

IMPIEGO DI PARTICELLE DI FERRO COLORATE (MICROTRACERS[®]) COME TRACCIANTI DEI MANGIMI E PER IL CONTROLLO DELLA MISCELAZIONE

M. BAGLIACCA¹, G. PACI¹, M. MARZONI¹, E. LISI²

¹Dipartimento Produzioni Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

²Libero Professionista, Colaboratore esterno

Riassunto

Per la prova sono stati preparati 5 mangimi, nei quali è stato aggiunto un premix antiossidante sperimentale (estratto di rosmarino, vit. C e vit. E) che differiva per il contenuto di vit. E (acetato di dl- α -tocoferolo): 25 mg/kg (due diete), 50 mg/kg (una dieta) e 200 mg/kg (due diete). Il premix è stato preventivamente miscelato con due diversi tipi di particelle di ferro di calibro uniforme colorate con un diverso tracciante (25.000 particelle/g; 97% Fe, 3% colorante naturale blu o rosso - Microtracers[®] F-BLUE e Microtracers[®] F-RED) in modo tale che, nei mangimi finiti, vi fossero incorporate, per ciascuno dei due microtraccianti, 1,25, 2,50, 3,75 (due diete), e 5,00 g per 100kg di alimento. L'aggiunta teorica di 31, 63, 94 e 125 particelle per 100 g di mangime pellettato è stata quindi controllata con l'impiego del Rotary detector della Microtracers[®] e il contenuto in vit. E tramite HPLC.

La percentuale di recupero delle particelle è oscillata dal 62 al 78% (media=69 \pm 22%). La riproducibilità, controllata per lo stesso colore di microtracciante su due sottocampioni e, sullo stesso campione, fra microtraccianti di diverso colore, ha presentato un coefficiente di determinazione di 0,71 per il rosso, 0,75 per il blu e 0,73 fra i due colori. Nessuno dei campioni esaminati è risultato privo di particelle microtraccianti per cui la tracciabilità è risultata garantita anche alla dose più bassa. La regressione fra il contenuto in vit. E analizzato e quello stimato tramite i microtraccianti ha mostrato valori di R²= 0,985 per il rosso e R²= 0,987 per il blu.

I risultati confermano che la tecnica di miscelare nei mangimi particelle di ferro micro-calibrate e colorate può costituire un metodo rapido ed economico per la tracciabilità dei microingredienti, per il controllo dell'uniformità di miscelazione e per il controllo, semi quantitativo, dei microingredienti tracciati.

Summary

Microtracers[®], consisting of uniformly sized iron particles colored with codified food dyes (Micro-Tracers, Inc., San Francisco), were incorporated into an experimental antioxidant premix (Rosmarinus officinalis, vitamin E and C, differing in vit E content). 1.25, 2.50, 3.75, and 5.00 g of blue or red particles per 100 kg of food were added to 5 different feed to give concentrations of 31, 63, 94, and 125, particles per 100 g of food. Vit E supplementation was 25 mg/kg (2 pellets), 50 mg/kg (1 pellet) and 200 mg/kg (2 pellets). Pellets, grinded to mash, were assayed, by Microtracers[®]-Rotary detector, for colored iron particles presence and, by HPLC, for vit E content.

Sufficient relationships were found between theoretical and practical recoveries (avg.=69 \pm 22%). Repeatability, controlled on the same color by sub-sampling and between the two colors, was R² = .71, .75 and .73 for red, blue and red vs. blue, respectively. Traceability of premix was secured by the presence of more than one colored iron particle in every sample. Sufficient relationship were found between analyzed vit E-content and estimated vit E-content (R² = .987 blue and R² = .985 red).

The use of microtracers can give an easy, cheap, and rapid method to control diet uniformity by the use of Poisson statistics and related chi-square calculations on counted spots. In addition, use of microtracers technique can be used, in a non laboratory environment, for semi quantitative detection of ingredients (premix, drugs and so on) added to feed in small quantities.

Introduzione

La corretta miscelazione è uno degli elementi più importanti nella produzione dei mangimi commerciali. Il primo scopo del processo di miscelazione è quello di omogeneizzare il più uniformemente possibile le particelle di diversa grandezza e densità delle materie prime che vengono impiegate per formulare l'alimento. L'importanza della corretta

miscelazione è spesso trascurata, anche se vengono osservati non pochi problemi, particolarmente, quando all'alimento vengono aggiunti i microingredienti (vitamine farmaci ecc.) per i quali, in condizioni estreme, errori di miscelazione possono condurre a casi di tossicità (Moncada, 1999).

Nell'alimentazione delle così dette piccole specie (avicoli conigli e pesci) il consumo giornaliero di mangime può scendere al di sotto dei 100 g, conseguentemente la imperfetta

miscelazione (variabilità dell'ordine del 10-20%) può determinare problemi di microcarenze che causano difformità di crescita e riduzione di performance generalizzate (Amornthwaphat et al., 1998). Nell'industria mangimistica per le piccole specie sarebbe buona pratica controllare regolarmente la corretta miscelazione, ma, la determinazione di un contenuto di un componente specifico della dieta comporta costose analisi che, per tale motivo, vengono effettuate raramente o solo a posteriori, quando un problema viene segnalato dagli allevatori. Sarebbe inoltre indispensabile per le ditte produttrici dei mangimi controllare la presenza e/o l'assenza di micro e macro ingredienti particolari nella formulazione finale ma, anche in questo caso, il costo delle analisi limita molto il reale controllo di produzione. È in assenza di tali controlli che, nel passato, si è verificato il noto problema legato alla presenza, spesso non fraudolenta, di farine animali negli alimenti per ruminanti. Non è escluso che senza tracciare gli ingredienti, in futuro, potrà continuare a verificarsi, sia la presenza di sostanze non ammesse in mangimi per specie diverse da quelle per le quali i prodotti sono registrati, sia la presenza di inibitori in mangimi non medicati.

Il diffuso impiego di microtraccianti degli ingredienti, qualora il dosaggio degli stessi si rivelasse rapido, facile, economico e ripetibile, potrebbe essere quindi estremamente utile per migliorare la qualità dei mangimi prodotti.

MATERIALI E METODI

Per la prova sono stati preparati 5 mangimi, nei quali è stato aggiunto un premix antiossidante sperimentale che differiva per il contenuto di vit. E (acetato di dl- α -tocoferolo): 25 mg/kg (due diete), 50 mg/kg (una dieta) e 200 mg/kg (due diete). Il premix è stato preventivamente miscelato con due diversi tipi di particelle di ferro di calibro uniforme colorate con un diverso tracciante (25.000 particelle/g; 97% Fe, 3% colorante naturale blu o rosso - Microtracers® F-BLUE e Microtracers® F-RED) in modo tale che, nei mangimi finiti, vi fossero incorporate, per ciascuno dei due microtraccianti, 1,25, 2,50, 3,75 (due diete), e 5,00 g per 100g di alimento.

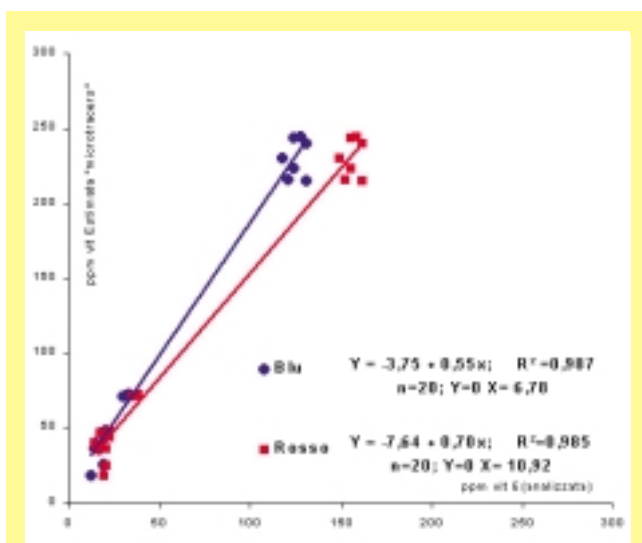


Figura 1 - Regressione fra contenuto di vit. E analizzato e stimato.



Attrezzatura completa per il tracciamento di ingredienti nei mangimi.

Gli ingredienti sono stati miscelati in un miscelatore orizzontale in acciaio inox con doppia elica posizionata sull'asse centrale, i componenti maggiori (mangimi semplici quali erba medica disidratata, orzo, crusca ecc) sono stati pesati e caricati preventivamente mentre il premix microtracciato è stato immesso successivamente direttamente dalla sommità del miscelatore. Il tempo di miscelazione per tutti i mangimi è stato mantenuto costante a 10 minuti. Successivamente gli sfarinati sono stati trasferiti alla pellettatrice mediante un sistema automatico misto (coclea + nastro a tazze) e cubettati con vapore secco a 175°C (pellet $\varnothing = 3\text{mm}$, L = 15 mm). I pellet ottenuti, previo raffreddamento e passaggio in trabatto con riciclo, sono stati quindi insaccati in sacchi da 25kg e trasportati all'allevamento sperimentale (circa 50 Km) dove, da ogni sacco, è stato estratto un campione casuale di circa 200-300g per le analisi.

Ciascun campione è stato quindi macinato, per disgregare i pellet (mulino a martelli con griglia da 2 mm), omogeneizzato e suddiviso in due sottocampioni da 50g ciascuno (bilancia tecnica). Ciascun sottocampione è stato versato su una carta da filtro ($\varnothing = 7,5\text{cm}$) posta sul magnete rotante



Filtro posizionato sul magnete rotante del Rotaridetector.

Tabella 1
Caratteristiche dei campioni di mangime analizzati

		1,25g/100kg		2,50g/100kg		3,75g/100kg		5,00g/100kg	
		rosso	blu	rosso	blu	rosso	blu	rosso	blu
Campioni	n	24		24		44		8	
Punti	n	12	11	21	19	33	32	48	40
	d.s.	1,8	3,3	4,0	4,6	6,3	6,1	6,9	1,3
	c.v.	15,0	29,9	19,2	23,4	19,0	18,7	14,4	3,3
	Poisson	28,5	30,1	21,9	22,7	17,4	17,6	14,5	15,9
	Chi ² *	6,3	22,7	17,8	24,5	51,3	48,7	6,9	0,3

*Valori non significativamente diversi da quelli riscontrabili in miscele teoriche perfette.

del rotary detector della Microtracers®; una volta che tutto il campione è passato sul magnete rotante, la carta da filtro è stata rimossa, le particelle depositatesi circolarmente sulla stessa sono state demagnetizzate tramite un "bulk tape eraser" e disperse su un filtro circolare ($\varnothing = 18,5\text{cm}$) posto su un vetro e imbibito con una soluzione idroalcolica al 50%. Le carte da filtro sono state quindi trasferite in stufa statica a $+65^\circ\text{C}$ ed i punti rossi e blu sono stati contati manualmente e separatamente da due diversi operatori.

4 campioni per ciascuna dieta, recuperati dal rotary detector e conseguentemente privati dei microtraccianti, sono stati quindi sottoposti a saponificazione ed estrazione con etere etilico per la determinazione del contenuto in vitamina E (α -tocoferolo, McMurray et. Al., 1980).

I risultati delle conte effettuate sono stati sottoposti ai seguenti controlli:

- **omogeneità di miscelazione dei pellet sperimentali**, mediante studio della distribuzione di Poisson e analisi del χ^2 (somma dei quadrati degli scarti dalla media delle conte diviso la media stessa) (Snedecor and Cochran, 1984; Treolar, 1939).

- **riproducibilità delle conte effettuate dallo stesso operatore**, tramite analisi dei coefficienti di regressione e di determinazione fra due sottocampioni dello stesso tracciante e dei due traccianti nello stesso campione;

- **percentuale di recupero**, mediante studio del coefficiente di variazione della differenza fra le particelle agiunte e recuperate;

- **soggettività delle letture**, mediante analisi dei coefficienti di regressione e di determinazione fra conte effettuate da due diversi operatori;

I risultati delle analisi della vit E sono stati sottoposti all'analisi delle regressioni rispetto ai valori stimati con la tecnica dei microtraccianti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella Tabella 1 sono riportate, per ciascuna concentrazione di tracciante, la media dei punti con le relative misure che ne descrivono la variabilità (deviazione standard **d.s.**, coefficiente di variazione **c.v.**, coefficiente di variazione di Poisson **Poisson** e significatività dello spostamento dalla distribuzione di Poisson valore di χ^2 **chi²**). Come si può notare il ritrovamento delle particelle in tutte le diete non è differito significativamente da quello che si ottiene in miscele teoricamente perfettamente distribuite. Se il mangime è perfettamente miscelato, infatti, il numero delle particelle

colorate, rinvenute nei diversi campioni, non si discosta dalla variabilità caratteristica della distribuzione di Poisson. Solo nel caso di mangimi non completamente miscelati o demiscelati, la distribuzione di Poisson evidenzia una variabilità maggiore, attestata dai valori significativi di χ^2 .

I risultati ottenuti dalle analisi confermano quanto era prevedibile in funzione della tecnica di miscelazione adottata, che consente la preparazione di mangimi correttamente miscelati se vengono scrupolosamente rispettati i tempi e le modalità di inserimento dei singoli ingredienti.

Per quanto riguarda la precisione del metodo di analisi adottato, si può notare come la riproducibilità delle conte, effettuate dallo stesso operatore su due sottocampioni con lo stesso tracciante e sui due traccianti nello stesso campione, sia piuttosto elevata (Tabella 2). Va rilevato però che il tracciante di colore blu si evidenzia sempre con più difficoltà sulla carta da filtro, tanto che il numero di particelle ritrovate è costantemente minore (Tabella 1). In ogni caso la riproducibilità, anche per questo colore risulta più che accettabile e addirittura superiore a quella che si ottiene con i microtraccianti rossi.

La percentuale di particelle colorate che si ritrovano nel mangime rispetto a quelle immessevi risulta invece abbastanza ridotta: si perde infatti mediamente il 31% delle particelle, vedi Tabella 3. Al fine di valutare la validità della tecnica analitica abbiamo infatti operato volutamente nelle peggiori condizioni possibili, non solo dopo la miscelazione il mangime è stato pellettato, ma prima del prelievo dei campioni, lo stesso è stato sottoposto a tutte le operazioni di routine che ne possono condizionare la qualità (insaccamento, carico, trasporto, scarico e immagazzinamento). La pellettatura ha comportato inoltre l'indispensabile operazione di disaggregazione dei pellet prima delle analisi, quindi un'ulteriore operazione che sicuramente ha favorito la perdita di colore da parte delle micro particelle di ferro. Va notato comunque come, anche con il dosaggio più basso, 1,25g/100kg di mangime, corrispondente a 31 particelle per 100 g di alimento, (16 particelle in 50g) non si sia mai riscontrato un campione con meno di quattro particelle evi-

Tabella 2
Riproducibilità delle analisi dei campioni

	b	R ²
Traccianti rossi	0,81	0,71
Traccianti blu	0,78	0,75
Fra traccianti di diverso colore	0,91	0,73

Tabella 3
Recupero delle particelle colorate nel pellet.

	rosso		blu		indipendentemente da colore	
	%	c.v.	%	c.v.	%	c.v.
1,25g/100kg	77	16	67	35	72	27
2,5g/100kg	63	22	62	27	62	25
3,75g/100kg	71	20	68	20	69	20
5g/100kg	78	14	64	6	71	15
Media	72	18	65	22	69	22

Tabella 4
Soggettività della conta delle particelle

	rosso		blu		indipendentemente da colore	
	b	R ²	b	R ²	b	R ²
1,25g/100kg	+0,77	0,80	+0,96	0,98	+0,95	0,96
2,5g/100kg	+0,98	0,89	+1,12	0,97	+0,97	0,93
3,75g/100kg	+0,82	0,97	+1,00	0,98	+0,91	0,98
5g/100kg	+1,27	1,00	+1,30	0,96	+1,43	0,98
Totale	+1,01	0,98	+1,06	0,99	+0,98	0,99

denziate, ciò conferma quindi l'attendibilità di tale tecnica anche per la tracciabilità degli integratori non desiderati e di lavorazioni precedenti (Corrigan et al, 1994; Eisenberg, 1998, 1999).

La soggettività della lettura delle particelle, anche se effettuata manualmente dall'analista, è risultata sempre accettabile (valore minimo di R²= 0,80 per un contenuto teorico di 31 particelle rosse/100 g di campione analizzato). Tale operazione può essere inoltre resa automatica e oggettivabile tramite l'impiego di un programma di analisi delle immagini abbinato ad un opportuno software, ma questa operazione, che rende l'analisi meno rapida ed economica, in quanto si richiede l'impiego di uno scanner abbinato ad un computer per la lettura delle carte da filtro, risulta non strettamente necessaria e la semplice conta numerica dei punti colorati, evidenziatisi sulla carta da filtro, garantisce una riproducibilità sufficiente, vedi Tabella 4.

La capacità di stima del contenuto di vitamina E tramite i microtraccianti risulta attendibile alle diverse concentrazioni (25, 50 e 200 mg/kg) come è possibile rilevare dalla dispersione dei punti sulle rette di regressione riportate nella figura 1 (R² = 0,987 per il blu e R²= 0,985 per il rosso). Ciò risulta particolarmente interessante anche in considerazione del fatto che il contenuto di vit E del mangime origina sia dalla vitamina sintetica tracciata che dalla vitamina naturale contenuta negli alimenti semplici. Inoltre, come è noto, il processo di pellettatura comporta una certa perdita vitaminica stimata intorno al 5-15% (Putnam & Taylor, 1997).

CONCLUSIONI

I risultati confermano che l'impiego di microparticelle di ferro calibrate e colorate da miscelare a ingredienti che si vogliono "tracciare" nei mangimi, oltre a consentire analisi di controllo rapide ed economiche (Calderon et al., 2000), risulta utile sia per la tracciabilità dei diversi componenti nei

mangimi finiti, sia per il controllo dell'uniformità di miscelazione, sia per l'analisi, semi quantitativa, dei microingredienti tracciati.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la collaborazione la Microtracers® Inc., San Francisco (<http://www.microtracers.com/>) e la Vitaminol Srl Ponsacco.

Bibliografia

- Amornthawaphat N., Behnke K.C., and Hancock J.D. (1998) Effect of particle size and mixing time on uniformity and segregation in pig diets. *Swine Day*: 261-263.
- Calderon J. F., Melendrez J., Machado M., Ambrozio M., Pereira A., and Zinn R. A. (2000) Use of microtracers as a reliable and inexpensive tool for rapid assessment of microingredient distribution in diets for feedlot cattle: molasses- and forage-level effects. *Journal of Animal Science* Vol. 78, Supplement 2 Abstract 62.
- Corrigan O.J., Wilkinson M.L., Ryan J., Harte K., and Corrigan O.F. (1994) The use of Microtracers® in a medicated premix to determine the presence of tiamulin in final feed. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 20 (8): 1503-1509.
- Eisenberg D.A. (1998) The use of Microtracers TM F (colored uniformly sized iron particles) in coding the presence of coccidiostats in poultry feeds practical implications. *Zootecnica International* 12: 46-50.
- Eisenberg D.A. (1999) Use of Invisible but Detectable Microtracers to Assure the Quality of Feeds and Foods. *Proceeding of the Meeting of The Northern California Cereal Chemist*, Albany - USA 25 February.
- McMurray C.H., Blanchflower W.J., Rice D.A. (1980) Influence of extraction techniques on the determination of tocopherol in animal feedstuffs. *J.of A.O.A.C.*, 63: 1258-1261.
- Moncada L.F. P. (1999) Puntos de control en la fabricacion de alimentos balanceados para acuicultura. In *Avances en Nutrition Acuicola III*. Editorst. Suarez E.C. and Alfaro R.M. Facultad de Ciencias Biologicas- Universidad de Nuevo Leon Mexico.
- Putnam M. & Taylor A. (1997) Vitamins in feeds - the critical factors. *Feedtech* 1(1): 39-43.
- Snedecor G.W and Cochran W.G. (1984) *Statistical Methods*, 7a ed., The Iowa State University Press, Ames-Iowa, USA
- Treolar A.E. (1939) *Elements of Statistical Reasoning*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Batschelet E. (1988) - *Introduzione alla matematica per biologi*. Piccin Editore Pd.