utilizzato per intero, e questo rappresenta di per sé una sorta di "effetto diluizione", almeno per quanto riguarda i polifenoli, poiché quelli di interesse parassitologico sono contenuti per lo più nelle



Figura 3 - Raccolta e sottoprodotti della melagrana.

bucce; in secondo luogo, l'estrazione per macerazione in acqua permette di estrarre i composti idrosolubili, bisogna quindi considerare la possibilità che i liposolubili siano rimasti nella biomassa. Ciò non di meno la macerazione acquosa consente di estrarre altre molecole, al di là dei polifenoli, che potrebbero avere efficacia antielmintica. Gli ovini del gruppo trattato con macerato acquoso di melagrana hanno infatti dimostrato una riduzione di eliminazione delle uova di NGI (*Faecal Egg Count Reduction* - FECR) del 55% circa a 7 giorni dal trattamento, il che suggerisce che la melagrana potrebbe essere un punto di partenza interessante per ottenere un estratto più concentrato e di più facile utilizzo. Al 2021 risale invece una pubblicazione relativa all'uso di estratto etanolic di melagrana [36] che ha dato risultati eccellenti, arrivando a ridurre la *Faecal Egg Count* (FEC) fino al 97% (al 21esimo giorno, due trattamenti con dosaggio 200 mg/kg PV a distanza di 15 giorni). Il dato è reso ancora più interessante dall'alto numero di animali utilizzati per la prova, ovvero 120 ruminanti divisi tra bovini, bufale, ovini e caprini. Allo stesso modo, Hassan et al. dimostrarono nel 2020 che un estratto etanolic di bucce di melagrana somministrato in ragione di 6 gr/kg PV era stato in grado di ottenere una FECR del 90,55% [33].

### Sottoprodotti degli agrumi

Con il termine "agrumi" si intendono le piante coltivate del genere *Citrus*, presenti nelle aree temperate di tutto il mondo, ed in maniera generica i frutti provenienti da queste piante. Le maggiori aree di coltivazione sono Cina e Brasile, mentre in Europa le aree particolarmente vocate alla produzione di agrumi sono Italia, Spagna e Grecia [37]. I sottoprodotti derivanti dall'industria di lavorazione degli agrumi sono le bucce (flavedo e albedo), i semi e la polpa che generalmente si trovano come residuo di lavorazione "misto" ed inseparabile definito "pastazzo di agrumi". Quest'ultimo è un sottoprodotto che riscuote un certo interesse "tal quale" sia perchè può rappresentare un valido sostituto (fino al 10% della SS della razione) dei cereali nella razione delle pecore in lattazione [38] sia per la grande quantità di pectina presente nel frutto (fino al 25% della SS del pastazzo) [39]. Quest'ultima in effetti potrebbe influire sull'assorbimento dei tannini a livello intestinale, diminuendo dunque la quantità di tannini disponibili per il contatto con i parassiti e riducendo di fatto l'azione antiparassitaria del sottoprodotto stesso [40]. Gli agrumi, tuttavia, dispongono di un'altra classe di molecole, i terpeni, che potrebbero avere una grande efficacia antielmintica [41]. Il pastazzo in particolare potrebbe rappresentare una fonte di composti volatili, tra cui per l'apunto i terpeni, molto utili nella lotta ai NGI e all'AR [42].



Figura 4 - Larve di terzo stadio (L3) di nematodi gastrointestinali.

Gli oli essenziali di numerose specie di agrumi sono stati oggetto di ricerca negli anni.

In uno studio *in vitro* di Ferreira et al. (2018) [42] è stata valutata l'attività antielmintica nei confronti dei principali stadi di sviluppo di *H. contortus* di oli essenziali di diverse specie vegetali: *Citrus aurantifolia* (limetta messicana), *Anthemis nobile* (camomilla romana) e *Lavandula officinalis* (lavanda officinale). In questa ricerca alcuni agnelli sono stati infestati artificialmente con un ceppo multiresistente di *H. contortus* e utilizzati come donatori di feci per tutti i protocolli sperimentali. Diverse concentrazioni di ciascun olio essenziale sono state testate per valutarne la capacità di inibire la schiusa delle uova (EHT), lo sviluppo larvale (*Larval Development Test* - LDT) e la motilità dei nematodi adulti (AWMT).

I valori di Concentrazione Inibente 50 (IC50) ottenuti per gli oli di *C. aurantifolia*, *A. nobile* e *L. officinalis* erano rispettivamente pari a 0,694, 0,842 e 0,316 mg/ml nell'EHT e pari a 0,044, 0,117 e 0,280 mg/ml nell'LDT. Inoltre, i tre oli sono stati in grado di inibire completamente la motilità dei nematodi adulti entro le prime 8-12 ore di osservazione nell'AWMT.

L'olio essenziale di *L. officinalis* si è dimostrato più efficace nell'EHT rispetto agli oli di *C. aurantifolia* e soprattutto di *A. nobile*. In effetti, il valore IC50 dell'olio di *L. officinalis* era circa 2,0–2,5 volte inferiore rispetto a quello degli altri due oli testati.

Nel LDT, l'olio di *C. aurantifolia* ha mostrato le migliori prestazioni, con un valore IC50 compreso tra 2,5 e 6,5 volte inferiore a quello ottenute per gli oli essenziali di *A. nobile* e *L. officinalis*, rispettivamente, risultando quindi il più efficace contro lo sviluppo larvale.

Nello studio Ferreira et al. (2018) [42] è stata eseguita un'analisi della composizione di ciascun olio essenziale mediante gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) dimostrando la presenza di limonene (56,37%), isobutil angelato (29,26%) e linalolo acetato (35,97%) come principali costituenti di *C. aurantifolia*, *A. nobile* e *L. officinalis*, rispettivamente.

La diversa efficacia degli oli essenziali potrebbe essere spiegata da fattori qualitativi e differenze quantitative nella composizione degli oli essenziali testati. Dato che questi prodotti sono in realtà composti da diverse molecole (ovverosia diversi terpeni e non solo) non bisogna tralasciare che risulta difficile attribuire ad una singola molecola l'effetto dell'intero composto, è infatti plausibile che l'effetto sinergico generato dalla co-presenza di più molecole sia diverso.

In particolare, il limonene si trova negli oli di diverse piante ad attività antielmintica, come *Mentha Piperita* e *Eucalyptus Staigeriana* [43,44].

Gaínza et al. (2015) [45] hanno testato gli oli essenziali di *Citrus sinensis* e *Melaleuca quinquenervia* su un isolato di *H. contortus* attraverso l'EHT e il LDT a concentrazioni comprese tra 0,02 mg/mL e 50 mg/mL e tra 0,04 mg/mL a 3,12 mg/mL, rispettivamente.

Nell'EHT, l'IC50 e l'IC90 degli oli essenziali erano rispettivamente 0,27 e 0,99 mg/ml per *C. sinensis* e 1,52 e 5,63 mg/ml per *M. quinquenervia*. Nell'LDT, IC50 e IC90 erano 0,97 e 2,32 mg/ml per *C. sinensis* e 0,44 e 0,94 mg/ml per *M. quinquenervia*.

L'olio essenziale di *C. sinensis* si è rivelato cinque volte più efficace sulle uova rispetto a *M. quinquenervia*. Inoltre, è risultato due volte più efficace sulle larve rispetto a *M. quinquenervia*. Mediante cromatografia (GC-MS) è stata valutata la compo-

sizione degli oli testati mostrando che *C. sinensis* presentava il limonene come componente principale (96,0%). Il limonene è il massimo componente terpenico nel flavedo degli agrumi ed è presente fino al 95% nell'olio estratto dalle arance, che sono considerate una delle migliori fonti di questo monoterpene [46]. Proprio sul terpene limonene si incentrano i pochi lavori esistenti relativi all'uso *in vivo* di sottoprodotti o di sostanze derivate degli agrumi. In particolare, il pastazzo di agrumi, utilizzato sia secco che come insilato, si è rilevato una base interessante da cui partire per ottenere molecole con effetto antelmintico [47]. Il pastazzo si presta infatti piuttosto bene all'insilamento, benché in alcuni casi sia troppo ricco in acqua o zuccheri, ed all'essiccamento naturale, contenendo un certo quantitativo di terpeni (1,5% per il pastazzo umido, con il 65,5% di limonene e 0,02%, di cui l'85,9% di limonene, per il pastazzo disidratato), il che si traduce nel trattamento *in vivo* in un aumento dell'ematocrito (indice di riduzione di anemia indotta dai NGI) ed in una lieve diminuzione del tasso di schiusa dopo 42 giorni di utilizzo (nel gruppo infestato con *H. contortus* e alimentato con il pastazzo disidratato). Di grandissima rilevanza è uno studio più recente [48] riguardo al terpene limonene purificato. La purificazione del singolo terpene consente innanzitutto di poter associare direttamente un effetto ad una molecola (cosa impossibile finché si parla di oli essenziali), inoltre dai risultati di questo studio il limonene potrebbe di fatto rappresentare una risorsa importantissima nell'ambito della lotta all'AR. Difatti, in un gruppo di agnelli infestati sperimentalmente con *H. contortus* multiresistente (resistenza a moxidectina, closantel, trichlorfon, levamisolo fosfato, albendazolo, e ivermectina) il trattamento combinato di ivermectina (IVM) e limonene (LM - 200 mg/kg PV) ha determinato un'efficacia antelmintica *in vivo* (FECD) del 96,29% nel 7° giorno post trattamento, mentre il trattamento di sola IVM non aveva dato alcun risultato (0%). Il solo LM ha riscosso comunque un buon successo con 76,13% (FECD). Questi risultati sono di importanza fondamentale poiché testimoniano la possibilità di utilizzare antelmintici su NGI resistenti, se in combinazione con i LM.

### Sottoprodotti dell'uva

La viticoltura è una pratica diffusa ormai in tutto il mondo sia per produrre uva da vino o da tavola. Da tempo è ormai la Cina il primo produttore mondiale di uva, surclassando per quantità Italia, Stati Uniti, Francia, Spagna e Turchia, che sono gli altri principali produttori [49]. Il sottoprodotto principale derivato dall'uva sono le vinacce. Nello specifico nelle vinacce si trova tutto ciò che non diventa vino, ovvero sia il residuo solido della lavorazione dell'uva, formato da bucce, vinaccioli e, a volte, anche dai grappoli. Per "vinaccioli" si intendono i semi che si trovano nella polpa degli acini dell'uva; per "grappoli" la parte legnosa e le relative ramificazioni del grappolo, mentre per "buccia", ovviamente, la parte esterna dell'acino. Le vinacce si formano già nella prima fase del processo di vinificazione, appena dopo la pigiatura con l'estrazione di gran parte del succo (mosto) dall'acino d'uva. Non tutte le vinacce sono uguali, quelle provenienti dalla produzione dei vini rossi attraversano tutto il processo di fermentazione e vengono dette, appunto, fermentate. Queste ultime sono quelle di maggior interesse parassitologico.

In uno studio recente [50] è stato valutato il contenuto tanninico e polifenolico di un estratto ottenuto da vinacce, utile base di partenza per stimarne il potenziale antelmintico. Il contenu-

to polifenolico totale nell'estratto era di 3,95 mg/g (acido tannico equivalente) che corrispondeva al 4,2% del contenuto polifenolico totale nella sostanza secca. Il contenuto totale di tannini era di 1,92 mg/g (equivalente di acido tannico), corrispondente al 2,03% di contenuto totale di tannini sulla sostanza secca.

La vinaccia ottenuta come sottoprodotto della lavorazione industriale dell'uva conserva dunque nutrienti e sostanze con potenziale antelmintico come tannini e flavonoidi.

L'attività antelmintica *in vitro* di questi sottoprodotti è stata esaminata da Soares et al. (2018) [50] che hanno valutato l'attività ovicida e larvicida di un estratto idroalcolico della vinaccia, contro i NGI da pecore naturalmente infestate. Nei test *in vitro* l'estratto di vinaccia ha mostrato un'elevata attività ovicida e larvicida, con valori Dose Letale 50 (DL50) di 0,30 mg/ml per l'EHT, 1,01 mg/ml per il LDT e un'efficacia del 100% *nel Larval Migration Inhibition Assay* (LMIA) a tutte le concentrazioni valutate. Nel LDT l'estratto ha inibito lo sviluppo da larve al primo stadio (L1) a terzo stadio (L3) (Fig. 4) anche alla più bassa concentrazione valutata (LD50 = 0,30 mg/ml) con un aumento dell'efficacia dose-dipendente. Nel LMIA dopo un'esposizione di 3 ore delle L3 all'estratto, è stata osservata un'inibizione del 100% della migrazione delle larve a tutte le concentrazioni valutate [50].

Stupisce dunque che, benché le vinacce abbiano dato effetti positivi nei test *in vitro* e contengano quantitativi significativi di polifenoli, i risultati dei test *in vivo* si sono sempre dimostrati insoddisfacenti, non evidenziando alcuna differenza tra il gruppo trattato ed il controllo, sia in pecore che in capre, anche con differenti dosaggi [51,52]. La differenza importante tra studi *in vitro* ed *in vivo* potrebbe derivare da diversi fattori, tra cui: varietà botaniche (*cultivar* ed habitat diversi influiscono molto sul contenuto in polifenoli e terpeni delle piante – dimostrazione di questa ipotesi sarebbe il risultato ottenuto da Cash et al. nel 2016 [51]); metabolizzazione eccessiva dei polifenoli nel ruminante; assorbimento rapido e massiccio di polifenoli nel tratto gastrointestinale. Considerando le elevate quantità di vinacce prodotte a livello globale e gli interessanti risultati ottenuti *in vitro* sarebbe interessante procedere con ricerche relative alla corretta gestione e somministrazione della biomassa *in vivo*.

### Sottoprodotti del caffè

La pianta di caffè (*Coffea spp.*), nonostante la grandissima diffusione della bevanda (nelle sue varie accezioni) che ne deriva, riconosce un areale di coltivazione relativamente ristretto: il 70% della produzione ha origine in America del Sud e Centrale, il 20% viene prodotto in Asia e soltanto il 10% in Africa, in territori che per altro non affacciano sul Mediterraneo [53]. Il sottoprodotto principale che deriva dal caffè, tuttavia, abbonda proprio nei paesi mediterranei, si tratta infatti dei fondi di caffè (Spent coffee grounds - SCG), che rappresentano un sottoprodotto relativamente particolare poiché sono in realtà una biomassa residua da un processo di estrazione. La produzione di caffè tramite l'irrorazione con acqua calda dei chicchi tostati e tritati fa sì che buona parte delle molecole bioattive contenute nel caffè stesso si dilavino e passino dai chicchi alla bevanda, la biomassa che residua ha un contenuto polifenolico medio di 20-30 mg/gr (in equivalenti acido gallico) [54]. Allo stesso tempo, per quanto sia vero che molti composti bioattivi non si trovano nei SCG è pur vero che questa biomassa presenta dei vantaggi: gli alcaloidi (tra cui la caffeina), potenzial-

mente pericolosi per la salute degli animali, sono presenti solamente in tracce; i SCG vengono prodotti abbondantemente in Europa; potrebbero rappresentare una fonte a basso costo e di facile reperimento di sostanze antielmintiche anche per gli allevatori residenti in aree isolate o decentrate.

Un recente studio [55] ha valutato l'attività antielmintica *in vitro* contro *H. contortus* di dieci estratti idroalcolici ottenuti da scarti di polpa di caffè (*Coffea canephora* - CO), scarti di pannocchia di mais (*Zea mays* - ZM), fieno di pangola (*Digitaria eriantha* - DI) e diverse miscele di tali materiali.

I test parassitologici *in vitro* utilizzati sono stati l'EHT, il test di mortalità larvale (LMT) e il *Larval Exsheathment Inhibition Assay* (LEIA).

Nell'EHT gli estratti che hanno mostrato la migliore attività contro la schiusa delle uova di *H. contortus* sono stati il T4, che era composto da CO e DI (50% di ciascun ingrediente), e l'estratto T8 che era stato preparato con 16% CO, 16% DI e 66% ZM. Pertanto, i due estratti con la migliore attività avevano due elementi in comune: CO e DI. Invece l'estratto T1 (100% CO) non si è dimostrato efficace quanto le combinazioni T4 e T8. Sembra quindi che la combinazione di questi sottoprodotti mostri attività sinergica contro le uova di *H. contortus*.

Nel LEIA l'attività di T7, T8 e T10 è risultata notevole, tutti i composti contengono anche caffè.

In conclusione, secondo questo studio la maggior parte degli estratti con comprovata efficacia conteneva caffè che dunque si presenta come un sottoprodotto con un buon potenziale antielmintico.

Lo studio di Ocampo et al. (2016) [56] ha valutato l'effetto antielmintico *in vitro* e *in vivo* del sottoprodotto percolato di due varietà di *Coffea arabica* ((Clean and Smooth (CS) e Shade Grown (SG)) nei confronti di un isolato di *H. contortus* con bassa sensibilità ai tannini.

L'effetto antielmintico è stato prima determinato *in vitro* e poi *in vivo* in ovini in accrescimento infestati da *H. contortus* nutriti con una dieta contenente un estratto acetico ottenuto dal sottoprodotto percolato di *C. arabica*. Secondo i risultati degli studi *in vitro* l'estratto del sottoprodotto della varietà CS di *Coffea* ha mostrato un'inibizione della diffusione delle larve a tutte le concentrazioni valutate (inibizione dal 61,5% al 100%), invece l'estratto di *Coffea* varietà SG ha mostrato una certa inibizione solo alla concentrazione più alta.

I risultati dello studio *in vitro* suggeriscono che la varietà CS sia più efficace contro *H. contortus* rispetto alla varietà SG. Questa variabilità nell'efficacia antielmintica *in vitro* degli estratti acetici di *C. arabica* era stata segnalata in altri studi condotti con estratti di diverse marche commerciali di caffè e rappresenta un "gradino" molto importante nella comprensione dell'utilizzo dei sottoprodotti. Infatti, due biomasse della stessa pianta (*C. arabica*) ma di cultivar differenti possono dare risultati diversi tra loro.

Uno studio di Rodríguez et al. (2023) [57] ha determinato l'attività antielmintica di un estratto idroalcolico di polpa di caffè contro i NGI benzimidazolo-resistenti mediante test *in vitro*. Le uova di NGI isolate da feci di capra sono state identificate e quantificate. Inoltre, i generi *Haemonchus* e *Trichostrongylus* sono stati identificati ed è stata determinata la presenza di una mutazione del gene della  $\beta$ -tubulina associata alla resistenza al BZ.

L'EHT e il LMT hanno permesso di valutare la percentuale di inibizione della schiusa delle uova (% EHI) e la percentuale di mortalità larvale (% LM) dell'estratto di polpa di caffè con con-

centrazioni da 0,39 a 200 mg/mL.

L'estratto idroalcolico della polpa di caffè ha inibito il 100% della schiusa delle uova a 200 e 100 mg/ml ma senza alcun effetto larvicida alle concentrazioni valutate. Per quanto riguarda la mortalità larvale, i valori più alti registrati sono stati del 2,07%, mostrando quindi di non avere alcun effetto larvicida.

Dunque, l'estratto idroalcolico della polpa di caffè ha mostrato una migliore attività in termini di inibizione della schiusa delle uova rispetto alla mortalità larvale; questa differenza può essere spiegata dal fatto che le larve L3 sono formate da strutture più complesse, dotate di diversi meccanismi che consentono loro di sopravvivere in ambienti più ostili rispetto allo stadio di uovo.

Anche nel caso del caffè gli studi sull'efficacia antielmintica *in vivo* sono piuttosto limitati. In particolare, in uno studio francese [58], l'utilizzo *in vivo* degli SCG non ha dato risultati incoraggianti: 18 capre sono state alimentate per tre settimane con un'integrazione di SCG senza che ci fosse grande variabilità in uova per grammo di feci (UPG) tra gruppo trattato e controllo. Ciononostante bisogna sottolineare sia che la durata della prova, nonostante sia la stessa indicata dalle linee guida della World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (21 giorni), potrebbe essere troppo breve per valutare la reale efficacia di una sostanza naturale (le linee guida WAAVP si riferiscono sostanzialmente a farmaci di sintesi), sia che il caffè non ha causato limitazioni nella quantità di cibo ingerito dagli animali (*voluntary feed intake*) il che potrebbe suggerire di utilizzare questa risorsa non come "terapia" secondo una definizione tradizionale del termine, ma come integratore di "mantenimento" che contribuisca a mantenere la carica parassitaria entro un certo limite.

In Tabella 1 è riportato l'elenco delle ricerche relative ai test *in vitro* mentre in Tabella 2 sono riportate quelle relative ai test *in vivo*.

## PROSPETTIVE FUTURE

A testimonianza dell'importanza dell'utilizzo di sottoprodotti come antielmintici naturali esistono alcuni progetti di rilevanza internazionale il cui scopo è approfondire le conoscenze sulla materia e stimolare un approccio di "up-cycling" degli scarti. Tra questi va annoverato, oltre al progetto LifeMi-CliFEED, il cui focus principale è valutare l'efficacia dei sottoprodotti delle industrie agro-alimentari per ridurre le emissioni di gas serra e migliorare la qualità della vita dei piccoli ruminanti, il progetto PRIN PNRR UseFul3 (Upcycling of agro-industrial by-products to improve Food chain sustainability, reduce pollution, and increase animal health and productivity), in cui invece si terrà conto sia dell'effetto antielmintico che di quello nutrizionale degli estratti dei sottoprodotti di nocciola e melagrana, sia dell'intera "vita utile" dei sottoprodotti dell'estrazione (un sottoprodotto del sottoprodotto) con l'utilizzo degli stessi come fertilizzanti o ammendanti.

Allo stesso tempo i risultati di questi e di altri progetti necessitano di essere condivisi e diffusi il più possibile, in modo tale da trasferire le conoscenze scientifiche sul campo e aiutare concretamente le filiere zootecniche. Proprio per questo motivo da febbraio 2024 il progetto Horizon Europe SPARC (Sustainable Parasite Control, <https://wormsparc.com/>) ha lo scopo di promuovere il controllo sostenibile dei parassiti nei ruminanti al pascolo, mediante una rete di "addetti ai lavori" (alle-

**Tabella 1** - Test *in vitro* relativi all'utilizzo di sottoprodotti agroindustriali su nematodi gastrointestinali nel bacino del Mediterraneo.

Specie vegetale	Tipo di composto testato	Test <i>in vitro</i>	Efficacia antielmintica	Riferimento bibliografico
<i>Punica granatum</i>	Estratto etanologico	AWMT	87% inibizione della motilità larvale	Hassan et al., 2020
<i>Punica granatum</i>	Estratto acquoso	EHT	>82% uova non schiuse	Castagna et al., 2020
<i>Citrus aurantifolia</i>	Olio essenziale	EHT AWMT	Fino al 100% di uova non schiuse Fino al 100% di inibizione della motilità larvale	Ferreira et al., 2018
<i>Citrus sinensis</i>	Olio essenziale	EHT LDT	Fino al 100% di uova non schiuse Fino al 100% di inibizione dello sviluppo larvale	Gainza et al., 2015
<i>Vitis vinifera</i> (Vinaccia)	Estratto idroalcolico	EHT LDT	Fino al 100% di uova non schiuse Fino al 100% di inibizione dello sviluppo larvale	Soares et al., 2018
<i>Coffea spp.</i> (Polpa - in combinazione con altre biomasse)	Estratto idroalcolico	EHT LDT	Fino al 50% di uova non schiuse Fino al 50% di inibizione dello sviluppo larvale	Ramirez et al., 2022
<i>Coffea spp.</i> (Fondo di caffè)	Estratto acetonic	LEIA	Fino al 100% di inibizione	Ocampo et al., 2016
<i>Coffea spp.</i> (Polpa)	Estratto idroalcolico	EHT LMT	Fino al 100% di uova non schiuse Mortalità larvale 2,07%	Lopez-Rodriguez et al., 2023

AWMT: Adult Worm Motility Test; EHT: Egg Hatch Test; LDT: Larval Development Test; LEIA: Larval Exsheathment Inhibition Assay; LMT: Larval Mortality Test;

**Tabella 2** - Test *in vivo* relativi a somministrazione di sottoprodotti agroalimentari in animali parassitati da nematodi gastrointestinali nel bacino del Mediterraneo.

Specie vegetale	Tipo di composto testato	Test <i>in vivo</i>	Efficacia antielmintica	Riferimento bibliografico
<i>Corylus avellana</i>	Buccette tal quali	Conta delle larve (post mortem)	Nessuna differenza apprezzabile con il gruppo controllo	Girard et al., 2013
<i>Punica granatum</i>	Estratto metanolico	FECRT	Riduzione FEC fino al 97%	Kaiaty et al., 2021
<i>Punica granatum</i>	Estratto acquoso	FECRT	Riduzione FEC 50%	Castagna et al., 2021
<i>Punica granatum</i>	Estratto aquoso	FECRT	Riduzione FEC 55.7%	Castagna et al., 2024
<i>Citrus sinensis</i>	Olio essenziale (95.22% limonene)	FECRT	Riduzione FEC 76.13%	Katiki et al., 2023
<i>Vitis vinifera</i> (Pinot)	Estratto acquoso	FECRT	Riduzione FEC 12.1%	Cash et al., 2016
<i>Vitis vinifera</i> (Chambourcin)	Estratto acquoso	FECRT	Riduzione FEC 0%	Cash et al., 2016
<i>Vitis vinifera</i>	Estratto aquoso	FECRT	Riduzione FEC 0%	Le Shure Shirron Nicole, 2014
<i>Coffea spp.</i> (Fondo di caffè)	Acetone e acqua	FECRT	Riduzione FEC 0% (isolato di <i>Heamoncus</i> tannino-resistente: ceppo "Paraiso")	Ocampo et al., 2016
<i>Coffea spp.</i>	Fondo di caffè tal quale	FECRT	Riduzione FEC 0%	Le Casble C., 2012

FECRT: Faecal Egg Count Reduction; FEC: Faecal Egg Count

vatori, consulenti aziendali, medici veterinari, ricercatori, etc.). Questo sarà possibile diffondendo gli strumenti, le soluzioni e le buone pratiche di controllo parassitologico in modo

da migliorare la salute e il benessere degli animali, le performance economiche e la sostenibilità ambientale del settore [4]. L'interesse nei sottoprodotti agroalimentari, evidentemente, è

grande. Tuttavia, oltre a fugare i dubbi e rispondere alle domande precedentemente esposte, in futuro bisognerebbe puntare ad aumentare la disponibilità dei tannini nel lume intestinale in modo tale che questi ultimi possano interagire direttamente contro i parassiti target (alcune proteine potrebbero avere un ruolo importante da questo punto di vista poiché legandosi ai tannini ne diminuiscono l'assorbimento intestinale e ne aumentano quindi la quota disponibile nel lume) [59]. Sarebbe auspicabile anche incrementare la quantità di molecole bioattive che arrivino a contatto con i parassiti "evitando" le alterazioni ruminanti [60] che potrebbero degradare i PSC sino al punto di renderli inefficaci nei compartimenti successivi del tratto gastro-intestinale. Inoltre, l'utilizzo di molecole pure (come il terpeno limonene) potrebbe essere la chiave di volta per standardizzare i sottoprodotti (titolandoli, dunque, per una molecola specifica o per una classe – nel caso dei fenoli si utilizza il GAE, equivalenti in acido gallico) e per utilizzarli in modo specifico, sicuro e soprattutto ripetibile.

## CONCLUSIONI

I sottoprodotti agroindustriali potrebbero rappresentare una valida alternativa agli antelmintici di sintesi o, più verosimilmente, un alleato in terapie combinate tra prodotti naturali e di sintesi, con differenze sensibili tra diverse specie botaniche e sottoprodotti [61]. Non è da trascurare per altro l'effetto positivo che alcuni di questi prodotti possono avere sulle produzioni di origine animale oltreché sui NGI [62]. Tuttavia, esistono ancora molte barriere che ne precludono l'utilizzo pratico su vasta scala, tra cui la mancanza di omogeneità in PSC dei sottoprodotti, le differenti origini delle biomasse e le diverse tecniche di lavorazione e conservazione che rendono tali prodotti, per definizione, molto legati al territorio di origine. Per quanto riguarda invece gli estratti ottenibili dai sottoprodotti, oltre al problema della disomogeneità in PSC delle diverse parti di uno stesso sottoprodotto, bisogna considerare che tecniche di estrazione diversa (acqua, alcool, acetone, ecc.) produrranno estratti molto diversi con diversi valori di PSC a causa della differente idro/lipo-solubilità dei PSC stessi. Inoltre, i prodotti vegetali inclusi i sottoprodotti ed i PSC, vengono metabolizzati a livello del ruminante e della microflora intestinale, il che vuol dire che, finché non si riuscirà a superare la barriera della degradazione microbica, non si potrà essere certi di quante molecole bioattive effettivamente entrino a contatto con i parassiti.

In ultimo non bisogna dimenticare che alcuni polifenoli, tannini *in primis*, sono fattori antinutrizionali, ciò vuol dire che una presenza elevata di queste sostanze potrebbe portare a diminuzione delle *performance* degli animali [63]. Questi effetti indesiderati possono essere parzialmente "risolti" da alcuni animali adattati a diete particolarmente ricche in tannini, che producono saliva con proteine ricche in prolina, che formano legami con i tannini prima ancora che raggiungano l'intestino, permettendo alle proteine ingerite di essere assimilate più facilmente [64].

Risulta infine evidente che esiste una carenza in letteratura sia per quanto riguarda le ricerche disponibili sia per quanto riguarda l'applicabilità dei risultati: sono pochi gli studi in cui si sono individuate le molecole effettivamente attive nel trattamento contro gli elminti, in un numero ancora minore di pubblicazioni si è riusciti a titolare dette molecole [14]. Per di più

al momento risultano carenti le pubblicazioni relative ad un eventuale dosaggio utile per le biomasse, gli estratti o le molecole utilizzate, rendendo un approccio concreto e "di campo" momentaneamente difficile per questi prodotti, che potrebbero invece rappresentare un futuro alleato degli antelmintici.

## Ringraziamenti

Per la realizzazione della presente review sono state tratte informazioni da due progetti attualmente in svolgimento presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università degli Studi di Napoli Federico II: il progetto europeo Life MiCliFEED (Mitigating Climate impact of small ruminants through innovative FEEDing approaches) ed il progetto PRIN-PNRR UseFul3 (Upcycling of agro-industrial by-products to improve Food chain Sustainability, reduce pollution, and increase animal health and productivity).

## References

1. Report ISMEA 2022 (<https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/12476>).
2. Charlier, J., Bartley, D.J., Sotiraki, S., Martinez-Valladares, M., Claerebout, E., von Samson-Himmelstjerna, G., Thamsborg, S.M., Hoste, H., Morgan, E.R., Rinaldi, L. 2022. Anthelmintic resistance in ruminants: challenges and solutions. *Adv Parasitol.* 2022;115:171-227.
3. Maurizio, A., Perrucci, S., Tamponi, C., Scala, A., Cassini, R., Rinaldi, L., Bosco, A. 2023. Control of gastrointestinal helminths in small ruminants to prevent anthelmintic resistance: the Italian experience. *Parasitology.* 2023 Oct;150(12):1105-1118.
4. Charlier, J., Rinaldi, L., Musella, V., Ploeger, H.W., Chartier, C., Vineer, H.R., Hinney, B., von Samson-Himmelstjerna, G., Bescu, B., Mickiewicz, M., Mateus, T.L., Martinez-Valladares, M., Quealy, S., Azaiz, H., Sekovska, B., Akkari, H., Petkevicius, S., Hektoen, L., Höglund, J., Morgan, E.R., Bartley, D.J., Claerebout, E. 2020. Initial assessment of the burden of parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev. Vet. Med.* 182, 105103.
5. Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 2006 Jun;22(6):253-61.
6. Rinaldi, L., Veneziano, V., Cringoli, G. 2007. Dairy goat production and the importance of gastrointestinal strongyle parasitism. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Aug;101(8):745-6.
7. Rose Vineer, H., Morgan, E.R., Hertzberg, H., Bartley, D.J., Bosco, A., Charlier, J., Chartier, C., Claerebout, E., de Waal, T., Hendrickx, G., Hinney, B., Höglund, J., Jezek, J., Kasny, M., Keane, O.M., Martínez-Valladares, M., Letra Mateus, T., McIntyre, J., Mickiewicz, M., Munoz, A.M.,
8. Bosco, A., Kiefler, J., Amadesi, A., Varady, M., Hinney, B., Ianniello, D., Maurelli, M.P., Cringoli, G., Rinaldi, L. 2020. The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. *Parasit Vectors.* 2020 Sep 9;13(1):457.
9. Rinaldi, L., Cringoli, G. 2014. Exploring the interface between diagnostics and maps of neglected parasitic diseases. *Parasitology.* 2014 Dec;141(14):1803-10.
10. Bosco A, Musella V, Santaniello M, Amato R, Cringoli G, Rinaldi L. Formulazione topica di eprinomectina somministrata per via orale: quali potenzialità nei piccoli ruminanti? *Large Animal Review.* 2024 Nov 3; Vol 30.
11. Vastolo A, Calabrò S, Cutrignelli M I. A review on the use of agro-industrial CO-products in animals' diets. *Italian Journal of Animal Science, Ital. J. Anim. Sci.* 2022; 21(1), 577-594.
12. Birsa, M. L., & Sarbu, L. G. 2023. Health Benefits of Key Constituents in *Cichorium intybus* L. *Nutrients.* 15(6), 1322.
13. Widaad, A., Zulkupli, I. N., & Petalcorin, M. I. R. 2022. Anthelmintic Effect of *Leucaena leucocephala* Extract and Its Active Compound, Mimosine, on Vital Behavioral Activities in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(6), 1875.
14. Hoste, H., Meza-OCampos G., Marchand, S., Sotiraki, S., Sarasti, K., M. Blomstrand, M., R. Williams, A., M. Thamsborg, S., Athanasiadou, S., L. Enemark, H., Torres Acosta, J.F., Mancilla-Montelongo, G., Castro, C.S.,

- M. Costa-Junior, L. Louvandini, H., Sousa, D.M., Salminen, J-P., Karonen, M., Engstrom, M., Charlier, J., Niderkorn, V., R. Morgan, E. 2022. Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants. *Parasite* 9- 11.
15. Aguilar-Zarate, P., Cruz-Hernandez, M.A., Montañez, J.C., Belmares-Cerda, R.E., Aguilar, C.N. 2014 Enhancement of tannase production by *Lactobacillus plantarum* CIR1: validation in gas-lift bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014 Nov;37(11):2305-16.
  16. Scott, M.B., Styring, A.K., McCullagh, J.S.O. 2022. Polyphenols: Bioavailability, Microbiome Interactions and Cellular Effects on Health in Humans and Animals. *Pathogens.* 2022 Jul 5;11(7):770.
  17. Waghorn, G.C., Shelton, I.D., McNabb, W.C., McCutcheon, S.N. 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *The Journal of Agricultural Science.* 1994;123(1):109-119.
  18. Dänicke, S. 2000. Secondary plant products: Antinutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding, John C. Caygill and Irene Mueller-Harvey (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, 1999, 129 pp. ISBN 1-897676-28-X. *Animal Feed Science and Technology.* 85. 283–284.
  19. Neilson, E., Goodger, J., Woodrow, I., Møller, B. 2013. Plant chemical defense: At what cost?. *Trends in plant science.* 18. 10.1016/j.tplants.2013.01.001.
  20. Katiki, L.M., Araujo, R.C., Ziegelmeyer, L., Gomes, A.C.P., Gutmanis, G., Rodrigues, L., Bueno, M.S., Verissimo, C.J., Louvandini, H., Ferreira, J.F.S., Amarante, A.F.T. 2019. Evaluation of encapsulated anethole and carvone in lambs artificially- and naturally-infected with *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol.* 2019 Feb;197:36-42.
  21. Mirza, Z., Soto, E.R., Hu, Y., Nguyen, T.T., Koch, D., Aroian, R.V., Ostroff, G.R. 2020. Anthelmintic Activity of Yeast Particle-Encapsulated Terpenes. *Molecules.* 2020 Jun 27;25(13):2958.
  22. International nut and dried fruit Council Yearbook 2023, <https://inc-nut-fruit.org/publications/>
  23. Güney, M. 2013. Utilization of hazelnut husk as biomass. *Sustainable Energy Technologies and Assessments.* 4. 72–77. (30) Altunkaya, A., Hedegaard, R.V., Harholt, J., Brimer, L., Gökmen, V., Skibsted, L.H. 2013. Palatability and chemical safety of apple juice fortified with pomegranate peel extract. *Food Funct.* (10):1468-73.
  24. Contini, Marina & Baccelloni, Simone & Massantini, Riccardo & Anelli, Gabriele. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry.* 110. 659-669. 10.1016/j.foodchem.2008.02.060.
  25. Ivanovi S, Avramovi N, Doj inovi B, Trifunovi S, Novakovi M, Teševi V, Mandi B. Chemical Composition, Total Phenols and Flavonoids Contents and Antioxidant Activity as Nutritive Potential of Roasted Hazelnut Skins (*Corylus avellana* L.). *Foods.* 2020 Apr 4;9(4):430. doi: 10.3390/foods9040430. PMID: 32260331; PMCID: PMC7230596.
  26. Quijada J, Drake C, Gaudin E, El-Korso R, Hoste H, Mueller-Harvey I. Condensed Tannin Changes along the Digestive Tract in Lambs Fed with Sainfoin Pellets or Hazelnut Skins. *J Agric Food Chem.* 2018 Mar 7;66(9):2136-2142. doi: 10.1021/acs.jafc.7b05538. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29424229.
  27. Girard, Marion & Gaid, S. & Mathieu, C. & Vilarem, Gérard & Gerfault, V. & Routier, M. & Gombault, P. & Pardo, E. & Manolaraki, Foteini & Hoste, Hervé. (2013). Effects of different proportions of sainfoin pellets combined with hazel nut peels on infected lambs. 64th EAAP Nantes.
  28. Mo Y, Ma J, Gao W, Zhang L, Li J, Li J, Zang J. Pomegranate Peel as a Source of Bioactive Compounds: A Mini Review on Their Physiological Functions. *Front Nutr.* 2022 Jun 9;9:887113. doi: 10.3389/fnut.2022.887113. PMID: 35757262; PMCID: PMC9218663.
  29. Kalaycio lu Z, Erim FB. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chem.* 2017 Apr 15;221:496-507. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.084. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27979233.
  30. Altunkaya, A., Hedegaard, R.V., Harholt, J., Brimer, L., Gökmen, V., Skibsted, L.H., 2013. Palatability and chemical safety of apple juice fortified with pomegranate peel extract. *Food Funct.* (10):1468-73. doi: 10.1039/c3fo60150a. PMID: 23989519.
  31. Dalimov, D., Dalimova, G., Bhatt, M. 2003. Chemical Composition and Lignins of Tomato and Pomegranate Seeds. *Chemistry of Natural Compounds.* 39. 37-40.
  32. Arun, N., Singh, D. P. 2012. *Punica granatum*: A review on pharmacological and therapeutic properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 3. 1240-1245.
  33. Hassan, N.M.F., Sedky, D., El-Aziz, T.H. Abd, Shalaby, H.A., Abou-Zeina, H.A.A., 2020. English, Journal article, Nigeria, doi:10.37422/IJVS/20.002, 2305-4360 2304-3075, 9, (2), Anambra, International Journal of Veterinary Science, (210–216), Faculty of Agriculture, Nnamdi Azikiwe University, Anthelmintic potency and curative effect of pomegranate peels ethanolic extract against *Haemonchus contortus* infection in goats.
  34. Castagna, F., Britti, D., Oliverio, M., Bosco, A., Bonacci, S., Iriti, G., Ragusa, M., Musolino, V., Rinaldi, L., Palma, E., Musella, V. 2020. In Vitro Anthelmintic Efficacy of Aqueous Pomegranate (*Punica granatum* L.) Extracts against Gastrointestinal Nematodes of Sheep. *Pathogens.* 2020 Dec 18;9(12):1063.
  35. Castagna, F., Bava, R., Musolino, V., Piras, C., Cardamone, A., Carresi, C., Lupia, C., Bosco, A., Rinaldi, L., Cringoli, G., Palma, E., Musella, V. Britti, D. 2022. Potential New Therapeutic Approaches Based on *Punica granatum* Fruits Compared to Synthetic Anthelmintics for the Sustainable Control of Gastrointestinal Nematodes in Sheep. *Animals* 2022, 12, 2883
  36. Kaiaty, A.M., Salib, F.A., El-Gameel, S.M., Hussien, A.M., Kamel, M. 2021. Anthelmintic activity of pomegranate peel extract (*Punica granatum*) and synthetic anthelmintics against gastrointestinal nematodes in cattle, sheep, goats, and buffalos: in vivo study. *Parasitol Res.* 2021 Nov;120(11):3883-3893.
  37. Ismea mercati, 2023, Tendenze e dinamiche recenti agrumi, <https://www.ismeamercati.it/analisi-e-studio-filiere-agroalimentar>
  38. Fegeros, K., Zervas, G., Stamouli, S., Apostolaki, E. 1995. Nutritive value of dried citrus pulp and its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. *J Dairy Sci.* 1995 May;78(5):1116-21.
  39. Arthington, J.D., Kunkle, W.E., Martin, A.M. 2002. Citrus pulp for cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2002 Jul;18(2):317-26, vii.
  40. Paturi, G., Butts, C.A., Joyce, N.I., Rippon, P.E., Morrison, S.C., Hedderley, D.I., Lister, C.E. 2021. Pectin Influences the Absorption and Metabolism of Polyphenols from Blackcurrant and Green Tea in Rats. *Foods.* 2021 Apr 9;10(4):813.
  41. Bampidis, V.M., Robinson, P. 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology - ANIM FEED SCI TECH.*
  42. Ferreira, L., Benincasa, B., Fachin, Taleb Contini, S., França, S., Chagas, A., Belebani, R. 2018. Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and *Lavandula officinalis*: in vitro anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors.* 11. 10.1186/s13071-018-2849-x.
  43. Katiki, L.M., Chagas, A.C., Bizzo, H.R., Ferreira, J.F., Amarante, A.F. 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. *Vet Parasitol.* 2011 Dec 29;183(1-2):103-8
  44. Ribeiro, W.L., Macedo, I.T., dos Santos, J.M., de Oliveira, E.F., Camurça-Vasconcelos, A.L., de Paula, H.C., Bevilacqua, C.M. 2013. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol.* 2013 Sep;135(1):24-9.
  45. Alemán Gainza, Y., Domingues, L., Pino Pérez, O., Dias Rabelo, M., López, E., Chagas, A. 2015. Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Industrial Crops and Products.* 76. 647-652.
  46. Lota, M.L., de Rocca Serra, D., Tomi, F., Jacquemond, C., Casanova, J. 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *J Agric Food Chem.* 2002 Feb 13;50(4):796-805.
  47. Nordi, E.C., Costa, R.L., David, C.M., Parren, G.A., Freitas, A.C., Lameirinha, L.P., Katiki, L.M., Bueno, M.S., Quirino, C.R., Gama, P.E., Bizzo, H.R., Chagas, A.C. 2014. Supplementation of moist and dehydrated citrus pulp in the diets of sheep artificially and naturally infected with gastrointestinal nematodes on the parasitological parameters and performance. *Vet Parasitol.* 2014 Oct 15;205(3-4):532-9.
  48. Katiki, L.M., Gigliotti, R., Ferreira, J.F.S., Pacheco, P.A., Barbosa, H.Z., Rodrigues, L., Verissimo, C.J., Braga, P.A.C., Amarante, A.F.T., Louvandini, H. 2023. Combined effects of Limonene and Ivermectin on P-glycoprotein-9 gene expression of lambs Infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2023 Dec;324:110069.
  49. Gabellieri, N., Tinterri, D. 2023. The mathematician and the beans. *Food productions, map production and the struggle for water in the 18th Century Val Bisagno (Genova, Italy).* *Giano Bifronte* 4: 203-236.
  50. Soares, S.C., de Lima, G.C., Carlos Laurentiz, A., Féboli, A., Dos Anjos, L.A., de Paula Carlis, M.S., da Silva Filardi, R., da Silva de Laurentiz, R. 2018. *In vitro* anthelmintic activity of grape pomace extract against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Int J Vet Sci Med.* 2018 Nov 18;6(2):243-247.
  51. Cash, K., City, J., Mo. 2016. The Use of Grape Extract as a Natural Anthelmintic in Small Ruminants. 10.13140/RG.2.2.28794.21445.
  52. LeShure Shirron, N. Use of Naturally Occurring Anthelmintics to Con-

- trol Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants, Final Report for GNC12-161 project, Sustainable Agricultural Research and Education Projects (SARE - [https://etd.ohiolink.edu/acprod/odb\\_etd/ws/send\\_file/send?accession=osu1397649276&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/acprod/odb_etd/ws/send_file/send?accession=osu1397649276&disposition=inline))
53. International Coffee Organization, Coffee Market Report 2024, <https://icocoffee.org/>
  54. McNutt, J., He, Q. 2018. Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 71. 10.1016/j.jiec.2018.11.054.
  55. Castañeda-Ramírez, G.S., Lara-Vergara, I., Torres-Acosta, F., Sandoval-Castro, C., Sánchez, J., Ventura-Cordero, J., Garcia-Rubio, V., Aguilar-Marcelino, L. 2022. In vitro anthelmintic activity of extracts from coffee pulp waste, maize comb waste and *Digitaria eriantha* S. hay alone or mixed, against *Haemonchus contortus*. *Waste and Biomass Valorization*. 13. 10.1007/s12649-022-01732-x.
  56. Ortiz-Ocampo, G.I., Chan-Pérez, J.I. Ana, C.-C., Santos-Ricalde, R., Sandoval-Castro, C., Hoste, H., Capetillo, C., González Pech, P., Torres-Acosta, F. 2016. In vitro And in vivo anthelmintic effect of coffee arabica residues against an *haemonchus contortus* isolate with low susceptibility to tannins. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 19. 41-50. 10.56369/tsaes.2198.
  57. López-Rodríguez, G., Zaragoza-Bastida, A., Reyes-Guerrero, D.E., Olmedo-Juárez, A., Valladares-Carranza, B., Vega-Castillo, L.F., Rivero-Perez, N. 2023. Coffee Pulp: A Natural Alternative for Control of Resistant Nematodes in Small Ruminants. *Pathogens*. 2023; 12(1):124.
  58. LeCasble, C. 2012. *Le marc de café comme source atypique de tanins condensés dans le contrôle intégré des nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants du Yucatán, Mexique*. Thèse Doctorat Vétérinaire. École Nationale Vétérinaire Alfort: France (<https://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=1549>).
  59. Cai, K., Bennick, A. 2006. Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 16;72(8):974-80.
  60. Kim, D., Kuppasamy, P., Jung, J.S., Kim, K.H., Choi, K.C. 2021. Microbial Dynamics and In Vitro Degradation of Plant Secondary Metabolites in Hanwoo Steer Rumen Fluids. *Animals (Basel)*. 2021 Aug 9;11(8):2350.
  61. Castagna, F.; Piras, C.; Palma, E.; Musolino, V.; Lupia, C.; Bosco, A.; Rinaldi, L.; Cringoli, G.; Musella, V.; Britti, D. Green Veterinary Pharmacology Applied to Parasite Control: Evaluation of *Punica granatum*, *Artemisia campestris*, *Salix caprea* Aqueous Macerates against Gastrointestinal Nematodes of Sheep. *Vet. Sci*. 2021, 8, 237. <https://doi.org/10.3390/vetsci8100237>
  62. Castagna F, Bava R, Palma E, Morittu V, Spina A, Ceniti C, Lupia C, Cringoli G, Rinaldi L, Bosco A, Ruga S, Britti D, Musella V. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) anthelmintic treatment on milk production in dairy sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Front Vet Sci*. 2024 Feb 7;11:1347151. doi: 10.3389/fvets.2024.1347151. PMID: 38384955; PMCID: PMC10879392.
  63. Besharati, M., Maggiolino, A., Palangi, V., Kaya, A., Jabbar, M., Eseceli, H., De Palo, P., M. Lorenzo, J. 2022. Tannin in Ruminant Nutrition: Review, *Molecules* 2022, 27, 8273.
  64. Austin PJ, Suchar LA, Robbins CT, Hagerman AE. Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *J Chem Ecol*. 1989 Apr;15(4):1335-47. doi: 10.1007/BF01014834. PMID: 24272016.