

Rendiconti Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari Supplemento Vol. 70 (2000)

## Attività dello squalene durante l'autossidazione di acidi grassi poliinsaturi

M. ASSUNTA DESSÌ (\*), MONICA DEIANA (\*\*), CRISTINA ARRAS (\*\*), ANTONELLA ROSA (\*\*), SEBASTIANO BANNI (\*\*), FRANCESCO P. CORONGIU (\*\*), (\*\*\*)

**Abstract.** *In this paper we have investigated the activity of squalene during the autoxidation of four different polyunsaturated fatty acids: linoleic, linolenic, arachidonic and docosahexaenoic acids. Our results show that squalene exerts a weak but significant antioxidant activity, and that squalene hydroperoxide, the product derived from squalene oxidation, does not possess prooxidant activity. The protection exerted by squalene is higher versus linolenic, arachidonic and docosahexaenoic acids than linoleic acid. Squalene antioxidant activity is related to its double bond system since its saturated form, squalane, does not exert any inhibitory activity. Therefore, in our experimental conditions, squalene does not act as a hydrogen atoms donor such as  $\alpha$ -tocopherol.*

**Keywords:** *squalene, PUFA, autossidazione, idroperossido, antiossidante.*

### INTRODUZIONE

Lo squalene è un composto isoprenoide a 30 atomi di carbonio contenente 6 doppi legami. È stato isolato per la prima volta dall'olio di fegato di squalo [1] ma è largamente diffuso in natura sia nei tessuti vegetali che animali. Nei tessuti animali è un intermedio chiave nella biosintesi del colesterolo. Nell'uomo lo squalene è ubiquitario e viene prontamente trasformato in colesterolo; sulla cute degli individui adulti si accumula invece come tale, fino a costituire circa il 10% dei lipidi totali del sebo [2]. Lo squalene totale secreto dalla pelle umana varia da un soggetto all'altro in quantità che oscillano tra i 125 e i 475 mg/die [3].

---

(\*) Dip. Biologia Sperimentale, Sez. Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Cagliari, Cittadella Universitaria, SS 554 km 4,5, Monserrato (CA) (tel.: 070/6754125, fax: 070/6754032, e-mail: [dessima@unica.it](mailto:dessima@unica.it)).

(\*\*) Dip. Biologia Sperimentale, Sez. Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Cagliari, Cittadella Universitaria, SS 554 km 4,5, Monserrato (CA).

(\*\*\*) Deceduto in Cagliari il 17 agosto 2000.

La superficie cutanea rappresenta un'interfaccia biologica con l'ambiente esterno ed è perciò particolarmente sensibile agli stress ossidativi ambientali, tra i quali è preminente quello derivante dalla radiazione ultravioletta. Questa è in grado di promuovere la perossidazione dei lipidi cutanei, che può essere iniziata dall'ossigeno singoletto [4]. L'ossigeno singoletto può reagire direttamente con il doppio legame C=C e generare perossidi [5]. Tuttavia, la maggior parte delle reazioni radicaliche che avvengono a livello della superficie cutanea sono reazioni di autossidazione.

È riportato in letteratura che lo squalene è attivo nei confronti di diverse specie reattive dell'ossigeno [6] ed è in particolare «*quencher*» di ossigeno singoletto [7]. Altri studi suggeriscono che lo squalene rappresenta il primo lipide, a livello della cute, bersaglio dello stress ossidativo [8].

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di studiare la capacità dello squalene di proteggere gli acidi grassi poliinsaturi dall'autossidazione, agendo come «*scavenger*» di radicali lipoperossidici. È stato utilizzato un semplice sistema chimico [9] nel quale alcuni acidi grassi poliinsaturi, come l'acido linoleico, linolenico, arachidonico e docosaesaenoico sono stati ossidati a 37° C, a secco. Questa metodica ha consentito di operare in assenza di solventi nell'ambiente di reazione, condizione che imita quella ricorrente sulla superficie cutanea. L'andamento dell'ossidazione è stato seguito misurando diversi parametri: il consumo degli acidi grassi e dello squalene e la formazione dei loro principali prodotti di ossidazione. Inoltre, quantificando la formazione degli isomeri geometrici dell'acido linoleico idroperossido è stato possibile ricavare utili informazioni riguardo al meccanismo coinvolto nell'attività dello squalene.

## MATERIALI E METODI

### Reagenti e sostanze chimiche

Lo squalene, lo squalano e gli acidi grassi utilizzati, ad un grado di purezza del 98%, sono stati acquistati dalla Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). L'acido 13-idroperossi-9-11-cis,trans-ottadecadienoico (13-c,t-HPODE), l'acido 9-idroperossi-10-12-cis,trans-ottadecadienoico (9-c,t-HPODE), l'acido 9-11-cis,trans-ottadecadien-13-one (13-c,t-oxo-ODE) e l'acido 10-12-cis,trans-ottadecadien-9-one (9-c,t-oxo-ODE) sono stati acquistati dalla Cascade Biochem. LTD (London, UK). Tutti i solventi utilizzati, a grado di purezza RS per HPLC, sono stati acquistati presso la Carlo Erba (Milano).

### Autossidazione degli acidi grassi

L'andamento dell'autossidazione degli acidi grassi è stato seguito monitorando il consumo dell'acido grasso e la formazione dei suoi idroperossidi [9]. Dove possibile, è stata anche misurata la formazione dei chetoni, principali prodotti della degradazione degli idroperossidi [10,11]. Brevemente, 3,6 µmoli di ciascun acido grasso puro, da una soluzione 3,6 µM in n-esano, sono state portate a secco e incubate in un bagno termostatico a 37° C. La reazione di ossidazione è stata fermata quando il 70-80% di acido

grasso si era consumato. L'acido linoleico è stato così ossidato per 24 ore, l'acido linolenico per 14 ore, l'acido arachidonico per 10 ore e l'acido docosaesaenoico per 5 ore. L'andamento dell'ossidazione è stato seguito analizzando il valore dei vari parametri ad intervalli di un'ora o di mezz'ora. Durante l'autossidazione i campioni sono stati esposti alla luce artificiale, sebbene non sia stata notata alcuna differenza fra i campioni tenuti al buio e quelli esposti alla luce. Alla fine del periodo di incubazione, i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio e risospesi in 1 ml di acetonitrile acidificato con acido acetico (0,14%) per la lettura all'HPLC.

Nei campioni dove gli acidi grassi sono stati ossidati in presenza di squalene, il composto è stato aggiunto alle 3,6  $\mu\text{moli}$  di ciascun acido grasso a diverse concentrazioni (20, 40, 80, 160, 240, 320, 400, 480 nmoli) come soluzione in n-esano. I campioni, portati a secco, sono stati incubati in un bagno termostatico a 37° C per 24, 14, 10 e 5 ore nel caso rispettivamente dell'acido linoleico, linolenico, arachidonico e docosaesaenoico. A fini comparativi, le stesse prove sperimentali sono state condotte in presenza di squalano, la forma satura dello squalene.

#### **Analisi cromatografica degli acidi grassi e dello squalene**

L'analisi degli acidi grassi e dello squalene è stata effettuata mediante un sistema HPLC 1050 con rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi 1040 Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA), equipaggiato con un programma di elaborazione dati Phoenix 3D HP Chemstation.

Gli acidi grassi sono stati separati con una colonna  $C_{18}$  Adsordosphere Alltech (Eke, Belgium) a fase inversa (25 cm  $\times$  4,6 mm I.D, 5  $\mu\text{m}$ ) e con una fase mobile di  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$  (70/30/0,12 v/v/v), ad un flusso di 1,5 ml/min. Gli acidi grassi sono stati rilevati a 200 nm, gli acidi grassi idroperossidi a 234 nm e i chetoni a 280 nm. Lo squalene è stato eluito con una colonna  $C_{18}$  Hewlett-Packard a fase inversa (10 cm  $\times$  2,1 mm I.D, 5  $\mu\text{m}$ ), con metanolo al 100% ad un flusso di 0,2 ml/min, ed è stato rilevato a 203 nm. Ogni 1,28 sec è stato registrato lo spettro completo dell'eluato (da 195 a 315 nm) ed è stata eseguita un'analisi computerizzata degli spettri in derivata seconda [12]. Come ulteriore conferma dell'identificazione dei picchi cromatografici, sono stati aggiunti, quando disponibili, dei composti standard ai campioni.

#### **Caratterizzazione dei prodotti di ossidazione dello squalene**

La caratterizzazione dei principali prodotti di ossidazione dello squalene è stata effettuata combinando l'analisi spettrofotometrica all'HPLC con uno spettrometro di massa API I Perkin Elmer/Sciex (Toronto, Ontario, Canada) equipaggiato con una sorgente a ionizzazione atmosferica e una interfaccia ionspray. I prodotti di ossidazione dello squalene sono stati eluiti secondo le condizioni sopra riportate per lo squalene; in queste analisi, è stato addizionato  $\text{NH}_4\text{O}_2\text{CCH}_3$  (2 mM) alla fase mobile, per assicurare la ionizzazione degli analiti. L'interfaccia è stata tenuta a 5 kV e il voltaggio dell'orifizio a 70V. Come gas nebulizzante è stata utilizzata aria pura ad una pressione di 40 psi, mentre

come gas curtain è stato utilizzato azoto puro, scaldato a 55°C, ad un flusso di 0,6 L/min. Gli analiti presenti nella fase mobile uscita dall'HPLC, dopo passaggio nel rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi, sono stati direttamente introdotti nella fonte di ionizzazione. Lo spettrometro di massa è stato impostato per analizzare nel range di m/z da 280 a 600, con una risoluzione di m/z di 0,1 e una velocità di scansione di 8,67 sec.

### **Analisi statistiche**

Per calcolare la media e la deviazione standard dei dati ottenuti dalla triplice analisi di ogni campione nelle medesime condizioni sperimentali è stato utilizzato un programma INSTANT GraphPad software (San Diego, CA, USA). Per evidenziare la significatività fra le medie dei diversi gruppi, formati da campioni uguali di distinti esperimenti, è stata effettuata l'analisi «one-way ANOVA», che si basa sul metodo di Bonferroni.

## **RISULTATI**

### **Autossidazione degli acidi grassi**

Gli acidi grassi utilizzati sono stati ossidati per diversi intervalli di tempo, in modo da ottenere una ossidazione all'incirca equivalente, come si osserva nella Tab. 1. L'andamento dell'autossidazione dell'acido linoleico è mostrato in Fig. 1 ed è lo stesso per tutti gli acidi grassi esaminati, in accordo con quanto riportato in letteratura [10]. In particolare, si nota come la maggiore concentrazione di idroperossidi formati si ha sempre in un determinato momento del processo ossidativo, al limite fra la fase di propagazione e la fase di termine [10], quando circa il 40-50% dell'acido grasso si è consumato. Questo punto è raggiunto ad un diverso tempo di incubazione per ogni acido grasso, e diminuisce esponenzialmente con il crescere dei doppi legami, come mostrato in Fig. 2. La quantità massima di idroperossidi formati è inoltre molto più alta per l'acido linoleico (circa 700 nmoli) che per gli altri acidi grassi poliinsaturi (PUFA) (circa 400 nmoli) (Tab. 1).

### **Autossidazione dell'acido linoleico in presenza di squalene**

L'acido linoleico è stato ossidato a 37° C per 24 ore in presenza di crescenti concentrazioni di squalene (da 20 a 480 nmoli). La Tab. 2 mostra i valori di acido linoleico residuo e dei suoi idroperossidi e chetoni isomeri, misurati nel corso dell'autossidazione. Si può notare come la quantità di acido grasso residuo, in presenza di squalene, è significativa, rispetto ai campioni ossidati di controllo, a partire da 80 nmoli. Lo squalene mostra una certa attività antiossidante, che diventa evidente alla più alta concentrazione utilizzata (480 nmoli). Infatti, a tale concentrazione l'acido linoleico viene protetto per circa il 25% (Fig. 3). La protezione percentuale esercitata dallo squalene è stata calcolata comparando i valori di acido grasso residuo e di idroperossidi formati in presenza di squalene, incubato al massimo tempo di ossidazione (24 ore), con quelli ottenuti durante l'autossidazione del solo acido grasso. Lo squalene non ha mostrato attività proossidante a nessuna delle concentrazioni utilizzate. Inoltre, al crescere della sua concentrazione

**Tabella 1. Andamento dell' autossidazione a 37°C di 3,6 µmoli (~1 mg) di acido grasso. La significatività dei campioni è stata calcolata rispetto ai valori iniziali (tempo 0). \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001 (PUFA, acido grasso poliinsaturo; HP, idroperossido).**

Acido linoleico			Acido linolenico			Acido arachidonico			Acido docosaesaenoico		
Incubazione ore	PUFA residuo (nmoli)	PUFA HP (nmoli)	Incubazione ore	PUFA residuo (nmoli)	PUFA HP (nmoli)	Incubazione ore	PUFA residuo (nmoli)	PUFA HP (nmoli)	Incubazione ore	PUFA residuo (nmoli)	PUFA HP (nmoli)
0	3528±41	71±12	0	3508±33	7±3	0	3637±58	6±1	0	3737±83	32±9
4	3413*±98	220***±14	2	3295***±9	46*±2	1	3544±82	17±2	0,5	3662±20	62**±1
8	2969***±156	440***±39	4	3242***±25	140***±28	2	3526±40	34±8	1	3447***±7	129***±1
12	2548***±55	711***±12	6	3031***±15	268***±48	3	3377***±12	92***±8	1,5	3376***±45	231***±1
16	1906***±43	704***±5	8	2571***±28	426***±19	4	3335***±87	155***±17	2	3096***±11	363***±26
20	1408***±36	575***±50	10	2195***±44	449***±27	5	3119***±20	250***±37	2,5	2593***±113	419***±5
24	954***±33	423***±35	12	1789***±39	443***±26	6	2803***±45	345***±8	3	2056***±53	405***±12
			14	1154***±57	316***±5	7	2381***±48	407***±17	3,5	1664***±91	350***±31
						8	1775***±216	362***±4	4	1412***±38	230***±17
						9	1344***±138	287***±1	4,5	700***±8	142***±23
						10	813***±87	186***±41	5	442***±36	75***±3

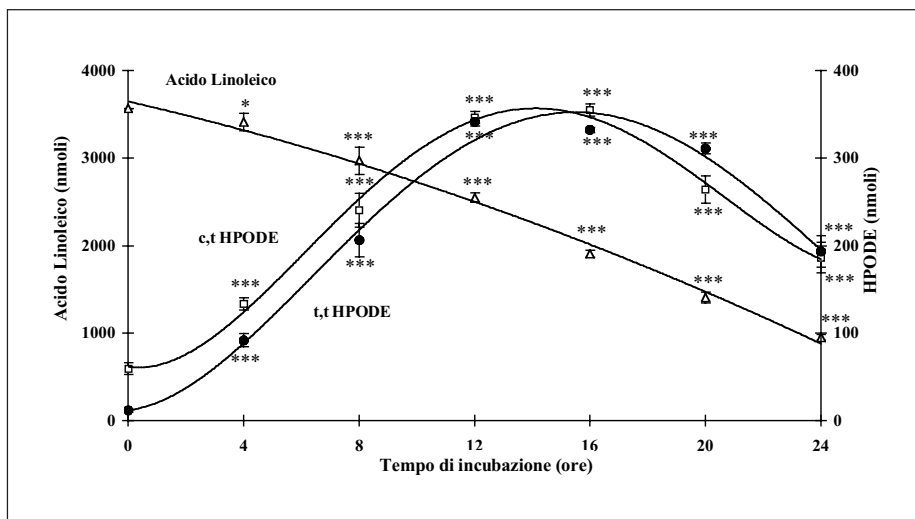


Figura 1. Andamento dell'autossidazione dell'acido linoleico a 37°C per 24 ore. Nel grafico sono riportati i valori di acido grasso residuo e di idroperossidi formati, misurati a diversi intervalli di tempo. La significatività dei campioni è stata calcolata rispetto ai valori iniziali (tempo 0). \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  (HPODE, acido idroperossioottadecadienoico; c,t cis, trans; t,t trans,trans).

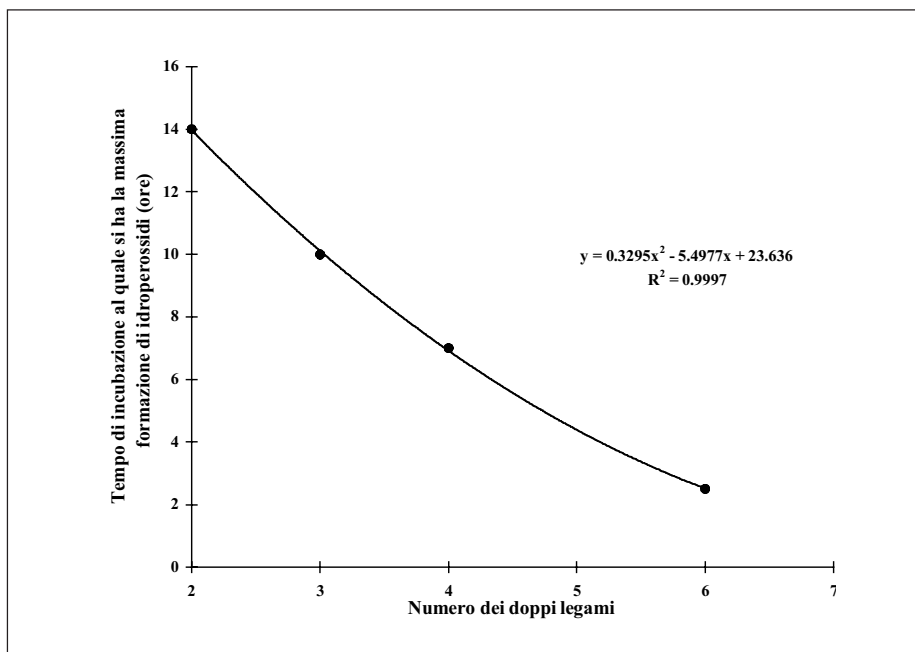
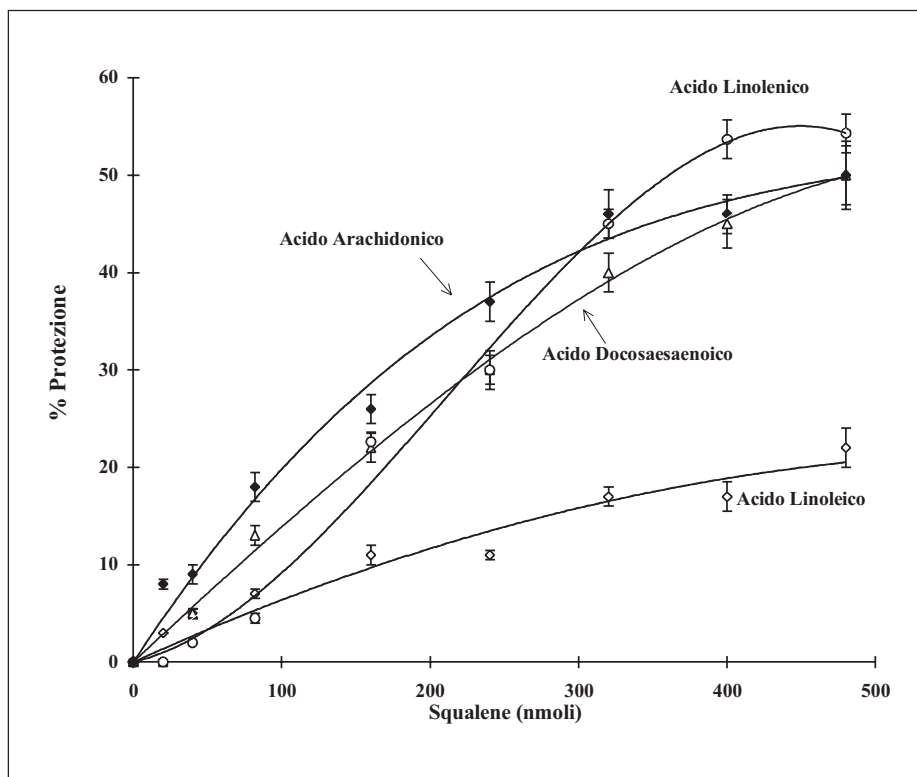


Figura 2. Correlazione fra il numero di doppi legami presenti nell'acido grasso e il tempo necessario a raggiungere la massima produzione di idroperossidi durante l'ossidazione a 37°C.

**Tabella 2. Andamento dell'autossidazione a 37°C di 3,6 µmoli (~1 mg) di acido linoleico in presenza di varie concentrazioni di squalene. La significatività dei campioni è stata calcolata rispetto ai valori iniziali (tempo 0). \*\*\* = p < 0,001 (HPODE, acido idroperossio-ottadecadienoico; oxo-ODE, acido ottadecadienone; c,t cis, trans; t,t trans,trans).**

Squalene (nmoli)	Acido linoleico residuo (nmoli)	HPODE c,t (nmoli)	HPODE t,t (nmoli)	c,t/t,t	oxo-ODE c,t (nmoli)	oxo-ODE t,t (nmoli)	c,t/t,t
0	782±75	128±10	112±12	1,1	15±4	15±3	1,0
20	1019±98	195±14	167±13	1,2	22±1	21±1	1,1
40	1072±36	253±27	222±26	1,1	25±1	23±1	1,1
80	1151***±82	274±7	243±5	1,1	25±1	25±1	1,0
160	1247***±94	297***±22	289***±12	1,0	26±2	27±2	1,0
240	1261***±86	332***±15	351***±12	0,9	30±1	32±1	1,0
320	1425***±30	355***±6	378***±4	0,9	30±1	31±1	1,0
400	1451***±103	347***±13	372***±15	0,9	28±1	28±1	1,0
480	1577***±261	360***±45	391***±43	0,9	29±2	30±3	0,9



**Figura 3. Protezione percentuale esercitata da varie concentrazioni di squalene durante l'autossidazione a 37°C degli acidi grassi linoleico, linolenico, arachidonico e docosaesaenoico.**

nella miscela di incubazione, determina un aumento degli idroperossidi e dei chetoni isomeri in rapporto pressoché equimolare (Tab. 2).

#### **Autossidazione degli acidi grassi in presenza di squalene**

Alla più alta concentrazione utilizzata (480 nmoli), lo squalene ha rallentato l'autossidazione degli acidi linolenico, arachidonico e docosaesaenoico più che dell'acido linoleico. Infatti, mentre nel caso dell'acido linoleico la protezione è stata di circa il 25%, nel caso degli altri acidi grassi è stata di circa il 50% (Fig. 3).

Le stesse prove sperimentali sono state effettuate sostituendo allo squalene lo squalano, la sua forma satura, ma in nessun caso si è evidenziata protezione (dati non mostrati).

#### **Prodotti di ossidazione dello squalene**

Durante l'autossidazione in presenza di acidi grassi poliinsaturi lo squalene si consuma originando, come principali prodotti di ossidazione, lo squalene idroperossido



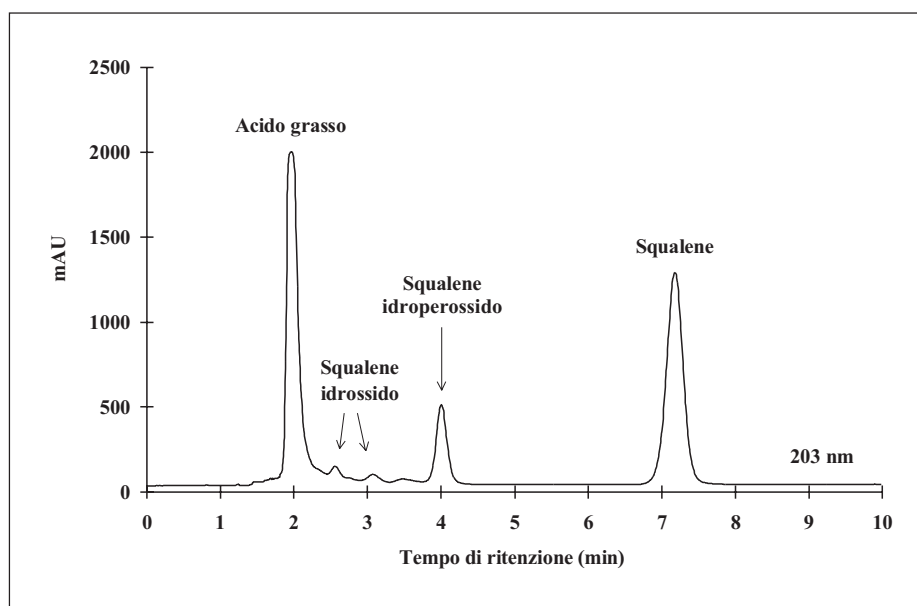


Figura 4. Cromatogramma dello squalene e dei suoi principali prodotti di ossidazione registrato a 203 nm.

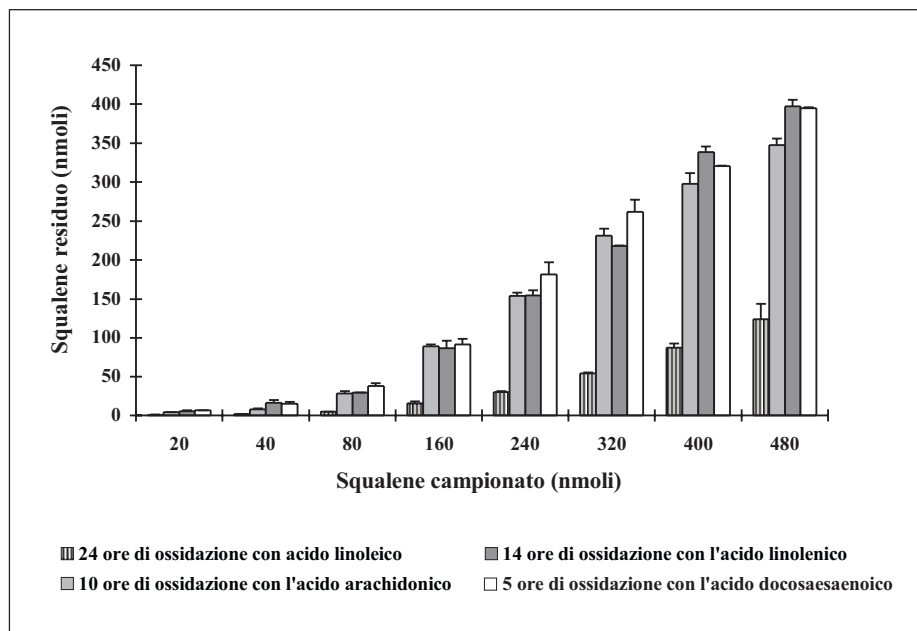
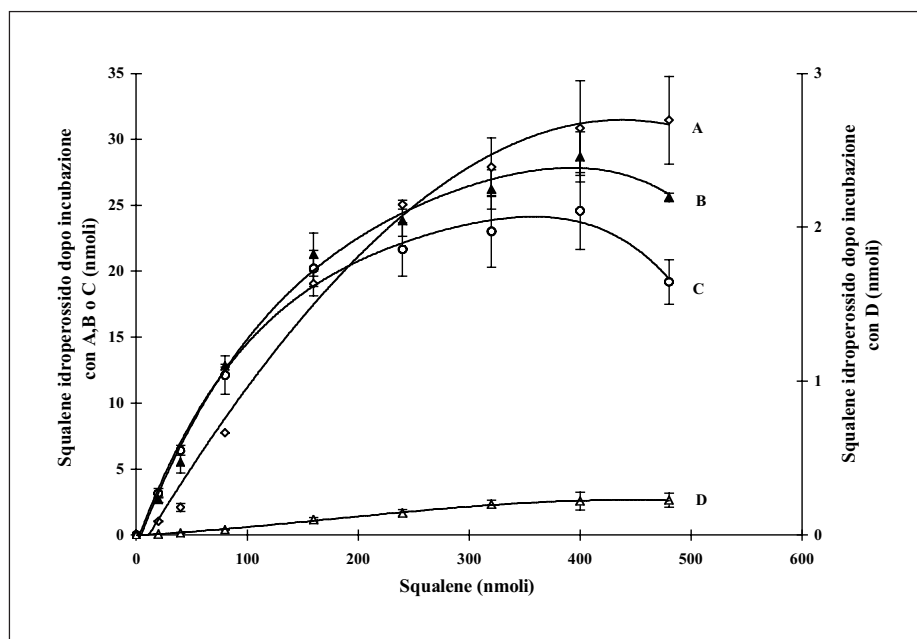


Figura 5. Consumo di squalene, incubato per diverse ore con acido linoleico, linolenico, arachidonico e docosaesaenoico, durante l'autossidazione a 37°C.



**Figura 6.** Squalene idroperossido formato al termine dell'ossidazione dell'acido docosaesaenoico (A) per 5 ore, dell'acido linolenico (B) per 14 ore, dell'acido arachidonico (C) per 10 ore e dell'acido linoleico (D) per 24 ore, in relazione alla quantità iniziale di squalene presente nella miscela di reazione.

e lo squalene idrossido. Questi prodotti sono stati evidenziati con l'analisi spettrofotometrica all'HPLC, come mostrato nel cromatogramma in Fig. 4, e identificati mediante spettrometria di massa. La quantità di squalene consumato è maggiore quando questo è incubato in presenza di acido linoleico che quando è incubato in presenza degli altri acidi grassi più insaturi (Fig. 5). Inoltre, la quantità di squalene idroperossido formato sembra variare in relazione al grado di insaturazione dell'acido grasso in esame, sia quando si analizzano i dati presi alla fine del periodo di incubazione (Fig. 6), che quando si comparano quelli presi ad uno stesso tempo di incubazione per tutti gli acidi grassi (Fig. 7).

## DISCUSSIONE

L'attività dello squalene verso radicali lipoperossilici è stata studiata in un semplice sistema chimico [9], durante l'autossidazione di un acido grasso insaturo. Lo squalene ha dimostrato di possedere una significativa attività antiossidante; all'aumentare della sua concentrazione nella miscela di reazione aumenta la protezione, e, alla più alta concentrazione utilizzata, cioè in un rapporto di 7:1 (acido grasso:squalene) si ha un rallentamento dell'autossidazione dell'acido linoleico di circa il 25%, e di quella degli altri acidi

grassi più insaturi di circa il 50%. Lo squalene sembra quindi essere un buon «*scavenger*» di radicali perossilici, e non sembra possedere, in queste condizioni sperimentali, alcuna attività proossidante. La maggior protezione esercitata dallo squalene verso gli acidi grassi più insaturi potrebbe essere spiegata tenendo presente che gli idroperossidi dell'acido linoleico sono più stabili rispetto a quelli degli altri PUFA, come dimostrato dalle nostre prove sperimentali. Abbiamo infatti osservato che la massima produzione di idroperossidi, raggiunta quando circa il 40% dell'acido grasso si è consumato, è di circa 700 nmoli per l'acido linoleico e di circa 400 nmoli per gli altri PUFA. Sembra, inoltre, che dalla frammentazione degli idroperossidi degli acidi grassi contenenti più di due doppi legami abbiano origine prodotti che non sono facilmente convertibili in radicali capaci di propagare la reazione [10]. Così, lo squalene presente nella miscela di reazione è più a lungo esposto all'effetto proossidante degli idroperossidi dell'acido linoleico che di quelli degli altri PUFA e questo risulta in un maggior consumo del composto e in una sua minore attività protettiva. Si osserva infatti che il consumo di squalene è maggiore in presenza di acido linoleico. Anche i prodotti di ossidazione dello squalene, lo squalene idrossido e lo squalene idroperossido, si ritrovano in minore concentrazione alla fine

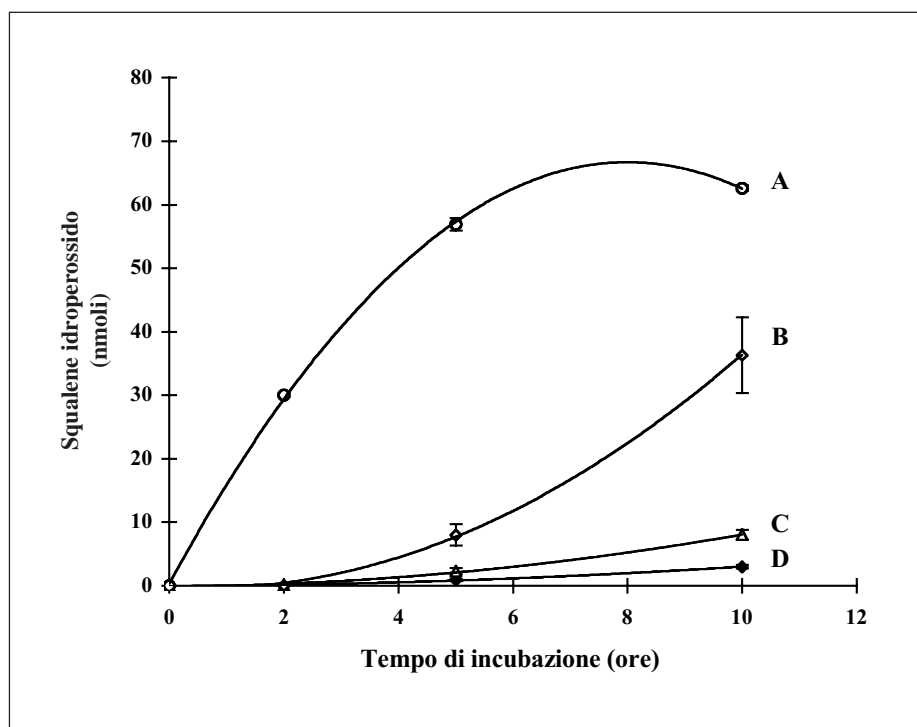


Figura 7. Squalene idroperossido formato a determinati intervalli di tempo durante l'autossidazione dell'acido docosaesaenoico (A), dell'acido arachidonico (B), dell'acido linolenico (C), e dell'acido linoleico (D) a partire da 480 nmoli iniziali di squalene.

dell'autossidazione in presenza di acido linoleico e sembrano dunque subire lo stesso attacco degli idroperossidi con il procedere dell'incubazione. Tali prodotti derivano esclusivamente dalla reazione con radicali perossilici, poiché non vengono determinati quando lo squalene è ossidato in assenza di PUFA. Nelle nostre condizioni sperimentali essi non hanno mai mostrato di possedere alcun effetto proossidante, probabilmente perché i radicali intermedi sono stabilizzati dalla risonanza nelle unità isopreniche della molecola. Al carbonio quaternario dell'unità isoprenica sembra legata la capacità dello squalene di agire come «*quencher*» di ossigeno singoletto [7]. Anche nelle nostre condizioni sperimentali la presenza dell'unità isoprenica sembra indispensabile per l'attività antiossidante della molecola, poiché lo squalano, la forma satura dello squalene, non ha mostrato alcuna attività. Riguardo al meccanismo di reazione dello squalene con i radicali perossilici risulta chiaro che lo squalene non si comporta come donatore di atomi di idrogeno, come l' $\alpha$ -tocoferolo, poiché la produzione degli idroperossidi e chetoni isomeri, ottenuti nel corso dell'autossidazione dell'acido linoleico, è sempre in rapporto pressoché equimolare. La presenza dell' $\alpha$ -tocoferolo nella miscela di reazione, invece, sposta la formazione degli idroperossidi e dei chetoni isomeri verso la forma *cis,trans* [9].

L'accumulo di squalene non avviene nella maggior parte dei tessuti interni, ma è caratteristico della cute [2]. La ragione del perché lo squalene sia presente nel sebo in tali concentrazioni non è stata ancora completamente chiarita.

Nel nostro sistema sperimentale lo squalene, nello stesso rapporto di 7:1 (acido grasso:squalene) che si trova sulla superficie cutanea, ha mostrato di possedere una buona attività antiossidante, agendo da «*scavenger*» di radicali lipoperossilici, e di non essere proossidante. In letteratura è riportato che lo squalene possiede attività di «*quencher*» nei confronti dell'ossigeno singoletto [7] e rappresenta il primo lipide, a livello della cute, bersaglio dello stress ossidativo, generando come principale prodotto di ossidazione lo squalene idroperossido. Quest'ultimo sembra possedere importanti attività biologiche, poiché in sistemi «*in vitro*» stimola la produzione di melanina da parte dei melanociti [8]. Si potrebbe quindi pensare che il ruolo dello squalene nel sebo sia anche legato alla sua azione protettiva nei confronti dei lipidi cutanei, suscettibili di processi perossidativi indotti principalmente dalla luce ultravioletta.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M. TSUJIMOTO, *A Highly Unsaturated Hydrocarbon in Shark Liver Oil*. J. Ind. Eng. Chem. 8, 889 (1916).
- [2] N. NICOLAIDES, *Skin Lipids: their Biochemical Uniqueness*. Science, 186, 19 (1974).
- [3] T. NIKKARI, P.H. SCHREIBMAN, JR E.H. AHRENS, *In vivo Studies of Sterol and Squalene Secretion by Human Skin*. J. Lipid Res. 15, 563 (1974).
- [4] G.F. VILE, R.M. TYRRELL, *UVA Radiation Induced Oxidative Damage to Lipids and Proteins in vitro and in Human Skin Fibroblasts is Dependent on Iron and Singlet Oxygen*. Free Rad. Biol. Med. 18, 721 (1995).
- [5] B. HALLIWELL, J.M.C. GUTTERIDGE, *Lipid Peroxidation: a Radical Chain Reaction*. In «Free

- Radical in Biology and Medicine», B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge Eds, Clarendon Press, Oxford (1989).
- [6] H.M. STORM, S.Y. OH, B.F. KIMLER, S. NORTON, *Radioprotection of Mice by Dietary Squalene*. *Lipids* 28, 555 (1993).
- [7] Y. KOHNO, Y. EGAWA, S. ITOH, S. NAGAOKA, M. TAKAHASHI, K. MUKAI, *Kinetic Study of Quenching Reaction of Singlet Oxygen and Scavenging Reaction of Free Radical by Squalene in n-butanol*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1256, 52 (1995).
- [8] M. PICARDO, C. ZOMPETTA, C. DE LUCA, M. CIRONE, A. FAGGIONI, M. NAZZARO-PORRO, S. PASSI, G. PROTA, *Role of Skin Surface Lipids in UV-Induced Epidermal Cell Changes*. *Arch. Dermatol. Res.* 283, 191 (1991).
- [9] S. BANNI, M.S. CONTINI, E. ANGIANI, M. DEIANA, M.A. DESSI, M.P. MELIS, G. CARTA, F.P. CORONGIU, *A Novel Approach to Study Linoleic Acid Autoxidation: Importance of Simultaneous Detection of the Substrate and its Derivative Oxidation Products*. *Free Rad. Res.* 25, 43 (1996).
- [10] H.W. GARDNER, *Reactions of Hydroperoxides-Products of High Molecular Weight*. In «Autoxidation of unsaturated lipids», Chan S.H.W. Ed., Academic Press, London (1987).
- [11] C.E. ERIKSSON, *Oxidation of Lipids in Food System*. In «Autoxidation of unsaturated lipids», Chan S.H.W. Ed., Academic Press, London (1987).
- [12] F.P. CORONGIU, S. BANNI, *Detection of Conjugated Dienes by Second Derivative Ultraviolet Spectrophotometry*. *Meth. Enzymol.* 233, 303 (1994).