



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE

Ciclo XXIII

Caratterizzazione dei lipidi in matrici alimentari

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/09

Presentata da:	Dott.ssa Myriam Fiori
Coordinatore Dottorato:	Prof.ssa Valeria Sogos
Tutor:	Dott.ssa Margherita Addis

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

Alla mia famiglia

INDICE

1	Introduzione.....	1
2	Il latte	9
	2.1 Generalità e definizione	9
	2.2 Caratteristiche fisico-chimiche	13
	2.3 Caratteristiche chimiche dei principali componenti del latte	14
	2.3.1 Acqua.....	14
	2.3.2 Proteine	14
	2.3.2.1 Caseina	16
	2.3.2.2 Le proteine del siero.....	19
	2.3.2.3 I proteoso peptoni	20
	2.3.2.4 Le sostanze azotate non proteiche	20
	2.3.3 Lipidi	21
	2.3.4 Zuccheri	23
	2.3.5 Enzimi.....	24
	2.3.6 Vitamine	25
	2.3.7 Sali minerali	26
3	La carne	27
	3.1 Generalità e definizione	27
	3.2 Tessuto muscolare.....	28
	3.2.1 Muscolo cardiaco	28
	3.2.2 Muscolo liscio	28
	3.2.3 Muscolo Scheletrico	28
	3.2.3.1 Fibre muscolari.....	33
	3.3 Composizione e funzione del tessuto muscolare	35
	3.3.1 Acqua.....	36
	3.3.2 Proteine.....	38
	3.3.3 Lipidi	39
	3.3.4 Carboidrati	40

3.3.5 Vitamine	41
3.3.6 Sali minerali	41
3.4 Il colore della carne.....	42
3.5 Cambiamenti <i>post mortem</i> del muscolo.....	42
4 I lipidi.....	44
4.1 Introduzione.....	44
4.2 Acidi Grassi	48
4.2.1 Classificazione e nomenclatura.....	48
4.2.2 Acidi grassi saturi (SFA)	49
4.2.3 Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)	51
4.2.4 Acidi grassi polinsaturi (PUFA).....	56
4.2.4.1 Acidi grassi essenziali (EFA)	58
4.2.5 Acidi linoleici coniugati (CLA)	63
4.2.5.1 Introduzione.....	63
4.2.5.2 Biosintesi dell'acido linoleico coniugato (CLA).....	65
4.3 Triacilgliceroli	71
4.4 Fosfolipidi	72
4.4.1 Glicerofosfolipidi	74
4.4.2 Sfingolipidi	78
5 I lipidi della carne.....	85
5.1 Introduzione.....	85
5.2 Acidi grassi polinsaturi (PUFA)	89
5.3 CLA nella carne e nei prodotti carnei	91
6 Tecniche analitiche utilizzate nella caratterizzazione della frazione lipidica della carne.....	93
6.1 Estrazione della frazione lipidica.....	93
6.1.1 Metodi di riferimento	94
6.1.2 Metodi alternativi	95
6.2 Separazione delle classi lipidiche	96

6.2.1	Introduzione alle separazioni cromatografiche	96
6.2.1.1	Cromatografia su strato sottile (TLC).....	98
6.2.1.2	Separazione mediante SPE (Solid Phase Extraction)	104
6.3	Caratterizzazione delle classi lipidiche	107
6.3.1	Caratterizzazione della composizione acidica	107
6.3.1.1	Derivatizzazione degli acidi grassi	107
6.3.1.2	Metodi di preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi.....	108
6.3.1.3	Identificazione degli acidi grassi tramite GC	110
6.3.1.4	Identificazione degli acidi grassi tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).....	115
6.4	Determinazione degli Acidi Linoleici Coniugati (CLA)	118
6.4.1	Identificazione degli isomeri coniugati dell'Acido Linoleico Coniugato (CLA) mediante gascromatografia (GC).....	118
6.4.2	Identificazione degli isomeri dell'Acido Linoleico Coniugato (CLA) mediante cromatografia liquida (HPLC).....	120
6.5	Determinazione dei fosfolipidi (PL)	122
6.5.1	Fasi stazionarie.....	123
6.5.1.1	HPLC a fase inversa (RP-HPLC)	123
6.5.1.2	HPLC a fase normale	123
6.5.2	Fasi mobili	125
6.5.3	Rivelatori	125
7	I° Contributo sperimentale	128
7.1	Materiali e Metodi	128
7.2	Estrazione della frazione lipidica.....	129
7.2.1	Metodo di riferimento: AOAC, 1990	129
7.2.2	Metodo Folch	130
7.2.3	Metodo Folch modificato.....	131
7.2.4	Metodo Hara Radin	132
7.3	Determinazione delle varie classi di composti presenti nell'estratto lipidico	134
7.3.1	Identificazione qualitativa delle diverse classi di composti che costituiscono gli estratti lipidici dei campioni di carne tramite cromatografia su strato sottile (TLC).....	134

7.4 Separazione quantitativa delle diverse classi di composti che costituiscono gli estratti lipidici dei campioni di carne mediante cromatografia su fase solida SPE.....	137
7.4.1 Separazione delle classi lipidiche in colonnine di silice da 1 g - metodo Caboni modificato.....	137
7.4.2 Separazione delle classi lipidiche in colonnine di amminopropile	138
7.5 Separazione e quantificazione degli AGT nelle classi lipidiche	139
7.5.1 Ottimizzazione del metodo di transmetilazione delle classi lipiche nella carne.....	139
7.5.1.1 Transmetilazione basica: metodo FIL-IDF 182 1999.....	139
7.5.1.2 Transmetilazione acida: (Chin et al. 1992)	140
7.5.2 Separazione e quantificazione dei FAME	141
7.5.2.1 Curva di calibrazione	142
7.5.3 Separazione e quantificazione degli AGT nei trigliceridi	149
7.5.4 Separazione e quantificazione degli AGT nei mono e digliceridi	149
7.5.4.1 Transmetilazione acida: (Chin et al. 1992)	149
7.5.4.2 Separazione e quantificazione dei FAME.....	150
7.5.5 Separazione e quantificazione degli AGT nei fosfolipidi.....	150
7.5.5.1 Transmetilazione acida: (Chin et al. 1992)	150
7.6 Separazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi	151
7.6.1 Preparazione del campione	151
7.6.2 Identificazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi	151
7.6.3 Curva di calibrazione.....	152
7.7 Analisi statistica.....	155
7.8 Risultati e discussione	156
7.8.1 Valutazione della quantità totale di lipidi nella carne di agnello in funzione del metodo di estrazione	156
7.8.2 Separazione TLC delle classi lipidiche in funzione della natura del metodo di estrazione nella carne d'agnello.....	159
7.8.3 Separazione quantitativa SPE delle classi lipidiche	161
7.8.3.1 Ottimizzazione della procedura di separazione delle classi lipidiche mediante separazione cromatografica su fase solida (SPE).....	162
7.8.3.2 Separazione SPE e quantificazione delle classi lipidiche presenti nella carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione	167
7.8.4 Valutazione quali-quantitativa del profilo acidico dei lipidi della carne di agnello ...	172

7.8.4.1 Ottimizzazione del metodo di transmetilazione dei lipidi totali nella carne d'agnello	172
7.8.4.2 Valutazione del profilo acidico dei lipidi estratti da carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione	176
7.8.5 Valutazione quali-quantitativa del profilo acidico dei gliceridi e dei fosfolipidi della carne d'agnello	178
7.8.5.1 Valutazione del profilo acidico dei trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi della carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione.	179
7.8.6 Valutazione quali-quantitativa delle differenti classi di fosfolipidi della carne d'agnello	191
7.8.6.1 Valutazione delle classi di fosfolipidi separati dai lipidi estratti da carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione	192
7.9 Conclusioni.....	195
8 II° Contributo sperimentale	197
8.1 Introduzione.....	197
8.2 Disciplinare di produzione “Agnello di Sardegna IGP”	198
8.3 Materiali e Metodi	201
8.3.1 Conduzione e alimentazione delle pecore durante la prova sperimentale	201
8.3.2 Parte sperimentale – obiettivo 1. Effetto della razza sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli leggeri di razza Sarda (gruppo Sarda) e incrocio (F1) razza Sarda x Ile de France (gruppo Francese).....	202
8.3.3 Parte Sperimentale – obiettivo 2. Effetto dell'alimentazione sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli da taglio incrocio (F1) razza Sarda x Ile de France	203
8.3.3.1 Analisi statistica.....	206
8.4 Risultati e discussione	207
8.4.1 I° obiettivo - Effetto della razza sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli “leggeri” di razza Sarda (gruppo Sarda) e incrocio F1 razza Sarda x Ile de France (gruppo Francese)	207
8.4.1.1 Produzione e composizione chimica del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli “leggeri”	207

8.4.1.2 Profilo acidico del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli "leggeri"	209
8.4.1.3 Profilo acidico del latte delle madri degli agnelli "leggeri" di razza Sarda e incrocio F1 (sarda x Ile de France).....	209
8.4.1.4 Macrocomposizione della carne degli agnelli "leggeri"	213
8.4.1.5 Profilo acidico della carne degli agnelli "leggeri"	214
8.4.2 II° obiettivo - Effetto dell'alimentazione sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli "da taglio" incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France)	218
8.4.2.1 Produzione e composizione chimica del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli appartenenti al gruppo LATTE	218
8.4.2.2 Profilo acidico del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli appartenenti al gruppo LATTE	219
8.4.2.3 Macrocomposizione della carne degli agnelli da "taglio" incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France)	221
8.4.2.4 Composizione acidica della carne degli agnelli "da taglio" incrocio F1 (sarda x Ile de France).....	222
8.5 Conclusioni.....	228
Bibliografia.....	229
Ringraziamenti.....	250

Elenco acronimi e sigle

AA: acido arachidonico;

ACC: acetilCoA Carbossilasi;

AFC: Affinity Cromatography;

AGT: acidi grassi totali;

AOAC: Association of Official Analytical Chemists;

ATP: adenosina trifosfato;

BPC: Bonded Phase Cromatography (Cromatografia a fase legata);

BSA: siero albumina bovina;

CLA: Conjugated linoleic acids (acido linoleico coniugato);

CNS: sistema nervoso centrale;

CPC: Chiral Phase Cromatography (Cromatografia a fase chirale);

DG: digliceridi;

DHA: acido docosaesaenoico;

DHT: butilato di idrossitoluene;

DMH: 1,2 dimetilidrazina;

DMOX: 2-alchenil-4,4-dimetilossazolina;

ECD: Detector a cattura di elettroni;

EFA: Essential Fatty acids (acidi grassi essenziali);

ELSD: Evaporative Light Scattering Detector (Detector evaporativo a diffusione di luce laser);

EPA: acido eicosapentenoico;

FA: Fatty Acids (acidi grassi);

FAME: Fatty Acid Methyl Esters (acidi grassi metile steri);

FAS: Fatty Acid Synthetase (acidi grassi sintasi);

FDA: U.S. Food and Drug Administration;

FFA: Free Fatty acids (acidi grassi liberi);

FID: Flame Ionization Detector (Detector a ionizzatore di fiamma);

GC: Gascromatography;

GLC: Gas Liquid Cromatography;

GSC: Gas Solid Cromatography;

HDL: High Density Lipoprotein (lipoproteine ad alta intensità);
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia liquida ad alte prestazioni);
HWD: Detector a termoconducibilità;
IC: Ion Chromatography;
IEC: Ion Exchange Chromatography (Cromatografia a scambio ionico);
IPC: Ion Pair Chromatography;
ISO: International Standard Organization;
LA: acido linoleico;
LC: Liquid Chromatography (cromatografia liquida);
LCFA: Long-chain Fatty Acids acidi grassi lunga catena;
LDL: Low Density Lipoprotein (lipoproteine a bassa intensità);
LLC: Liquid-Liquid Chromatography;
LPC: lisofosfatidilcolina;
LSC: Liquid-Solid Chromatography (Cromatografia Liquido-Solido);
Mb: mioglobina;
MbO₂: ossimioglobina;
MCFA: Medium-chain Fatty Acids (acidi grassi media catena);
Met: metionina;
MFG: Milk Fat Globule (globulo di grasso del latte);
MFGm: Milk Fat Globule membrane (membrana del globulo di grasso del latte);
MG: monogliceridi;
MMB⁺: metamioglobina;
MTAD: 4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-dione;
MUFAs: Monounsaturated fatty Acids (acidi grassi monoinsaturi);
NL: Neutral Lipid (lipidi neutri);
NPC: Normal Phase Chromatography (cromatografia a fase normale);
NPN: azoto non proteico;
NT: azoto totale;
PA: acido fosfatidico;
PAF: platelet activating factor;
PC: fosfatidilcolina;
PDGF: platelet derived growth factor;
PE: fosfatidiletanolamina;
Phe: fenilalanina;

PI: fosfatidilinositolo;

PL: fosfolipidi;

PS: fosfatidilserina;

PUFAs: Polyunsaturated Fatty Acids (acidi grassi polinsaturi);

RA: acido rumenico;

RF: fattore di ritenzione;

RPC: Reverse Phase Cromatography (cromatografia a fase inversa);

SCFA: Short Chain Fatty Acids (acidi grassi corta catena);

SDC: stearoil CoA-Desaturasi;

SEC: Size Exclusion Cromatography;

SFA: Saturated Fatty Acids (acidi grassi saturi);

SFC: Cromatography Phase Supercritical;

SM: sfingomieline;

SMase: sfingomielinasi;

SPE: Solid Phase Extraction;

SPH: Sfingomieline;

TAG: Trigliceridi;

TFA: Trans Fatty Acids (acidi grassi trans);

TLC: Thin Layer Chromatography (cromatografia su strato sottile);

UFA: Unsaturated Fatty Acids (acidi grassi insaturi);

VA: Vaccenic acid (acido vaccenico);

VLDL: Very Low Density Lipoprotein (lipoproteine a densità molto bassa);

VSCFAs: Very Short Chain Fatty Acids (acidi grassi a catena molto corta);

ω3: omega 3;

ω6: omega 6;

ω9: omega 9.

Capitolo 1

Introduzione

Dieta e alimentazione sono fattori importanti nella promozione e nel mantenimento di una buona salute durante il corso della vita.

Lo stato di salute viene mantenuto grazie all'assunzione, tramite gli alimenti, di principi nutritivi necessari a fornire energia per il mantenimento delle funzioni vitali e per le attività corporee (glucidi, lipidi, proteine), fornire materiale plastico per la crescita, il rimodellamento e la riparazione dei tessuti (proteine) e fornire materiale regolatore delle reazioni metaboliche (minerali e vitamine). L'apporto dei macro e micronutrienti è pertanto fondamentale per lo svolgimento delle funzioni vitali e quindi per permettere al corpo di mantenersi in salute.

Le malattie legate allo stile di vita, quali l'obesità, l'iperlipidemia, l'arterosclerosi, il diabete mellito e l'ipertensione sono diffuse e si diffondono sempre di più nei paesi industrializzati. Inoltre il numero sempre più elevato di anziani ha reso queste malattie importanti sia dal punto di vista sanitario sia socio-economico. Sebbene la patogenesi di queste malattie è complicata e il meccanismo attraverso il quale esse si sviluppano non è ben chiaro, è stato osservato che la qualità dei lipidi assunti con la dieta può essere un importante modulatore in termini di morbilità e mortalità di queste malattie.

La qualità nutrizionale dei prodotti diventa dunque un fattore importante nelle scelte alimentari dei consumatori.

Nell'ultimo decennio sono aumentate le evidenze scientifiche a sostegno dell'esistenza di uno stretto legame tra alimentazione e salute. Esiste infatti un'abbondanza di dati sperimentali che dimostrano come alcuni alimenti e componenti alimentari hanno effetti positivi sulla salute umana.

Alcuni acidi grassi presenti nei prodotti di origine animale infatti possono influenzare sia positivamente che negativamente la salute del consumatore. Organismi nazionali ed internazionali hanno dato indicazioni e suggerimenti per un'alimentazione in cui il consumo di grassi sia limitato come quantità di calorie e di acidi grassi saturi. Le linee guida per una corretta alimentazione prevedono, in particolare, un apporto di grassi che copra il 20-30% delle calorie totali, di cui non più di un terzo proveniente da grassi saturi (I.N.N., 1997). In Tabella 1.1 sono riportate le quantità

di grassi totali, fibre, frutta e verdura raccomandate dagli organi competenti per la prevenzione di malattie croniche legate all'alimentazione (WHO, 2002).

Tabella 1.1 - Livelli di nutrienti raccomandati.

Fattori dietetici	Raccomandazioni (% di energia totale se non diversamente indicato)
Lipidi totali	15-30%
Acidi grassi saturi (SFA)	<10%
Acidi grassi polinsaturi (PUFAs)	6-10%
n-6 acidi grassi polinsaturi (PUFAs)	5-8%
n-3 acidi grassi polinsaturi (PUFAs)	1-2%
Acidi grassi trans (TFA)	<1%
Acidi grassi monoinsaturi (MUFAs)	Per differenza ^a
Carboidrati totali	55-75% ^b
Zuccheri liberi ^c	<10%
Proteine	10-15% ^d
Colesterolo	<300mg al giorno
Cloruro di sodio (sodio) ^e	<5g al giorno (<2g al giorno)
Frutta e verdura	≥400g al giorno
Fibre alimentari	>25g al giorno
Polissaccaridi non amilacei	>20g al giorno

^a Questo valore è calcolato come: lipidi totali-(acidi grassi saturi + acidi grassi polinsaturi + acidi grassi trans)

^b % di energia totale disponibile che rimane dopo il consumo come proteine e grassi, da cui questo ampio range :

^c Il termine zuccheri liberi si riferisce a tutti i monosaccaridi e dissaccaridi aggiunti nei prodotti dall'industria, più gli zuccheri naturalmente presenti, miele sciroppi e succhi di frutta

^d Il range proposto va visto alla luce di una consultazione di esperti congiunti WHO/FAO/UNU in materia di proteine e aminoacidi necessari per la nutrizione umana (Ginevra dal 9 al 16 Aprile 2002).

^e Il sale iodato dovrebbe essere più appropriato.

In Gran Bretagna il Department of Health (1994) ha raccomandato la riduzione dell'assunzione di grassi al 30% del totale (da circa il 40%) con una percentuale del 10% per gli acidi grassi saturi (da circa il 15%). Nello stesso tempo è stato consigliato il rapporto tra acidi grassi polinsaturi (PUFA) ed acidi grassi saturi (P:S) che dovrebbe essere al di sopra di 0,4. Poichè alcuni tipi di carne hanno naturalmente un rapporto P:S di circa 0,1, la carne è stata implicata come una delle cause dello squilibrato apporto di acidi grassi nella dieta dei giorni nostri.

Pertanto è opportuno che nell' alimentazione i grassi siano presenti in quantità tali da non apportare più del 30% delle calorie totali della dieta giornaliera. La ripartizione consigliata fra i vari tipi di acidi grassi è la seguente: saturi, 7-10% delle calorie totali; monoinsaturi, 10-15% circa; polinsaturi, 7-10% circa (linee guida per una sana alimentazione italiana, 1997).

I grassi presenti nei prodotti di origine animale, ed in particolare da ruminanti, (carne, latte, formaggi), sono stati spesso messi sotto accusa per il loro alto contenuto in acidi grassi saturi prodotti nel rumine per bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi introdotti con la dieta. Gli acidi grassi palmitico (C16:0) e miristico (C14:0) per esempio aumentano la sintesi del colesterolo e favoriscono l'accumulo di lipoproteine a bassa densità, considerate un fattore di rischio per disturbi cardiovascolari negli uomini; l'acido stearico (C18:0), invece, pur essendo saturo è poco aterogeno, poiché l'organismo lo desatura rapidamente formando acido oleico per cui non dovrebbe avere effetti sul colesterolo plasmatico nell'uomo (Moloney *et al.*, 2001). Anche gli acidi grassi a corta catena sono privi di potere aterogeno. Tuttavia, la carne è anche una buona fonte di aminoacidi essenziali, vitamine liposolubili (A, D, E e K), vitamine del gruppo B (riboflavina, niacina, B6 e B12), minerali (Zn, Fe, Mg) ed acidi grassi essenziali.

Recentemente i nutrizionisti hanno concentrato la loro attenzione sul tipo di acidi grassi polinsaturi (PUFA) e sull'equilibrio, nella dieta, tra gli acidi grassi n-6 PUFA (ω 6) e n-3 PUFA (ω 3). Tra i primi i più importanti sono: l'acido linoleico (C18:2 9c, 12c) contenuto in oli vegetali (mais, girasole, soia) e l'acido arachidonico (C20:4 5c, 8c, 11c, 14c) contenuto principalmente nella carne. Ai secondi appartengono invece l'acido α -linolenico contenuto in oli vegetali (lino, soia, borragine), l'acido eisosapentenoico (EPA, C20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c) e l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6 4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c) contenuti soprattutto nei pesci che vivono in acque fredde. Un apporto equilibrato dei componenti di entrambi i tipi di PUFA è importante per garantire la funzionalità delle cellule e, quindi, per la salute umana. Attualmente il rapporto ω 6/ ω 3 nelle diete del mondo occidentale è di circa 15:1, mentre quello ideale dovrebbe essere di circa 1-4:1.

Tra i PUFA di origine alimentare l'acido linoleico coniugato (CLA) è un acido grasso di elevato valore nutraceutico. La Academy of Science (NRC, 1996) ha definito il CLA come "l'unico acido grasso che mostra in maniera inequivocabile attività anticancerogena in esperimenti realizzati su animali".

L'acronimo CLA è un termine collettivo usato per descrivere uno o più isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico a dieni coniugati, che si formano nel rumine ad opera di enzimi batterici. Esso è presente in piccole quantità nel nostro organismo e viene assunto esclusivamente con i prodotti caseari e la carne dei ruminanti. Le principali risorse alimentari del CLA sono il latte

e suoi derivati, e le carni dei ruminanti, dove l'isomero CLA 9c, 11t (detto anche acido rumenico) rappresenta circa il 90% del CLA totale.

Il CLA 9c, 11t, che si accumula nei lipidi del latte e dei muscoli dei ruminanti, è un intermedio della bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico ad acido stearico. Kay *et al.*, (2004) hanno riportato che la presenza di tale isomero nel latte è riconducibile comunque, per il 70-90%, alla desaturazione dell'acido vaccenico (C18:1 11t), che avviene a livello della ghiandola mammaria ad opera dell'enzima $\Delta 9$ desaturasi. L'acido vaccenico è a sua volta un prodotto intermedio della bioidrogenazione ruminale sia dell'acido linoleico che dell'acido linolenico.

Diversi sono i fattori che influenzano il contenuto di CLA nel latte e nella carne dei ruminanti fra questi importante è l'appartenenza alla specie (bovini, caprini e ovini), alla razza, nonché il tipo di alimentazione (pascolo o supplementazione alimentare con integrazione di mangimi e concentrati) ed il livello dei precursori (acido linoleico e linolenico) introdotti con la dieta. Numerosi studi hanno dimostrato che l'alimentazione al pascolo dei ruminanti o la supplementazione con oli di semi (lino e girasole) sono i metodi più comuni per incrementare il livello di CLA nel latte (Chilliard *et al.*, 2003; Cabiddu *et al.*, 2005) e nella carne (Bessa *et al.*, 2000). Inoltre l'utilizzo di semi di lino (ricchi in acido linolenico) nella dieta degli animali può aumentare la concentrazione di acido linolenico nei tessuti con una diminuzione del rapporto $\omega 6/\omega 3$ (Noci *et al.*, 2005b). E' stato dimostrato che la concentrazione dell'isomero CLA 9c, 11t, aumenta negli alimenti cucinati e/o altrimenti preparati (Moloney *et al.*, 2001).

Nel 1979 Pariza *et al.* scoprirono che una miscela di isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA), isolata dalla carne di manzo cotta, inibiva la mutagenesi. Le sperimentazioni finora condotte in vivo su modelli animali (ratti e topi) e in vitro hanno confermato che i CLA possono evitare o ridurre l'insorgenza di tumori indotti chimicamente in diversi siti, quali la pelle, la ghiandola mammaria, il colon e lo stomaco (O'Shea *et al.*, 2005).

Dai risultati ottenuti, l'efficacia d'azione di questi composti sembra sia legata al dosaggio, alla durata e alla tempistica della somministrazione, al grado di sviluppo del tumore e al tipo di trattamento con l'agente chimico induttore (Ip *et al.*, 1997, 2003).

Numerosi studi suggeriscono che il CLA può avere altri potenziali effetti benefici sulla salute dell'uomo, esso infatti induce la regressione dell'aterosclerosi, modula il metabolismo e la ripartizione del grasso corporeo, ha un effetto antidiabetico e influenza l'accrescimento osseo.

E' stato stimato che i livelli di CLA necessari per raggiungere una certa efficienza d'azione sono pari a circa 3,5 g/d per un uomo di 70 kg di peso (quantità calcolata a partire da livelli di somministrazione sperimentati in modelli animali) (Tabella 1.2).

Tabella 1.2 - Livelli di CLA con effetti protettivi negli animali ed equivalenti dietetici per l'uomo (Williams, 2000).

Azione	Livello di dose attiva per gli animali	Livelli equivalenti di dieta per l'uomo
anticancerogena	0,04 g per kg peso	3,0 - 3,5 g/d
antilipogenica	0,05% della dieta	15 - 20 g/d
antiaterogena	5 g per kg di peso	400 g/d

Un'altra importante fonte di acidi grassi polinsaturi (PUFA), quali l'acido arachidonico, l'acido eicosapentenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA) sono i fosfolipidi (PL). I PL sono i maggior costituenti delle membrane cellulari, regolano il metabolismo, la crescita delle cellule e sono necessari per la trasduzione del segnale. Essi giocano un ruolo importante sia nella crescita e nello sviluppo del cervello, sia nello sviluppo delle cellule fotorecettori della retina. I PL sono, inoltre, i precursori dell'inositolo trifosfato, fattore di attivazione delle piastrine (Zemski Berry and Murphy, 2004).

I PL rappresentati nella dieta sono circa il 10% dei lipidi totali, è stato calcolato che l'apporto giornaliero di PL nella dieta è circa 3-4g al giorno il cui ammontare è circa il 5-8% dei lipidi totali dell'alimentazione in Giappone ed in altri paesi (Yanagita *et al.*, 2008). Zeisel *et al.*, (1980) hanno stimato che la popolazione adulta negli Stati Uniti consuma circa 6g di fosfatidilcolina al giorno.

Il meccanismo attraverso il quale i PL della dieta esplicano i loro effetti benefici non è ben chiaro. Ciascuna molecola contiene come componenti un gruppo idrofilico (es. colina, etanolamina, serina o inositolo) ed un gruppo idrofobico (es. acidi grassi). Ciascuno di questi gruppi o entrambi potrebbero essere i responsabili degli effetti fisiologici dei PL negli uomini e negli animali da esperimento. L'abbassamento dei livelli di colesterolo è stato attribuito ai costituenti di base dei PL, etanolamina e colina ma non a serina o inositolo.

Alcuni studi su modelli animali hanno dimostrato che la fosfatidilserina può migliorare le alterazioni comportamentali associate con l'età. Si è pertanto pensato che la fosfatidilserina potesse avere un impatto positivo anche per l'uomo ed in particolare su quelle funzioni che vengono compromesse dall'età quali la memoria, l'apprendimento e la concentrazione (Pepeu G., 2003; Pepeu *et al.*, 1996).

Secondo Fischer *et al.*, (2005) l'assunzione totale giornaliera di colina negli USA ammonta a 8.4 ± 2.1 mg / kg di peso corporeo negli uomini e a 6.7 ± 1.3 mg / kg di peso corporeo nelle donne.

I livelli di colina e fosfatidilcolina apportati con la dieta influenzano la loro concentrazione nel plasma, infatti il consumo di alimenti poveri in colina assunti attraverso la dieta per tre settimane ha portato alla diminuzione del 30% circa dei livelli di colina e fosfatidilcolina nel plasma

(Zeisel *et al.*, 1991). Una dieta basata sull'assenza totale di colina può provocare una steatosi epatica e danneggiare gravemente il fegato (Sheard *et al.*, 1986; Buchman *et al.*, 1993). Canty (1994) ha suggerito che i PL potrebbero avere applicazioni terapeutiche per alcuni disordini neurologici e per la cirrosi epatica. La colina introdotta con l'alimentazione influenza il profilo dei lipidi del siero e le lipoproteine. Nonostante sia impossibile avere una totale carenza di colina, tuttavia nel 1998 essa è stata identificata come nutriente essenziale per l'uomo ed una sua adeguata assunzione è stata raccomandata dall' Institute of Medicine and National Academy of Science (IOM, 1998) (Tabella 1.3).

Tabella 1.3 - Dose di colina raccomandata dall'IOM.

Popolazione	Età	AI ¹ (mg/d)
Neonati	0-6 mesi	152 (18mg/Kg)
	6 -12 mesi	150
Bambini	1-3 anni	200
	4-8 anni	250
	9-13 anni	375
Uomini	14-18 anni	550
	>19 anni	550
Donne	14-18 anni	400
	>19 anni	425
gravidanza	Ogni età	450
allattamento	Ogni età	550

¹AI = Adequate intake.

Costituenti di molti alimenti anche se presenti in piccole quantità sono gli sfingolipidi. I più importanti sfingofosfolipidi sono la sfingomielina ed il cerebroside, che rientrano nella costituzione della mielina (sostanza che avvolge e protegge gli assoni dei neuroni). Nella sfingomielina la sfingosina è legata alla colina, mentre nel cerebroside è associata al galattosio (che come tale appartiene alla classe degli sfingoglicolipidi). Sia gli sfingolipidi che i loro prodotti di digestione (ceramidi e sfingosine) sono composti altamente bioattivi che influenzano la regolazione cellulare.

Studi su animali da esperimento hanno dimostrato che gli sfingolipidi inibiscono la carcinogenesi al colon, riducono il colesterolo serico delle LDL ed aumentano le HDL (Vesper *et al.*, 1999).

La scoperta delle proprietà nutraceutiche dei prodotti di origine animale legate in particolare alla composizione acidica della frazione lipidica ha comportato, da parte del mondo della ricerca, un accresciuto interesse scientifico volto alla caratterizzazione e alla quantificazione degli acidi grassi in tali prodotti.

La caratterizzazione della frazione lipidica di un alimento sia esso latte o carne comporta diversi passaggi chiave: l'estrazione della frazione grassa dalla matrice di partenza, la derivatizzazione, la separazione degli acidi grassi nonché la loro identificazione e quantificazione.

Dal buon esito dello step iniziale di estrazione dipenderà la qualità del risultato di tutte le analisi successive volte a quantificare e caratterizzare i lipidi estratti (lipidi totali, trigliceridi, mono e digliceridi, fosfolipidi, sfingolipidi, acidi grassi, etc.). Il metodo analitico utilizzato deve essere in grado di estrarre quantitativamente la frazione lipidica senza peraltro alterarne la composizione.

Il metodo analitico di estrazione dovrebbe possedere i seguenti requisiti:

- capacità di inibire l'azione di enzimi come lipasi e fosfolipasi, in modo da evitare fenomeni di degradazione lipolitica della materia grassa durante l'analisi;
- capacità di limitare il più possibile i fenomeni autossidativi e di isomerizzazione dei doppi legami durante l'estrazione (indotti generalmente dall'impiego di elevate temperature e da solventi non idonei);
- capacità di estrarre in modo non selettivo tutti i costituenti della frazione lipidica;
- capacità di separare i lipidi dai componenti a ridotta polarità (interferenti apolari) che potrebbero introdurre errori nelle successive determinazioni.

Tra le differenti matrici alimentari si è deciso di studiare la componente lipidica della carne perché, mentre per il latte esiste già un'ampia letteratura al riguardo, per la carne ed i prodotti carnei gli studi sono ancora limitati.

Esistono due differenti tipologie di metodi utilizzati per l'estrazione della materia grassa nella carne:

- metodo di riferimento (ISO 1443:1973, AOAC 24005 e 960.39, metodo AOAC, 1990), normalmente utilizzato per determinare in modo quantitativo il tenore in materia grassa della carne. Si basa su un'idrolisi acida della matrice (ISO 1443:1973), associata ad un trattamento termico necessario per dissociare i complessi lipidi-proteine, seguita da una estrazione con solventi in miscela (esano ed etere di petrolio, ISO 1443:1973, AOAC 24005 e 960.39) o singoli (etere di petrolio, AOAC, 1990). Il calore sviluppato durante la reazione di idrolisi acida e durante la fase di evaporazione del solvente, può tuttavia indurre fenomeni di idrolisi ed ossidazione di alcune classi lipidiche, in particolare dei

fosfolipidi e degli acidi grassi coniugati, alterando quindi la composizione iniziale della materia grassa.

- metodi alternativi: alcuni di questi, detti “a freddo”, sono normalmente utilizzati per estrarre la materia grassa ove essa debba essere successivamente frazionata e caratterizzata. Si basano sull'utilizzo di una miscela binaria di solventi (cloroformio/metanolo, diclorometano/metanolo, esano/isopropanolo). Nella miscela il solvente più apolare funge da mezzo di estrazione mentre l'alcol provoca la dissociazione delle interazioni lipidi-proteine nella matrice alimentare.

Il passo successivo all'estrazione è quello della derivatizzazione degli acidi grassi che compongono le varie classi lipidiche estratte (trigliceridi, mono e digliceridi, fosfolipidi e acidi grassi liberi) in esteri, generalmente metilici. Questa procedura di transesterificazione può avvenire sia in ambiente basico che in ambiente acido. La reazione è favorita in ambiente basico (KOH, NaOH), ove avviene a temperatura ambiente e in tempi molto brevi. La metilazione in ambiente basico offre il vantaggio di evitare sia i fenomeni di isomerizzazione dei sistemi coniugati con conseguente aumento degli isomeri trans-trans a sfavore dei cis-trans o trans-cis, sia le migrazioni dei doppi legami nonché la formazione di metossi- e idrossi artefatti, tutti processi che decorrono facilmente in ambiente acido (data l'esposizione dei sistemi coniugati a temperature elevate per tempi maggiori).

Le principali tecniche analitiche strumentali utilizzate per la separazione e la successiva quantificazione degli acidi grassi individuali precedentemente metilati sono la Gascromatografia e l'HPLC (cromatografia liquida ad elevate prestazioni).

Sulla base di quanto esposto precedentemente, l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di confrontare, su carne d'agnello, le principali metodologie di estrazione della materia grassa, il metodo di riferimento e diversi metodi alternativi “a freddo”, valutandone le performance relativamente alla capacità quantitativa di estrazione, alla quantità ed alla composizione acidica delle varie classi lipidiche estratte. Inoltre sono state identificate e quantificate le differenti classi fosfolipidiche.

Successivamente le tecniche analitiche utilizzate nei primi due anni di dottorato sono state applicate nella determinazione delle caratteristiche nutrizionali della carne di agnello prodotta da differenti genotipi alimentati con diversi regimi alimentari.

Capitolo 2

Il latte

2.1 Generalità e definizione

Il latte è un alimento di per se quasi completo infatti contiene proteine, lipidi, zuccheri, minerali e vitamine ed è il mezzo con cui la madre trasmette al neonato, nei primi giorni di vita, gli elementi di difesa dell'organismo.

Esistono tre diverse definizioni per il latte:

- ❖ Definizione giuridica (DPR/54/98): “per latte alimentare si intende il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa delle mammelle di animali in buono stato di salute e nutrizione.”
- ❖ Definizione biologica: “il latte è il prodotto della secrezione delle ghiandole mammarie delle femmine dei mammiferi, destinato all'alimentazione dei piccoli.”
- ❖ Definizione chimica: “il latte si presenta come un liquido di colore bianco opalescente, di odore caratteristico e di sapore dolciastro”.

Generalmente con il termine “latte” si intende comunemente quello prodotto da bovini, mentre per gli altri tipi di latte è obbligatorio per legge specificare la specie di origine, per esempio “latte di pecora, capra ecc.”

Il primo fattore che determina la composizione del latte è la specie che lo produce, come è evidenziato in Tabella 2.1.

Tabella 2.1 - Composizione chimica del latte di alcune specie di animali (valori espressi in % in peso).

	Vacca	Bufala	Capra	Pecora
Acqua	87,3	82,2	87,2	81,4
Zuccheri	4,7	4,7	4,5	4,5
Materia grassa	3,8	7,5	3,8	7,4
Proteine (NT*6.38)	3,3	4,8	3,6	5,8
Sali minerali	0,9	0,8	0,9	0,9

Nonostante si presenti come una sostanza liquida omogenea di colore bianco opaco, dal punto di vista chimico fisico il latte è una miscela complessa di componenti di varia natura, che si può suddividere in quattro frazioni (Corradini C., 1995):

- ✓ una frazione acquosa, nella quale si trovano disciolti il lattosio e gli altri zuccheri, i sali minerali, i composti azotati non proteici, gli aminoacidi liberi, le vitamine e altri composti idrosolubili;
- ✓ una frazione globulare, rappresentata da particelle di grasso (MFG, milk fat globule) costituite da trigliceridi e rivestite da una membrana di natura fosfolipidica e proteica (MFGM, milk fat globule membrane);
- ✓ una frazione micellare composta dalle caseine;
- ✓ una frazione colloidale costituita da fosfato tricalcico e dalle α e β lattoglobuline.

Rispetto all'acqua i globuli di grasso nel latte risultano in emulsione, le micelle caseiniche in dispersione pseudo colloidale, le proteine del siero e le particelle lipoproteiche rispettivamente in soluzione e dispersione colloidale.

Il colore bianco del latte è conferito soprattutto dalle micelle di caseina, mentre le sfumature giallastre sono da attribuire alla frazione lipidica.

Il latte vaccino è quello maggiormente utilizzato per uso alimentare diretto. Il suo contenuto proteico si aggira mediamente intorno al 3,2-3,5%. Questo tipo di latte differisce sostanzialmente da quello umano: il primo viene definito caseinoso (80% circa delle proteine è costituito dalle caseine) mentre il secondo è di tipo albuminoso. Il latte delle due specie differisce anche per il contenuto in grasso ed in lattosio. Quello umano contiene una maggiore quantità di lattosio, di acidi grassi insaturi a lunga catena e un minor contenuto totale di sali minerali rispetto al latte vaccino.

Il latte di pecora, dopo quello di vacca, è il più utilizzato per la produzione di prodotti lattiero-caseari, ha un colore leggermente giallognolo ed un sapore e odore caratteristici molto spiccati. Il suo contenuto in grasso è circa il doppio rispetto a quello del latte vaccino (Del Bono,

1997; Corradini, 1995) ed anche il suo contenuto proteico è più elevato: questa caratteristica lo rende particolarmente adatto alla caseificazione.

Il latte di capra è simile a quello vaccino nella sua composizione, si presenta di colore bianco puro in quanto è povero di caroteni, specialmente di β -carotene e tocoferolo (Noè e Feligini, 1999). Paragonato al latte vaccino si presenta più denso e viscoso, a seconda della razza, con un maggior contenuto in grasso, con un sapore leggermente dolciastro per la presenza di acidi grassi liberi: caproico, caprinico e caprilico (C6:0, C8:0 e C10:0, rispettivamente) (Urbertalle, 1986; Borghese *et al.*, 1988) e con un caratteristico odore (ircino) che lo differenzia da qualsiasi altro tipo di latte.

Il latte di bufala, di colore bianco neve, senza odore caratteristico e con un sapore piuttosto delicato, ha un contenuto proteico e lipidico più elevato rispetto a quello vaccino, per tale motivo, così come il latte di altre specie, è utilizzato più che come alimento diretto, quasi esclusivamente nell'industria casearia per la produzione delle mozzarelle.

Il latte si forma principalmente nell'epitelio ghiandolare della ghiandola mammaria; dove il sangue trasporta le sostanze di base (glucosio, acetati, amminoacidi, acidi grassi etc.) che vengono poi trasformate nelle cellule epiteliali (cellule secretorie), attraverso una serie di reazioni chimiche, negli elementi principali del latte. Sono pochissime le sostanze che, trasportate dal sangue, passano direttamente nel latte senza subire processi di trasformazione.

Le ghiandole mammarie delle diverse specie hanno la stessa struttura di base. Queste, con la loro particolare costituzione cellulare, regolano la successione delle varie fasi della sintesi e della secrezione del latte. La costituzione dei caratteristici composti e la relativa organizzazione strutturale avviene nelle cellule secretorie. Queste cellule formano uno strato all'interno degli alveoli della ghiandola mammaria, tutt'intorno al lumen in cui si accumula il latte. I precursori, trasportati dal sangue, entrano attraverso la membrana basale nelle cellule secretorie dalle quali, trasformati nei componenti del latte, sono secreti nel lumen attraverso la membrana. Nel latte vaccino, queste sostanze secrete rappresentano circa 92% del suo estratto secco. Gli altri componenti provengono direttamente dal circolo sanguigno.

Nei ruminanti, l'attività di sintesi della ghiandola mammaria presenta un aspetto particolare dovuto alla produzione nel rumine di importanti quantità di acidi grassi volatili, principalmente acetico e propionico. Questi acidi grassi vengono trasportati dal sangue verso la mammella, dove sono utilizzati. La Figura 2.1 schematizza le principali vie di lattogenesi.

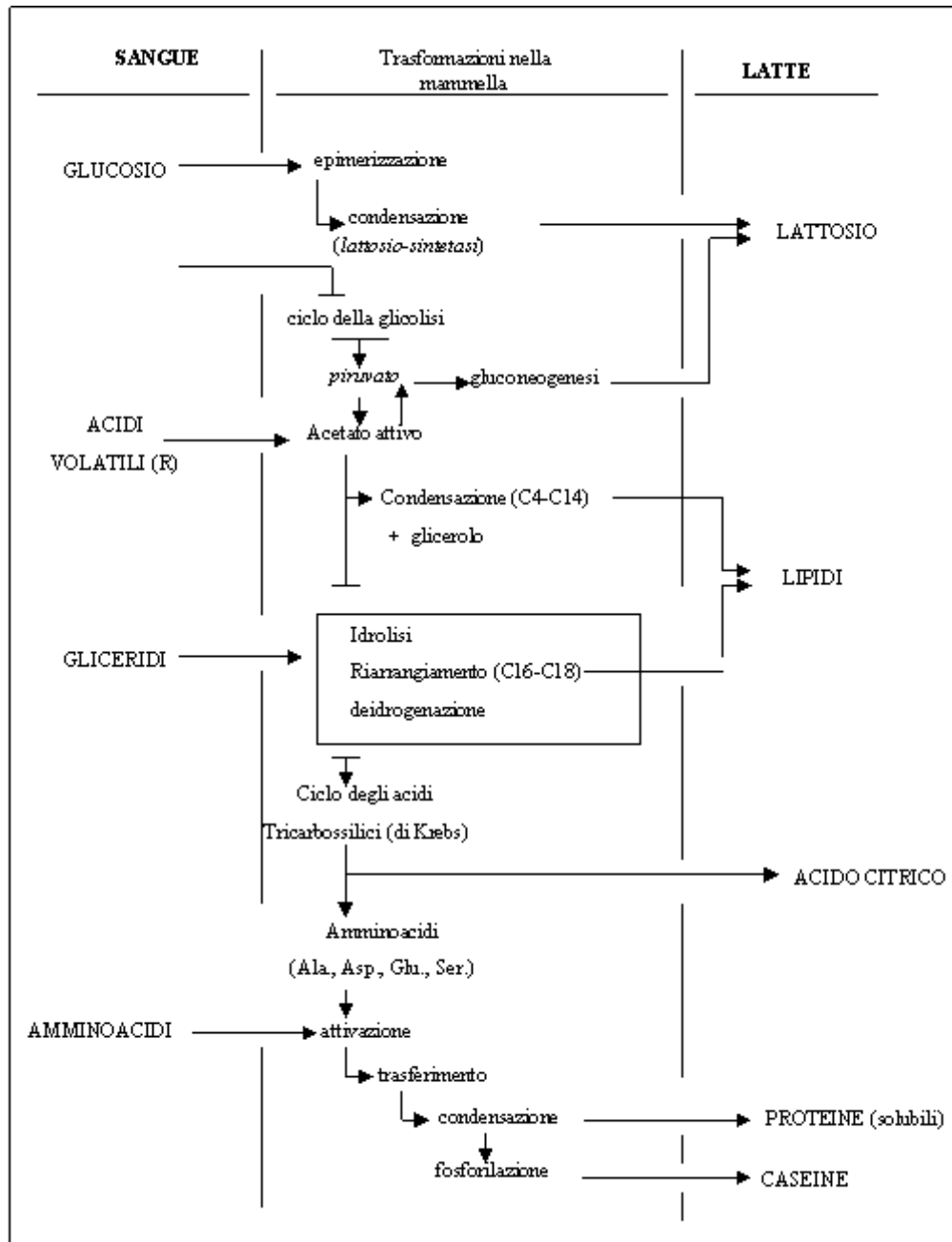


Figura 2.1 Schema della mammaria lattogenesi (R: solo nei ruminanti; Da Scienza del latte Alais, Tecniche Nuove).

2.2 Caratteristiche fisico-chimiche

Il latte è un liquido biologico opalescente, con sapore dolciastro, odore delicato ed a reazione debolmente acida (pH 6.7-6.8).

Nell'ambito della stessa specie, sia le quantità di macro costituenti (acqua, grassi, proteine, zuccheri) che di micro costituenti (sali minerali e vitamine) variano a seconda della razza, dell'individuo, dello stadio di lattazione, dei fattori stagionali e del tipo di alimentazione.

Alla definizione di alcune delle proprietà fisiche del latte (quali la densità, la viscosità, la tensione superficiale) concorrono tutti i costituenti, mentre altre proprietà (quali l'indice di rifrazione, l'abbassamento crioscopico, l'innalzamento ebullioscopico, e la conducibilità elettrica) sono influenzate solo dalle sostanze in soluzione.

Le proprietà tecnologiche del latte, dipendono più che dalla distribuzione percentuale dei vari componenti, dalle aggregazioni strutturali, mediante le quali si stabiliscono rapporti di emulsione, dispersione, o soluzione colloidale con la fase disperdente acquosa, rappresentata da una soluzione di zuccheri e sali minerali.

Tra i componenti in soluzione gli ioni dei sali minerali giocano un ruolo importante nello stabilizzare le strutture organizzate (globuli di grasso e micelle caseiniche) mediante reazioni all'equilibrio, tra la fase colloidale e la soluzione. Alcune delle proprietà e delle caratteristiche degli elementi strutturali del latte sono riportate in Tabella 2.2.

Tabella 2.2 - Alcune proprietà dei principali elementi strutturali del latte (da: Mulder e Walstra, 1974).

	Latte		
	Globuli di grasso	Plasma Micelle caseiniche	Siero Proteine globulari
Componenti principali	Grasso	Caseina, acqua, sali	Proteine del siero
Stato fisico	Emulsione	Sospensione pseudocolloidale	Soluzione colloidale
Diametro particelle	0,1 – 10 µm	10 – 300 nm	3 – 6 nm
Densità a 20°C (g/ml)	0,92	1,11	1,34
Separabile con	Scrematrice	Centrifuga ad alta velocità	Filtrazione su gel
Flocculazione	Per aggregazione	Con acidi o coagulanti	Col calore

2.3 Caratteristiche chimiche dei principali componenti del latte

2.3.1 Acqua

Nel latte (vaccino) l'acqua è mediamente presente per l'87%. Questa percentuale varia sensibilmente secondo la specie animale con valori che vanno dal 32% (foca grigia) all'89% (orso bruno, cavallo).

2.3.2 Proteine

Tra i costituenti principali del latte, le sostanze azotate rappresentano la parte più complessa ed eterogenea, con un'importanza fondamentale dal punto di vista:

- nutrizionale, dato il loro valore alimentare;
- biologico, essendo alcune proteine dotate di attività enzimatica o di proprietà immunologiche;
- tecnologico, per le peculiari proprietà funzionali.

Esse sono costituite per il 95% da proteine, e, per il rimanente 5% da sostanze non proteiche (amminoacidi liberi, nucleotidi, urea, ammoniaca, creatina, creatinina, ecc.) (Tabella 2.3).

Le sostanze azotate sono numerose e possono essere essenzialmente suddivise in 4 gruppi:

- 1) la *caseina intera*: è un aggregato di fosfoproteine, alcune delle quali glicosilate, presenti esclusivamente nel latte; precipita in seguito ad acidificazione a pH 4,6; si può separare, oltre che per acidificazione, anche per ultracentrifugazione oppure per coagulazione enzimatica;
- 2) le *proteine del siero*: si ritrovano sotto forma di miscela di diverse proteine solubili, che non risultano precipitabili né con enzimi né con acidi, a temperatura ambiente; alcune di esse sono sensibili al calore;
- 3) i *proteoso peptoni*: sostanze glicoproteiche di grandezza intermedia tra quella delle proteine e quella dei peptidi; sono considerati proteine minori;
- 4) le *sostanze azotate non proteiche*: rappresentano un gruppo a parte, costituito da sostanze di diversa natura chimica, dializzabili e con peso molecolare inferiore a 500 (amminoacidi liberi, urea, creatina, nucleotidi ecc.).

La maggior parte delle proteine è sintetizzata nelle cellule della ghiandola mammaria utilizzando, come precursori, gli amminoacidi presenti nel sangue. Alcune di queste proteine, entro lo stesso apparato mammario, subiscono una lisi ad opera della plasmina (proteasi alcalina nativa). Altre proteine (dal 3 al 4% della frazione proteica totale), derivano senza subire alcuna modificazione dal siero plasmatico; questa frazione è più elevata nel colostro, che è il secreto dei

primissimi giorni della lattazione. Contribuiscono alla frazione delle proteine presenti nel siero di latte anche frammenti della membrana apicale da cui deriva la membrana dei globuli del grasso.

Le proteine sintetizzate a livello della ghiandola mammaria, sono le caseine, la β -lattoglobulina e l' α -lattalbumina. Sono presenti nel latte di tutte le specie sia pure con diversa struttura primaria e una diversa distribuzione.

Tutte le proteine sintetizzate dalla ghiandola mammaria sono caratterizzate da polimorfismo genetico, ossia dalla presenza simultanea e regolare in una popolazione, di due o più varianti genotipiche. Quando nel latte vaccino è presente una sola variante di una certa proteina, la vacca è per quel componente “individuo omozigote”; invece, “individui eterozigoti” sono quelli che presentano due varianti (o alleli) della stessa proteina. Gli alleli sono le forme alternative di un gene che vengono indicati con la stessa lettera (es. AA) se sono dello stesso tipo o da due lettere diverse (es. AB) se derivate da geni diversi.

Le varianti genetiche vengono determinate, generalmente, per via elettroforetica, in quanto la sostituzione, ad esempio, di un residuo neutro della catena amminoacidica con un residuo polare (o viceversa) influisce sulla mobilità elettroforetica e permette di vedere se nel tracciato una stessa proteina è rappresentata da una o due bande.

Tabella 2.3 - Sostanze azotate del latte (vaccino), provenienza e distribuzione percentuale indicativa dell'azoto (NT = 100).

Sostanza	Provenienza	(N sostanza/ N totale) %
Caseina α_1	Sintesi mammaria	29
Caseina α_2		8
Caseina β		28
Caseina k		10
β -lattoglobulina		10
α -lattalbumina		4
Caseine γ	Lisi post secretoria	2
Proteoso peptoni 5-8I-8v	della caseina β	1
Caseina λ	Lisi post secretoria della caseina α	
Siero albumina	Senza modificazioni del sangue	≤ 1
Immunoglobuline		2
Lattoferrina		
Cerulo plasmina		
enzimi		
Proteoso peptone 3	Simile a proteine della membrana dei globuli di grasso	≤ 1
Sostanze azotate non proteiche		4-5

2.3.2.1 Caseina

La caseina è la frazione proteica del latte che, a 20°C, precipita per acidificazione a pH 4,6. Il suo contenuto in azoto concorre all'azoto totale del latte per circa il 76-78% e, da un punto di vista proteico, è costituita da quattro componenti principali: le caseine α_{s1} , α_{s2} , β e K e da altri componenti da essi derivati, le caseine γ e le caseine λ .

Di ognuna di esse sono note un certo numero di varianti genetiche. Sono proteine molto peculiari e si ritrovano nel latte sotto forma di micelle, cioè complessi macromolecolari che inglobano sali minerali allo stato colloidale (fosfato di Ca, Mg, citrati).

Grazie alla loro organizzazione micellare, sono facilmente isolabili per centrifugazione, Notevole anche il contenuto in metionina e prolina (nella β -caseina).

Le caseine α_s , β , K (presenti rispettivamente per il 46, 33 ed 11%) sono sintetizzate direttamente dalla ghiandola mammaria. La γ -caseina (~5%) invece si forma in seguito alla degradazione proteolitica della β -caseina dalla parte C-terminale per azione di proteasi presenti nel latte. Le caseine α_s , β , e K differiscono tra loro, oltre che per la struttura primaria, per una maggiore

o minore idrofobicità della catena e per la presenza - più o meno marcata - di strutture secondarie e di gruppi fosforici, conseguenze di fosforilazioni a livello dei residui di treonina e di serina.

Le caseine presentano una scarsa organizzazione in strutture secondarie e terziarie e possono, pertanto, essere considerate delle proteine a struttura aperta a causa della loro linearità. Questo le rende più suscettibili all'azione delle proteasi rispetto alle proteine del siero. In particolare, la forte tendenza della caseina K ad avere tratti della catena peptidica senza alcuna rotazione elicoidale in prossimità del legame 105-106 Phe - Met, sensibile alla chimasi, favorirebbe il formarsi di legami idrogeno con i siti attivi dell'enzima con il complesso attivato.

Il 95% delle caseine è presente nel latte sotto forma di particelle colloidali note come micelle. Le micelle caseiniche contengono circa il 94% di proteine e il 6% di sostanze a basso peso molecolare come ioni calcio, magnesio, fosfato e citrato. Sono visibili nel latte attraverso il microscopio elettronico, hanno una forma sferica, un diametro che va dai 50 ai 500 nm ed una massa compresa tra 10^6 e 10^9 Da. A causa della loro dispersione colloidale, provocano dei fenomeni di scattering della luce conferendo il tipico colore bianco al latte, che viene perso nel caso in cui si provochi la distruzione delle micelle, per esempio allontanando il fosfato di calcio, aumentando il pH o aggiungendo urea o sodiododecilsolfato (SDS).

L'osservazione al microscopio ha inoltre evidenziato che le micelle risultano composte da un gran numero di sottounità con diametro di circa 12-20 nm che prendono il nome di submicelle.

Le sottounità delle singole caseine possono unirsi tra loro mediante legami di natura idrofoba, questo in particolare per i componenti più rappresentati quali le caseine α_{s1} , β e k , grazie alla natura anfifilica delle loro molecole. Le parti idrofile e polari contribuirebbero, per il livello di solvatazione raggiunto, a definire l'individualità delle strutture submicellari.

Secondo un modello proposto da Schmidt e Payens nel 1976, il diametro delle submicelle sarebbe, determinato, appunto, dal numero dei gruppi idrofili delle caseine α_{s1} , β e K , sufficienti a inglobare la parte centrale della particella in cui sarebbero prevalenti le parti idrofobiche delle stesse proteine. Il ruolo di cementare le submicelle tra loro è svolto dal fosfato di calcio colloidale, che è suddiviso in modo da formare una nuvola negli interspazi tra le stesse submicelle. Il fosfato tricalcico presente in questa fase colloidale può essere legato alle caseine via fosfoserina, tuttavia l'associazione potrebbe venire mediata anche da ioni calcio che, assorbiti sul fosfato di calcio colloidale, darebbero a questi una carica positiva.

La combinazione con gli ioni calcio riducono le cariche negative della molecola rendendo possibile l'associazione delle caseine; quando però la concentrazione di ioni calcio disponibili è troppo elevata, le associazioni proteiche aumentano di dimensioni, fino a costituire particelle troppo grosse per rimanere in soluzione colloidale.

L'associazione tra le caseine α_{s1} , β e κ può avvenire anche in assenza di ioni calcio mediante legami di natura idrofobica, grazie alla particolare distribuzione delle cariche e dei gruppi idrofobici e idrofilici nella molecola di queste proteine.

Vari modelli sulla struttura delle micelle caseiniche sono stati proposti e corretti negli ultimi 40 anni. Il modello attualmente più soddisfacente è quello proposto da Schimds nel 1980. Secondo tale modello (Figura 2.2) le frazioni proteiche α_{s1} , α_{s2} e β caseine, sarebbero associate in subunità sferiche con la κ -caseina, disposta in modo da impartire carattere anfifilo alla superficie micellare.

La κ -caseina infatti, dispone l'estremità idrofila all'esterno, assumendo così la funzione di colloide protettore, uno strato polare che riunisce le parti più fortemente cariche ricche di gruppi fosforici (Del Prato, 2001). La parte centrale della micella caseinica, invece, è idrofoba, perché si dispongono le parti polari delle caseine. Le micelle, come le lipoproteine ed i fosfolipidi, trattengono acqua attraverso gli zuccheri della κ -caseina che, avvolge la micella stessa, rendendo l'emulsione delle micelle caseiniche nel plasma latteo stabile.

Tuttavia occorre un elevatissimo grado di idratazione per permettere alle micelle di restare in dispersione e non interagire, tale condizione è assicurata finché le micelle si trovano in un mezzo con valore di pH distante dal loro punto isoelettrico, fattore determinante della flocculazione.

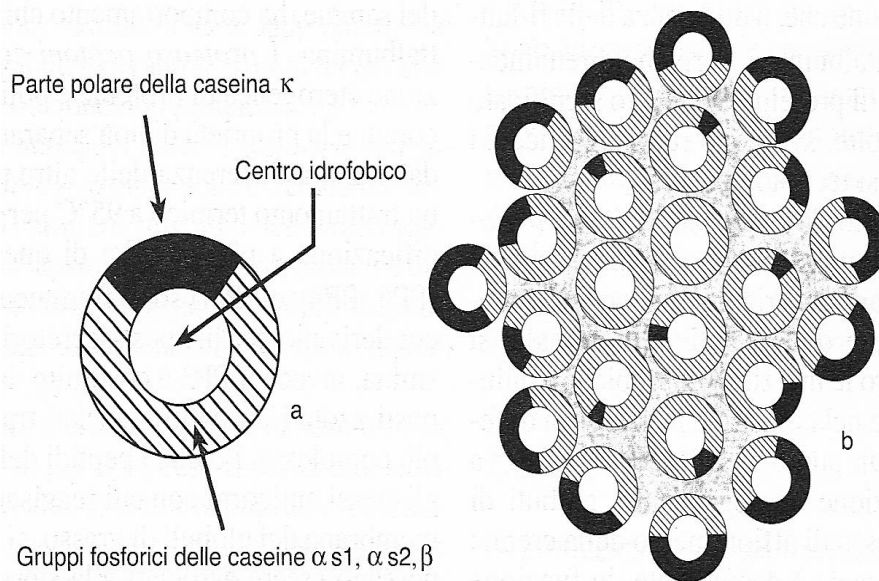


Figura 2.2 - Modello di una submicella (a) e di una micella caseinica composta di submicelle e fosfato di calcio colloidale (b), (modello di Schmidt, 1980).

2.3.2.2 Le proteine del siero

Il latte contiene lo 0,5-0,7% di sieroproteine, che rappresentano circa il 17-20% delle sostanze azotate del latte; una proporzione maggiore di proteine del siero si ritrova nel latte umano dove rappresentano circa il 50%.

Le sieroproteine sono proteine globulari, con peso molecolare compreso tra $1,6 \times 10^3$ e 5×10^6 Da, notevolmente inferiore rispetto a quello della caseina. A differenza della caseina, che ha struttura lassa e si ritrova sotto forma di micelle in dispersione colloidale, le sieroproteine formano delle dispersioni colloidali più fini e stabili, caratterizzate da una struttura compatta che non favorisce la facile introduzione di ioni ed enzimi. Il rapporto sieroproteine/caseina nel latte vaccino è di 0,2. Le proteine del siero maggiormente rappresentate nel latte sono la β -lattoglobulina (51% delle sieroproteine totali) e l' α -lattalbumina (25%), derivanti da sintesi mammaria.

Tra le proteine del siero vi sono inoltre, quelle derivanti direttamente dal sangue. Si tratta di proteine di elevato significato biologico che, a volte, svolgono ruoli significativi anche in molti processi tecnologici

Importanti da questo punto di vista sono le immunoglobuline, presenti nel latte nelle tre classi immunologiche Ig G, Ig A e Ig M in quantità variabili a seconda del periodo di lattazione e dello

stato di salute dell'animale. Si tratta di anticorpi contro le infezioni microbiche e quindi sono più concentrate nel colostro e in presenza di fenomeni mastitici. Da un punto di vista tecnologico va segnalata la loro funzione aggregante dei globuli di grasso durante il processo di affioramento della crema, in questa azione l'efficacia è decrescente, in funzione del peso molecolare, nell'ordine $Ig M > Ig A > Ig G$ (pesi molecolari rispettivamente di 1000000, 400000 e 150000 circa).

La siero albumina è la BSA (bovine serum albumin) del sangue; ha comportamento chimico simile all' α -lattalbumina.

2.3.2.3 I proteoso peptoni

I proteoso peptoni costituiscono una frazione eterogenea di proteine e polipeptidi che hanno in comune la proprietà di non separarsi per precipitazione dal siero, a differenza delle altre proteine sieriche, con un trattamento termico a 95°C per 20' e successiva acidificazione a pH 4,7.

Nel latte sono inoltre presenti, in quantità molto piccole, proteine che fissano specificatamente ferro e rame trasportandoli verso i ricettori nei diversi tessuti. Legano il ferro la lattoferrina (che trasporta questo elemento nel sangue) e la transferrina, invece la cerulo plasmina fissa specificatamente il rame.

2.3.2.4 Le sostanze azotate non proteiche

Questo gruppo di composti azotati comprende sostanze diverse da un punto di vista chimico, ma che presentano la caratteristica comune di attraversare facilmente le membrane di dialisi e di non precipitare in presenza di acido tricloacetico al 12%.

L'azoto non proteico (NPN) rappresenta dal 3% all'8% dell'azoto totale del latte; questo ampio intervallo di variazione si spiega considerando che la sua quantità e composizione varia con la stagione, lo stadio del ciclo di lattazione, ma soprattutto con l'alimentazione. L'azoto non proteico aumenta anche per effetto dei trattamenti termici che determinano la denaturazione delle proteine. Tra i diversi costituenti azotati non proteici, il più abbondante è l'urea, la cui quantità è in stretta correlazione con la quantità nel sangue e varia fortemente con l'alimentazione. L'urea svolge una funzione tecnologica importante, essendo un fattore di stabilizzazione delle micelle proteiche durante il riscaldamento.

2.3.3 Lipidi

I lipidi del latte sono organizzati in globuli. Questi sono associazioni tra trigliceridi e sostanze della membrana cui vanno ascritte proprietà di individualità, stabilità e capacità di aggregarsi che regolano il comportamento nel latte della fase grassa; queste proprietà hanno importanza anche in alcuni processi tecnologici. I globuli hanno diametro variabile tra 0,1 e oltre 10 μm , e in funzione delle loro dimensioni, vengono considerati:

- piccoli, quelli con diametro inferiore ai 3 μm ;
- medi, quelli con diametro compreso tra 4 e 9 μm ;
- grossi, quelli con diametro superiore a 10 μm , fino anche a 20-22 μm .

I globuli di piccole dimensioni costituiscono l'80% dei globuli, ma poiché il 94% del grasso è contenuto in globuli medi, ai fini tecnologici si considera che il diametro medio dei globuli di grasso sia di circa 6 μm .

I globuli di grasso si formano nelle cellule dell'epitelio secretorio della ghiandola mammaria ove, nel reticolo endoplasmatico avviene la sintesi dei trigliceridi che, nel citoplasma, si riuniscono in piccole gocce. Queste goccioline di lipidi citoplasmatici sono i reali precursori dei globuli di grasso del latte, poiché, nella migrazione verso il polo apicale della cellula secretrice, si ricoprono gradualmente della membrana plasmatica della cellula. La maggior parte della sostanza grassa viene sintetizzata utilizzando gli acidi grassi prodotti in situ dagli acidi grassi volatili provenienti dal rumine, mentre il resto è sintetizzato a partire dagli acidi grassi che si trovano nel sangue.

La secrezione del grasso nel latte è completa solo quando la goccia lipidica, completamente avvolta nella membrana apicale, è espulsa nel lumen dell'alveolo della ghiandola mammaria. In Figura 2.3 è illustrato il meccanismo di formazione del globulo proposta da Larson. La formazione e la stabilità del globulo di grasso sono facilitate dalla presenza di una glicoproteina, la butirofilina, legata ai fosfolipidi che tende a legarsi anche con un'altra proteina, la xantinaossidasi, per formare un complesso che tiene unita la doppia membrana alla goccia lipidica. Tra la superficie esterna della goccia lipidica e la membrana citoplasmatica vi è uno spazio contenente materiale ad alta densità elettronica. Per quanto concerne l'interno del globulo, i trigliceridi, che rappresentano la maggior parte dei lipidi del latte, tendono a stratificarsi: nella parte più interna si accumulano i trigliceridi a basso punto di fusione, mentre nella zona sottostante la membrana prevalgono quelli ad alto punto di fusione.

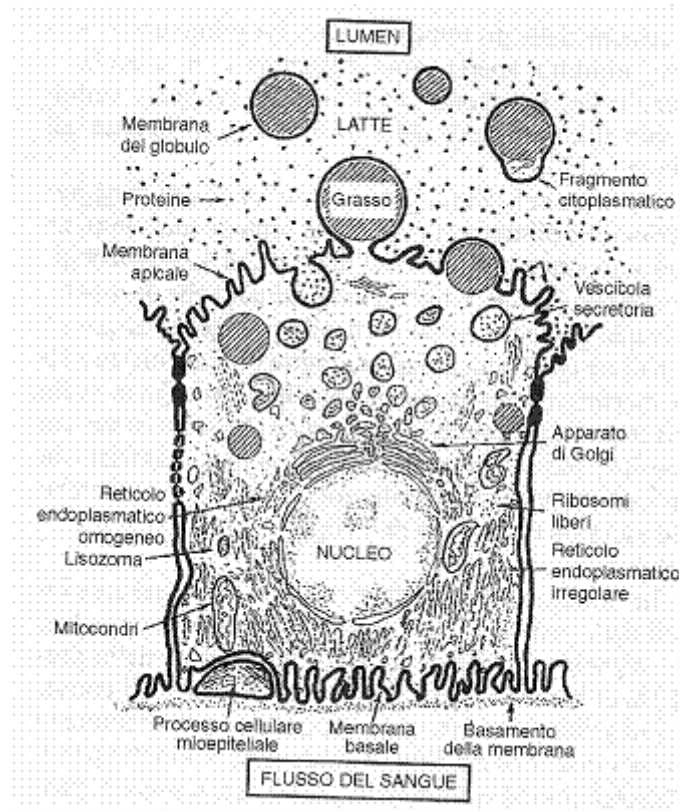


Figura 2.3 - Rappresentazione schematica di una cellula dell'epitelio secretorio di una ghiandola mammaria (Larson, 1979).

Immediatamente dopo la mungitura inizia un processo fisico che porta all'affioramento dei globuli lipidici (il loro peso specifico è, infatti, inferiore a quello dell'acqua) ed alla formazione dello strato superficiale di crema.

Il grasso del latte è la miscela lipidica più complessa presente in natura, essa è costituita per circa il 98-99% da gliceridi e per circa l'1% da fosfolipidi, steroli esterificati e da una frazione insaponificabile che include le vitamine liposolubili.

In essa si riconoscono centinaia di acidi grassi diversi, solo nel latte bovino ne sono stati identificati circa 400. Tutte le categorie sono rappresentate: acidi grassi a corta catena, media, lunga, lineare, ramificata e ciclica, a numero pari e a numero dispari di atomi di carbonio, saturi ed insaturi, cis e trans, con eterofunzionalità quali gruppi ossidrilici e carbonilici. Tra essi, tuttavia solo poco più di una decina sono presenti in percentuali superiori all'1%.

L'acido butirrico (C4:0), caproico (C6:0), caprilico (C8:0) e caprinico (C10:0) sono caratteristici del latte dei ruminanti. Essi sono composti relativamente volatili ed hanno un odore

tipico e ben percettibile quando si liberano in seguito ai processi lipolitici (idrolisi enzimatica nel latte o nei formaggi durante la loro maturazione).

Gli acidi grassi che compongono i trigliceridi derivano da due fonti principali: dai lipidi del plasma (circa il 60%) e da sintesi *ex novo* a livello della ghiandola mammaria (40%).

In Tabella 2.4 è riportata la composizione acidica del grasso del latte delle quattro specie ruminanti di principale interesse zootecnico.

Tabella 2.4 - Composizione acidica del grasso del latte (% sugli acidi grassi totali, AGT) (Addis *et al.*, 2005; Naitana *et al.*, 1992; Palmquist *et al.*, 1993).

Acidi grassi (FA)	Pecora	Vacca	Capra	Bufala
Corta catena (SCFA)				
C 4:0 – butirrico	4,48	3,32	3,00	3,6
C 6:0 – caproico	2,36	2,34	2,00	1,6
C 8:0 – caprilico	1,69	1,19	3,00	1,1
C 10:0 – caprinico	8,37	2,81	9,00	1,9
Media catena (MCFA)				
C 12:0 - laurico	4,02	3,39	5,00	2,0
C 14:0 – miristico	10,06	11,41	11,00	8,7
C 16:0 – palmitico	22,81	29,53	26,00	30,4
C 16:1 - palmitoleico	0,68	3,38	-	3,4
Lunga catena (LCFA)				
C 18:0 - stearico	10,84	9,84	6,00	10,1
C 18:1 - oleico	23,67	27,39	20,00	28,7
C 18:2 – linoleico	2,23	2,00	3,10	2,5
C18:3 – linolenico	1,99	1,10	1,00	2,5
Insaturi / saturi	0,48	0,55	0,45	0,54

2.3.4 Zuccheri

La quasi totalità degli zuccheri del latte è costituita dal lattosio, che è il maggior componente solubile avente un ruolo fondamentale nel regolare l'equilibrio osmotico con il sangue durante la

secrezione latte. Il lattosio è un dissaccaride costituito da glucosio e galattosio. Nel latte è presente nelle forme anidra e idrata di due isomeri α e β , in equilibrio tra loro. Esso deriva da glucosio ematico e in misura minore dagli amminoacidi glucogenetici non essenziali.

Il lattosio è indispensabile per molte fermentazioni che si sviluppano nel latte, tra queste vi è la fermentazione lattica, utilizzata nella preparazione di molti derivati nei quali è fondamentale il ruolo dei batteri lattici, sia omo che eterofermentanti.

Nella dieta il lattosio, importante apportatore di carboidrati nell'alimentazione dei lattanti delle specie lattifere, può essere un fattore limitante per persone o intere popolazioni che denunciano intolleranza verso questo zucchero dovuta a carenza, nel corredo enzimatico, di enzimi del gruppo delle lattasi. Nell'industria il lattosio viene utilizzato per la preparazione di prodotti dolciari e farmaceutici, per la sua capacità di adsorbire coloranti e pigmenti e come eccipiente; serve anche ad umanizzare il latte vaccino e viene impiegato come substrato fermentativo poiché facilita la fermentazione.

Nel latte vi sono inoltre componenti zuccherini minori che possono però svolgere un ruolo importante come, attraverso le glicoproteine, nello stabilizzare gli elementi strutturali (micelle caseiniche, globuli di grasso). Nelle glicoproteine i glucidi si trovano combinati nelle sequenze amminoacidiche. Le glicoproteine si trovano anche nella membrana dei globuli di grasso.

Nel latte vi sono anche piccole quantità di glucosio e galattosio che derivano da lisi acida o enzimatica del lattosio.

2.3.5 Enzimi

Il latte contiene numerosi enzimi, alcuni sono concentrati sullo strato superficiale dei globuli grassi e passano poi nella crema (aldeido-riduttasi, fosfatasi); altri precipitano con la caseina a pH 4,6 (proteasi, catalasi, lipasi, ecc.). Nel caso delle malattie della mammella, alcuni enzimi diventano più abbondanti (catalasi) o compaiono (A-esterasi) nel latte. La quantità di enzimi è molto scarsa nel latte, ma l'attività di questi catalizzatori biochimici è tale che essi provocano delle modificazioni notevoli anche a concentrazione molto basse.

La loro attività dipende strettamente dal pH e dalla temperatura. Sono molto sensibili ad un aumento della temperatura; la loro distruzione è generalmente rapida al di sopra di 70°C; vi sono tuttavia gli enzimi che non vengono distrutti che a temperature superiori ai 90°C, come il lisozima e la ribonucleasi.

Gli enzimi presenti nel latte possono avere differente origine, ma solo quelli definiti endogeni possono essere considerati veri e propri componenti del latte. Gli enzimi endogeni sono circa 100, ma solo 60 tra questi sono stati isolati e caratterizzati. Essi possono provenire da tre distinte fonti:

- dal sangue, attraverso la membrana della cellula mammaria;
- dal citoplasma delle cellule secretorie. Alcuni enzimi sono inglobati all'interno dei globuli di grasso al momento della loro formazione,
- direttamente dalla membrana dei globuli di grasso, il cui strato esterno deriva dalla membrana apicale delle cellule secretorie. Questa è probabilmente la fonte principale degli enzimi endogeni del latte.

Il latte non contiene i substrati necessari per tutti gli enzimi presenti, e molti di loro sono inattivi a causa delle condizioni sfavorevoli, ad esempio di temperatura o di pH. Da un punto di vista tecnologico la presenza degli enzimi è utile, in quanto possono essere implicati:

- nel deterioramento (lipasi, proteinasi o fosfatasi acida) o conservazione (sulfidril ossidasi, superossidismutasi) della qualità del latte;
- come indici dei trattamenti termici subiti dal latte: fosfatasi alcalina, γ -glutamilttransferasi e lattoperossidasi;
- come indici di infezioni mastitiche, causa l'aumento di enzimi di origine cellulare, nella fattispecie la catalasi o fosfatasi acida;
- nell'attività antimicrobica, come ad esempio per lisozima e lattoperossidasi;
- come fonte commerciale di enzimi come ribonucleasi e lattoperossidasi.

Gli enzimi sono raggruppati in sei diverse classi, a seconda della loro attività catalitica:

- EC 1 - Ossidoreduttasi: catalizzano reazioni di ossidoriduzione;
- EC 2 - Transferasi: catalizzano il trasferimento di un gruppo funzionale;
- EC 3 - Idrolasi: catalizzano l'idrolisi di vari tipi di legame chimico;
- EC 4 - Liasi: catalizzano la rottura di vari legami attraverso metodi alternativi all'idrolisi o all'ossidoriduzione;
- EC 5 - Isomerasi: catalizzano le isomerizzazioni all'interno di una molecola;
- EC 6 - Ligasi: catalizzano la formazione di legami covalenti tra due molecole.

La maggior parte degli enzimi presenti nel latte appartiene alle prime tre classi, mentre in esso non sono stati ancora individuati enzimi appartenenti all'ultima classe: le ligasi.

2.3.6 Vitamine

Le vitamine, sono piccole molecole di struttura varia e hanno un rapporto stretto con gli enzimi perché esercitano per la maggior parte, il ruolo di coenzimi, essendo associate ad un apoenzima proteico nell'attività biocatalitica. E' noto che le vitamine sono necessarie al normale funzionamento dei processi vitali e che l'organismo è incapace di sintetizzarle. Gli alimenti

debbono apportare una quantità sufficiente, sempre molto bassa, di vitamine, secondo l'età dell'individuo.

Benché tutte le vitamine siano presenti nel latte crudo, tra quelle liposolubili hanno importanza significativa solo la vitamina A e la vitamina E e tra quelle idrosolubili le vitamine B₁, B₂, B₁₂ e l'acido pantotenico.

Le vitamine liposolubili sono associate ai grassi e nei globuli, mentre quelle idrosolubili sono presenti in soluzione e nel siero. Il patrimonio vitaminico del latte subisce riduzioni anche pesanti in seguito ai processi di risanamento e di conservazione.

2.3.7 Sali minerali

Il contenuto in sali minerali nel latte bovino è di circa 1g/100ml, corrispondente ad un valore medio dello 0,6-0,7% se espresso come ceneri.

I componenti minerali si possono suddividere in due gruppi: nel primo sono quelli che influiscono significativamente nella composizione del latte (Ca, Mg, P, Na, K, Cl, Z, ac. Citrico); nel secondo i cosiddetti oligoelementi in quanto presenti in piccole quantità. Questi elementi, tuttavia, assumono un'importanza non trascurabile in quanto contribuiscono alla conservazione di particolari funzioni e proprietà essendo componenti di alcuni enzimi (Cu, Fe, Mn, Mo, Zn), e vitamine (Co), o agiscono come catalizzatori, come è il caso di Cu e Fe, nel processo di ossidazione delle sostanze grasse.

Capitolo 3

La carne

3.1 Generalità e definizione

Fin dai tempi antichi la carne occupa un posto importante tra gli alimenti di maggior valore nutritivo contribuendo in maniera determinante allo sviluppo fisico dell'organismo grazie al suo apporto in termini di proteine, lipidi, carboidrati, sali minerali, vitamine e acqua. La carne è il prodotto di complesse modificazioni biochimiche che si realizzano a carico del tessuto muscolare dopo la morte dell'animale e che determinano la trasformazione del muscolo in carne. Le modalità con cui tali processi si instaurano e si realizzano dipendono sia dallo stato fisiologico dell'animale, al momento della macellazione, sia dalle condizioni di processo che vengono impiegate nelle fasi di macellazione degli animali, lavorazione, trasformazione e conservazione delle carni.

La carne è costituita soprattutto da muscolo striato, da tessuto adiposo e connettivo. Il tessuto muscolare striato è composto da fibre grossolane a loro volta costituite da fibre più piccole che sono i risultati dell'aggregazione di sottilissime fibrille, le miofibrille. La carne è tanto più tenera e digeribile quanto più corte sono queste fibre. Il tessuto adiposo contenuto nella carne è costituito da grassi neutri, i trigliceridi, e da grassi più complessi. Il tessuto connettivo è formato essenzialmente da collagene ed elastina ed è di colore biancastro. Il colore della carne è, inoltre, influenzato dal contenuto di mioglobina, una proteina contenente ferro che è abbastanza simile all'emoglobina contenuta nei globuli rossi. Negli animali giovani essa è contenuta in scarse quantità; da ciò deriva il colore roseo o bianco della loro carne. Il 75% delle carni magre è costituito da acqua; il resto sono proteine di alto valore biologico per la presenza di notevoli quantità di aminoacidi, essenziali costituenti delle proteine che devono essere assunti attraverso gli alimenti in quanto non sono prodotti nell'organismo (solo la fenilalanina, che è un aminoacido essenziale, è scarsamente rappresentata).

Per quanto riguarda il contenuto in lipidi (grassi) la carne ne contiene in media il 3% variando da un minimo dello 0,5% ad un massimo del 7%.

3.2 Tessuto muscolare

Esistono tre differenti tipologie di tessuto muscolare:

- il muscolo cardiaco;
- il muscolo liscio;
- il muscolo scheletrico.

3.2.1 Muscolo cardiaco

La struttura del muscolo cardiaco è simile a quella del muscolo scheletrico con una maggiore quantità di mitocondri e sarcoplasma.

3.2.2 Muscolo liscio

Le cellule muscolari lisce si distinguono per i loro nuclei posizionati centralmente e con miofibrille otticamente uniformi che non hanno striature incrociate. I muscoli lisci si trovano nei rivestimenti delle mucose, nelle ghiandole linfatiche, nell'epidermide e nel tratto intestinale. Le fibre muscolari lisce sono utili nello studio dei prodotti carnei, in genere per l'individuazione della faringe (esofago), dello stomaco o per le frattaglie di vitello (cuore, fegato e polmoni).

3.2.3 Muscolo Scheletrico

Il muscolo scheletrico (o striato), responsabile dei movimenti dell'impalcatura scheletrica, è delle tre differenti tipologie di tessuto muscolare (scheletrico, cardiaco e liscio), l'unico che riveste interesse dal punto di vista alimentare, costituendo il 40% circa della massa corporea.

Dal punto di vista strutturale, il muscolo scheletrico (Figura 3.1) è avvolto da una guaina di tessuto connettivo, chiamata epimisio, che si estende fino ai tendini. All'interno dell'epimisio origina il perimisio che ingloba i fasci di fibre muscolari, i vasi sanguigni e i nervi maggiori. Più in profondità rispetto al perimisio prende forma una fitta rete connettivale, detta endomisio, che circonda ogni singola fibra muscolare e contiene i capillari sanguigni e le giunzioni nervose, essenziali per la funzionalità del muscolo. Alle due estremità del muscolo, epimisio, perimisio ed endomisio si fondono a formare un'unica struttura che costituisce il tendine, grazie al quale il muscolo si connette all'apparato scheletrico.

La membrana che circonda ciascuna fibra muscolare è detta sarcolemma (spessore ca. 75 Nm). Essa è costituita da tre strati: l'endomysio, uno strato intermedio amorfo e una membrana plasmatica interna.

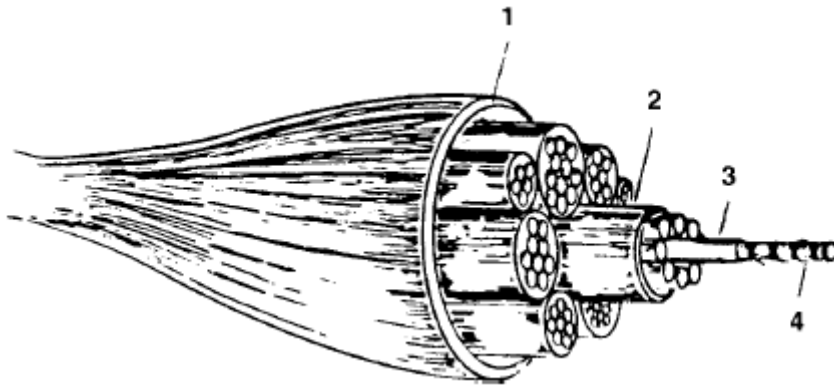


Figura 3.1 - Struttura del muscolo scheletrico (secondo Gault, 1992). 1. Epimisio , 2. perimisio, 3. endomisio, 4. fibre muscolari.

Le fibre muscolari sono cellule polinucleari. I nuclei sono circondati dal sarcoplasma e da altri elementi cellulari (mitocondri, reticolo sarcoplasmatico, lisosomi). In condizioni aerobiche, la maggior parte dell'energia cellulare è prodotta in forma di ATP nei mitocondri. Le fibre muscolari o cellule muscolari, hanno un diametro da 0,01 a 0,1mm e possono raggiungere una lunghezza di 150 mm e più.

Le componenti principali delle cellule muscolari sono le miofibrille, ciascuna delle quali ha un diametro di 1-2 micron.

Al microscopio polarizzatore il tessuto muscolare scheletrico appare come un alternarsi di bande chiare e scure che rappresentano le unità funzionali dei muscoli: i sarcomeri, elementi contrattili che si riuniscono per costituire sottili filamenti (miofibrille). Ogni miofibrilla risulta costituita da un numero molto alto di sarcomeri disposti in serie. In ciascun sarcomero si distinguono due zone definite rispettivamente Banda A (Anisotropa), otticamente più densa e di colorazione scura, e Banda I (Isotropa), otticamente meno densa e chiara.

Inoltre sono presenti due ulteriori strutture proteiche, denominate linea Z e linea M, costituite da proteine con il compito di mantenere *in loco* i filamenti spessi e sottili dei sarcomeri.

All'interno di ogni sarcomero sono distinguibili due tipologie di filamenti: i filamenti spessi, formati da molecole proteiche di miosina, e i filamenti sottili, costituiti da actina. Altre proteine minori sono inoltre associate ai filamenti spessi e sottili in diversi punti del sarcomero, soprattutto in corrispondenza delle Bande A ed I, nonché a livello delle linee Z ed M (Figura 3.2).

All'interno delle fibre muscolari, le miofibrille sono immerse in una soluzione detta sarcoplasma contenente proteine, enzimi e gli elementi cellulari tipici (mitocondri, ribosomi ecc.) e sono mantenute *in loco* per mezzo di strutture longitudinali e trasversali che costituiscono il cosiddetto reticolo sarcoplasmatico ed il citoscheletro.

Quest'ultimo è responsabile del mantenimento dell'integrità strutturale e del corretto funzionamento dell'apparato contrattile ed è costituito da numerose proteine le cui principali sono:

- titina (o connettina), una proteina organizzata in filamenti disposti parallelamente ai filamenti spessi e sottili con funzione di supporto;
- nebulina, con funzione simile alla titina,
- desmina, che provvede a mantenere l'associazione laterale dei sarcomeri

La Figura 3.3 mostra una sezione trasversale di una fibra muscolare con numerose miofibrille, mentre nella Figura 3.4 è possibile osservare una sezione longitudinale di due fibre muscolari adiacenti.

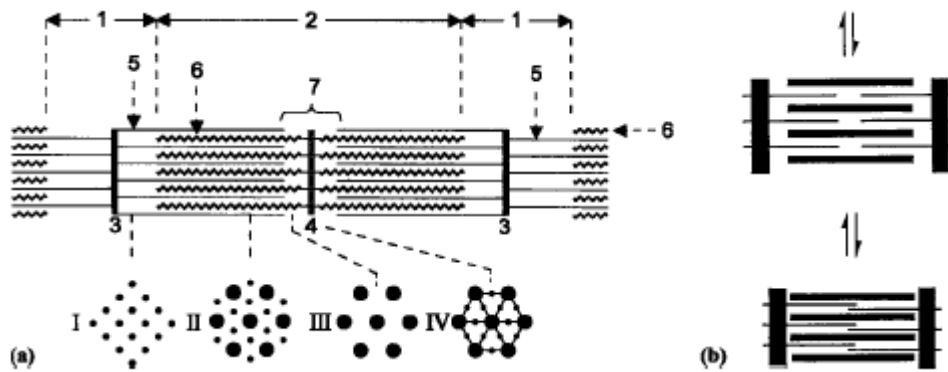


Figura 3.2 - Rappresentazione schematica di un sarcomero in fase rilassata (a) e in fase di contrazione (b) (in accordo con Gault, 1992); 1 Banda I, 2. Banda A, 3 Linea Z, 4 linea M, 5 filamenti sottili, 6 filamenti spessi, 7 zona H. I filamenti sottili vicini alla linea Z, II sovrapposizione tra filamenti sottili e spessi, III filamenti sottili, IV linea M.

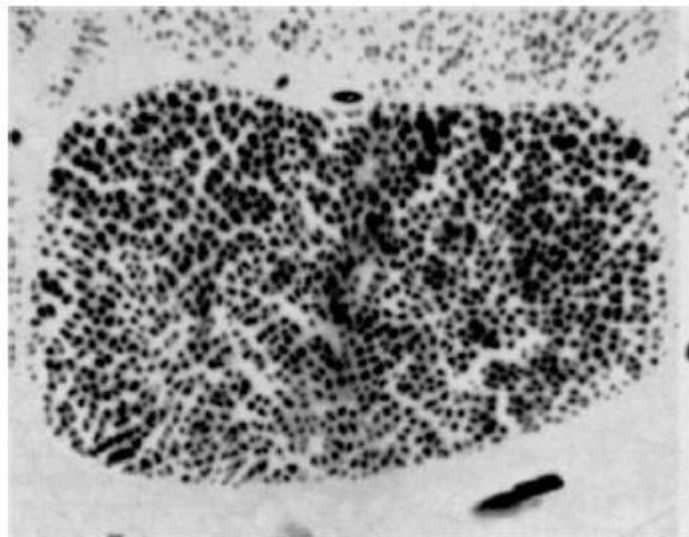


Figura 3.3 - Sezione trasversale di una fibra muscolare (da Schultz, Anglemier, 1964).

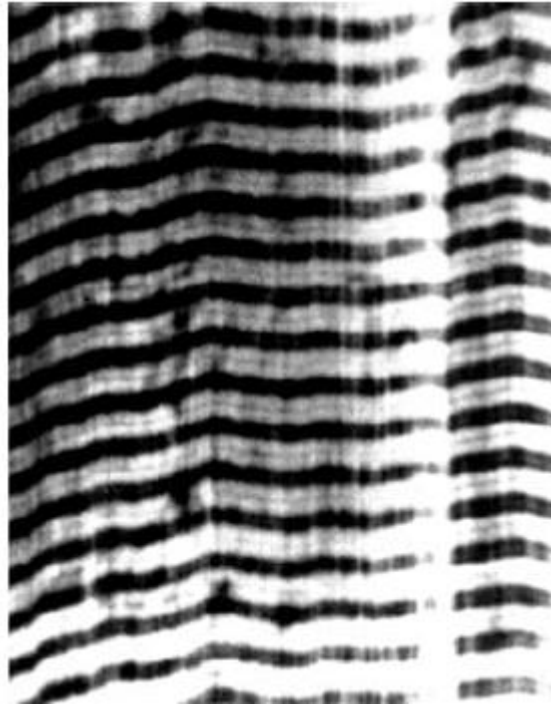


Figura 3.4 - sezione longitudinale di due fibre muscolari adiacenti (da Schultz, Anglemier, 1964).

3.2.3.1 Fibre muscolari

Sulla base delle caratteristiche delle fibre muscolari, inizialmente, è stato messo in relazione il loro colore con la velocità di contrazione, proponendo una distinzione in muscoli rossi, a contrazione lenta, e bianchi, a contrazione rapida.

In seguito si capì che tale classificazione era troppo approssimativa per cui fu proposto un metodo di classificazione delle fibre muscolari basato sulla valutazione della velocità di contrazione e di rilassamento della fibra, nonché della via metabolica impiegata per la produzione di energia.

In generale esistono due vie di produzione dell'ATP necessaria per la contrazione muscolare: la via ossidativa e quella glicolitica.

La via ossidativa è una via metabolica lenta che avviene a livello dei mitocondri, ma che consente di trarre il maggior rendimento energetico dal substrato.

La via glicolitica invece è molto rapida (si realizza a livello sarcoplasmatico), ma meno efficiente della via ossidativa.

Una classificazione delle fibre muscolari più comunemente impiegata identifica tre tipologie di fibre:

- Fibre ossidative,
- Fibre glicolitiche,
- Fibre a metabolismo intermedio.

Le fibre ossidative (fibre rosse di tipo I o β -r), sono a lenta contrazione ed il loro caratteristico colore rosso è dato dall'abbondanza di mioglobina e mitocondri. Si trovano in muscoli adibiti al mantenimento della postura e all'esecuzione di movimenti lenti e ripetitivi (es. muscoli della coscia). Sono quindi prevalentemente aerobiche, resistenti alla fatica e con bassi tenori in glicogeno.

Le fibre glicolitiche (fibre bianche di tipo IIb o α -w) sono a rapida contrazione, ed il cui basso contenuto in mioglobina contribuisce a dar loro una colorazione chiara. Sono scarsamente dotate di mitocondri ed impiegano le riserve energetiche a rapido rilascio quali ATP, Creatin Fosfato (CP), e glicogeno. A causa del metabolismo a bassa attività ossidativa ed elevata attività glicolitica, vanno rapidamente incontro a fenomeni di affaticamento e il ripristino delle loro riserve energetiche avviene solo durante la fase di riposo. Questo tipo di fibre si trovano prevalentemente nei muscoli pettorali (*P. major*) del pollo e del tacchino da carne nonché nel lombo (*L. lomborum*) di suino.

Le fibre a metabolismo intermedio (fibre rosse di tipo IIa o α -r) sono a rapida contrazione come le fibre di tipo IIb, sono tuttavia più ricche di mitocondri, mediamente meno rapide e in grado di svolgere attività ripetitiva a velocità sostenuta.

Possiedono un metabolismo mediamente ossidativo e mediamente glicolitico.

In generale, i muscoli sono definiti “bianchi” o glicolitici quando sono costituiti principalmente da fibre di tipo IIb, “rossi” oppure ossidativi quando sono formati principalmente da fibre di tipo I.

Nella maggior parte dei casi, i muscoli sono costituiti da un insieme di fibre a diverso metabolismo, in proporzioni variabili a seconda della funzione esercitata (es., respirazione, postura, ecc.) e della localizzazione anatomica.

Inoltre la presenza relativa dei tre tipi di fibre varia in funzione di numerosi fattori tra cui la specie, il tipo genetico, e soprattutto, il tipo di muscolo.

In termini generali, un muscolo a prevalente metabolismo ossidativo rispetto ad uno glicolitico, produce carni caratterizzate da una colorazione più rossa, valori di pH finale superiore ed un contenuto in lipidi maggiore.

3.3 Composizione e funzione del tessuto muscolare

La composizione chimica della carne è fortemente influenzata da numerosi fattori di ordine produttivo tra i quali: specie animale, tipo genetico, età alla macellazione, regime e tipo di alimentazione, tecnologia di allevamento, oppure legati alla modalità di lavorazione e conservazione delle carcasse e delle carni. Anche il tipo di muscolo riveste, inoltre, un fattore di variabilità non trascurabile.

I muscoli privi del grasso, contengono mediamente 76% di acqua, 21,5% di sostanze azotate, 1,5% di lipidi e circa 1% di minerali. In tabella 3.1 sono riportati dati sulla composizione media di alcuni tagli di manzo, maiale e pollo, mentre in Tabella 3.2 è riportata la composizione chimica di alcuni tipi di carne fresca e trasformata (Da chimica degli alimenti, Martinelli & Cabras, PICCIN, 2004).

Tabella 3.1 - Composizione chimica media di alcuni tagli di carne (g/100g di parte edibile).

Carne	Taglio	Umidità	Proteine	Grasso	Ceneri
Maiale	<i>M. Subscapularis</i>	74,9	19,5	4,7	1,1
	Lambata (<i>M. Psoas Maior</i>)	75,3	21,1	2,4	1,2
	Cotolette, costolette ^a	54,5	15,2	29,4	0,8
	Prosciutto	75,0	20,2	3,6	1,1
	Tagli laterali	60,3	17,8	21,1	0,85
Manzo	Stinco	76,4	21,8	0,7	1,2
	Bistecca ^a	74,6	22,0	2,2	1,2
Pollo^b	Gamba posteriore (coscia + fusto)	73,3	20,0	5,5	1,2
	petto	74,4	23,3	1,2	1,1

^aCon aderenze di tessuto adiposo; ^bSenza pelle.

Tabella 3.2 - Composizione chimica di alcune tipologie di carni fresche e trasformate (g/100g di parte edibile).

Tipologia	Umidità	Proteine	Lipidi
Carni fresche			
Anatra domestica	68,8	21,4	8,2
Bovino adulto (lombata)	72,3	21,8	5,2
Vitello	76,9	20,7	1,0
Maiale leggero (lombo)	70,7	20,7	7,0
Maiale pesante (lombo)	68,0	20,8	9,9
Coniglio intero	74,9	19,9	4,3
Agnello (tessuto muscolare)	75,2	20,0	2,2
Pollo (petto)	74,9	23,3	0,8
Pollo (fuso con pelle)	74,9	18,4	5,7
Pollo (fuso senza pelle)	77,0	18,5	3,7
Tacchino (fuso con pelle)	74,7	17,9	6,0
Tacchino (fuso senza pelle)	76,0	18,0	4,6
Salumi			
Bresaola	60,0	32,0	2,6
Mortadella	52,3	14,7	28,1
Prosciutto cotto	62,2	19,8	14,7
Prosciutto (crudo disossato)	53,0	26,9	12,9
Salame felino	35,2	30,5	27,9
Salame milano	35,5	26,7	31,1
Salsiccia di suino fresca	53,6	15,4	26,7
Speck	44,7	28,3	20,9
wurstel	58,9	13,7	23,3

3.3.1 Acqua

L'acqua è il costituente principale del muscolo (75% circa). In generale il contenuto in acqua della carne tende a diminuire con l'aumentare dell'età dell'animale in relazione alla diminuzione del rapporto muscolo/grasso della carcassa. Una delle caratteristiche tecnologiche di maggior interesse è la capacità della carne di trattenere l'acqua durante le fasi di lavorazione (taglio, macinazione), trasformazione (cottura) e conservazione. Inoltre la carne ha anche la capacità di trattenere l'acqua di costituzione in seguito all'aggiunta di sale. Sebbene la maggior parte

dell'acqua sia localizzata a livello intracellulare, una quantità significativa occupa gli spazi extracellulari che costituiscono dal 12 al 15% del volume totale del muscolo. Esistono tre tipologie di stati chimico-fisici dell'acqua nella carne:

- ✓ **acqua legata** (4-10/100g di proteina); comprende l'acqua legata direttamente alle proteine attraverso le interazioni con le catene polari degli amminoacidi e che non è disponibile come solvente,
- ✓ **acqua immobilizzata** (20-60g/100g di proteine); è rappresentata dalle molecole d'acqua trattenute mediante legami idrogeno stabiliti con le molecole della frazione costituita dall'acqua legata e caratterizzate da legami che diventano sempre più deboli a mano a mano che ci si allontana dai gruppi polari delle proteine,
- ✓ **acqua libera** (30-60g/100g di proteine) è costituita da acqua trattenuta prevalentemente da forze di tipo superficiale. E' la categoria più importante dal punto di vista tecnologico, in quanto tende ad essere perduta durante le fasi di lavorazione.

Fattori quali il pH, la concentrazione ed il tipo di proteine, il numero di gruppi polari esposti e la presenza di sali e la temperatura, influenzano l'acqua legata, così come la forza e la numerosità dei legami tra la matrice proteica e l'acqua.

3.3.2 Proteine

Le proteine rappresentano il 20% circa della massa muscolare e possono essere suddivise in tre grandi gruppi (Tabella 3.3) a seconda delle loro caratteristiche di solubilità:

- Proteine dell'apparato contrattile, estraibili con soluzioni saline concentrate (Actomiosina, insieme a Tropomiosina e Troponina);
- Proteine solubili in acqua o in soluzioni saline diluite (Mioglobina ed enzimi);
- Proteine insolubili (tessuto connettivo e proteine di membrana).

Tabella 3.3 - Proteine muscolari.

Proteine	% ^a
Proteine Miofibrillari	60,5
Miosina (H-, L-meromiosina, vari composti associati)	29,0
Actina	13,0
Titina	3,7
Tropomiosina	3,2
Troponina C, I, T	3,2
α, β , actinine	2,6
Miomesina, proteine linea N ecc.	3,7
Desmina ecc.	2,1
Proteine del sarcoplasma	29,0
Gliceraldeidefosfato deidrogenasi	6,5
Aldolasi	33,3
Creatina chinasi	2,7
Altri enzimi glicolitici	12,0
mioglobina	1,1
Emoglobina, altre proteine extracellulari	3,3
Proteine dello stroma	10,5
Collagene	5,2
Elastina	0,3
Proteine mitocondriali (compresi citocromi ed enzimi insolubili)	5,0

^amedia percentuale delle proteine di un tessuto muscolare tipico di un mammifero, dopo il rigor mortis e prima dei cambiamenti post mortem (Berlitz *et al.*, 2009).

Le proteine miofibrillari costituiscono il 50-60% delle proteine muscolari totali. A questo gruppo appartengono le proteine contrattili (miosina e actina), responsabili del meccanismo di

contrazione muscolare e le proteine regolatrici (tra cui le Troponine T, I, C e la tropomiosina) che modulano la contrazione muscolare.

Le proteine sarcoplastiche costituiscono il 30% delle proteine muscolari. Sono rappresentate principalmente da enzimi, da proteinasi endogene nonché da citocromi e mioglobina, la molecola responsabile della colorazione rossa della carne.

Il terzo gruppo di proteine è rappresentato dalle proteine dello stroma. Esse costituiscono il 10% circa delle proteine muscolari, comprendono il collagene e l'elastina (proteine del tessuto connettivo). Costituiscono l'epimisio, il perimisio, l'endomisio ed altri elementi (tendini, ecc), che determinano l'integrità strutturale del muscolo e ne consentono l'inserzione con l'apparato scheletrico e le proteine del citoscheletro (titina, nebulina, ecc) responsabili del mantenimento dell'integrità e della struttura delle cellule muscolari.

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

3.3.3 Lipidi

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

Il contenuto e la composizione del grasso dipende da diversi fattori quali la specie, l'origine genetica, l'età, l'alimentazione, e influenza la qualità finale del prodotto.

I lipidi nei prodotti di origine animale ed in particolare della carne sono stati spesso criticati per il loro alto contenuto in acidi grassi saturi (SFA) che nel caso dei ruminanti vengono prodotti nel rumine attraverso il processo di bioidrogenazione degli acidi grassi polinsaturi introdotti con l'alimentazione.

I principali acidi grassi presenti nelle carni sono l'acido oleico (C18:1 cis-9), l'acido palmitico (C16:0), l'acido stearico (C18:0), e in animali monogastrici (suino, pollo, ecc.), l'acido linoleico (C18:2 9 cis, 12 cis) (Tabella 3.4). In Tabella 3.5 vengono poste a confronto le principali categorie di acidi grassi presenti nelle carni di differenti specie.

Tabella 3.4 - Composizione in acidi grassi del tessuto adiposo e del tessuto muscolare di maiali, pecore e bovini (g/100g di acidi grassi totali) (Enser *et al.*, 1996).

	Tessuto adiposo			Muscolo		
	Maiale	Pecora	Bovino	Maiale	Pecora	Bovino
C14:0	1,6	4,1	3,7	1,3	3,3	2,7
C16:0	23,9	21,9	26,1	23,2	22,2	25,0
C16:1 cis-9	2,4	2,4	6,2	2,7	2,2	4,5
C18:0	12,8	22,6	12,2	12,2	18,1	13,4
C18:1 cis-9	35,8	28,7	35,3	32,8	32,5	36,1
C18:2 cis-9, cis-12	14,3	1,3	1,1	14,2	2,7	2,4
C18:3 cis-9, cis-12, cis-15	1,4	1,0	0,5	0,95	1,37	0,70
C20:4 5cis, 8cis, 11cis, 14cis	0,2	ND	ND	2,21	0,64	0,63
C20:5 5cis, 8cis, 11cis, 14cis, 17cis	ND	ND	ND	0,31	0,45	0,28
Totali	65,3	70,6	70,0	2,2	4,9	3,8

Tabella 3.5 - Composizione in acidi grassi dei lipidi muscolari di differenti (da chimica degli Alimenti, Martilelli & Cabras, PICCIN, 2004).

Categoria	Agnello	Bovino	Suino	Pollo
SFA	53,0	45,0	40,0	35,0
PUFA	47,0	55,0	60,0	65,0
S:P	1,1	0,8	0,7	0,6

Nei muscoli e nel tessuto adiposo dei ruminanti, gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) sono limitati quasi esclusivamente alla frazione fosfolipidica (Wood *et al.*, 2004). Anche le differenze tra il tipo di fibra muscolare si riflette sulla diversa composizione in acidi grassi.

I muscoli “rossi” hanno una percentuale più alta di fosfolipidi rispetto ai muscoli “bianchi” e quindi una percentuale più elevata di PUFA.

3.3.4 Carboidrati

Nella carne sono presenti piccole quantità di carboidrati, rappresentati prevalentemente da glicogeno, il cui contenuto varia notevolmente (0,02-1,0% nel tessuto fresco) in funzione del tipo di muscolo e della specie. Durante la trasformazione del muscolo in carne, il glicogeno, viene quasi completamente consumato durante la glicolisi *post mortem* che conduce alla formazione di acido lattico e contemporanea diminuzione del pH della carne. Gli zuccheri semplici costituiscono solamente lo 0,1-0,15% del peso del muscolo fresco, di cui lo 0,1% è spartito dal glucosio-6-

fosfato e da altri zuccheri fosforilati. Gli zuccheri liberi presenti sono glucosio (0,009-0,09%), fruttosio e ribosio.

3.3.5 Vitamine

Tra le vitamine presenti nella carne si trovano sia quelle idrosolubili tra cui ben rappresentate risultano quelle del gruppo B, sia quelle liposolubili (A, D, E e K), particolarmente presenti nelle frattaglie (fegato, reni ecc.) e nei tagli grassi. In Tabella 3.6 sono mostrati i valori delle vitamine in alcuni tipi di carne.

Tabella 3.6 - Contenuto in vitamine di carni di specie animale diversa (Fonte Danone).

Vitamine*	Vitello	Vitellone	Suino	Ovino
A (U.I.)	tracce	tracce	tracce	tracce
Tiamina (mg)	0,10	0,07	1,00	0,15
Riboflavina (mg)	0,25	0,20	0,20	0,25
Niacina (mg)	7,00	5,00	5,00	5,00
Acido pantotenico (mg)	0,60	0,40	0,60	0,50
Biotina (µg)	5,00	3,00	4,00	3,00
Acido folico (µg)	5,00	10,00	3,00	3,00
B ₆ (mg)	0,30	0,30	0,50	0,40
B ₁₂ (µg)	0,00	2,00	2,00	2,00
C (mg)	0,00	0,00	0,00	0,00
D (U.I.)	tracce	tracce	tracce	tracce

* unità, mg o µg per 100 g di carne fresca

3.3.6 Sali minerali

I sali minerali sono presenti in quantità pari all'1% circa e sono rappresentati principalmente da sodio e potassio allo stato ionico e calcio e magnesio sotto forma di complessi organici associati a proteine ed a composti fosforilati.

3.4 Il colore della carne

Il colore di un alimento costituisce un fattore di primaria importanza all'atto dell'acquisto di un prodotto a base di carne come è stato confermato da numerosi studi e indagini di mercato.

Il colore della carne è determinato da una serie di complessi fattori di ordine biochimico, ma anche di allevamento, macellazione e processo che spesso interagiscono tra loro. In generale si può dire che il colore di un taglio di carne fresca dipende dalla presenza di emeproteine, in particolare dai rapporti della mioglobina (Mb), ossimioglobina (MbO₂) e metamioglobina (MMB +), e dal loro equilibrio ossido riduttivo. Tuttavia rilevante è anche l'andamento *post mortem* di alcuni parametri chimico fisici tra cui la temperatura ed il pH

3.5 Cambiamenti *post mortem* del muscolo

La carne è il risultato di tutta una serie di modificazioni biochimiche, a carico del tessuto muscolare striato che, nelle fasi post macellazione, determinano la cosiddetta “maturazione” o “frollatura”.

Subito dopo la morte dell'animale, la concentrazione di ossigeno diminuisce velocemente e i muscoli perdono la capacità di ricavare energia dai processi respiratori. A questo punto hanno inizio le vie metaboliche di tipo anaerobico, che portano all'accumulo di acido lattico e alla demolizione di glicogeno muscolare. Nel momento in cui il muscolo non ha più a disposizione i substrati energetici per la produzione di ATP, le proteine contrattili (miosina ed actina), perdono la loro capacità di formare legami reversibili e si instaura una rigidità del muscolo (*rigor mortis*), causata dalla contrazione definitiva ed irreversibile dei sarcomeri. Il *rigor mortis* si verifica nel muscolo entro 10-24 ore, nella carne di maiale in 4-18 ore, e in quella di pollo in 2-4 ore.

La diminuzione del pH è uno dei fenomeni responsabili della regolazione dei processi di “maturazione” che intervengono nelle fasi *post mortem*. Attraverso la misurazione del pH può essere valutato l'andamento dei processi biochimici che consentono una normale trasformazione del muscolo in carne al fine di rilevare eventuali anomalie di questi eventi.

Per determinare la diminuzione del pH è fondamentale rilevare due distinti parametri, la velocità con cui il pH diminuisce nel tempo ed il valore minimo raggiunto da tale parametro. La velocità di abbassamento del pH dipende da diversi fattori tra i quali la specie, le condizioni di refrigerazione delle carcasse ed il metabolismo glicolitico del muscolo.

Il valore minimo raggiunto dal pH (24-48 ore *post mortem*) è invece funzione del tenore in glicogeno posseduto dal muscolo al momento della macellazione, a sua volta influenzato da fattori sia di tipo biologico (età, sesso, tipo di fibre muscolari) che zootecnico (regime alimentare,

allevamento). Quando il pH muscolare scende dai valori fisiologici di neutralità (pH 7,0 - 7,2) che si registrano in vivo, ai valori tendenzialmente acidi (5,5 - 5,9) riscontrabili in seguito al processo di acidificazione *post mortem*, le varie classi di proteine muscolari si avvicinano al loro punto isoelettrico e subiscono una parziale denaturazione con conseguente diminuzione della loro capacità di ritenzione idrica e predisposizione della struttura muscolare a generare lo scattering della luce che investe la superficie della carne. Questo fenomeno è ritenuto responsabile del cambiamento di colore della carne, che passa da una tonalità relativamente scura e traslucida, tipica del muscolo pre rigor, ad una colorazione pallida ed opaca.

Capitolo 4

I lipidi

4.1 Introduzione

I lipidi sono un gruppo eterogeneo di sostanze biologiche costituiti prevalentemente da composti non polari quali trigliceridi, monogliceridi e steroli e composti polari quali acidi grassi liberi, fosfolipidi e sfingolipidi. Essi sono in parte legati covalentemente ai carboidrati e alle proteine per formare rispettivamente glicolipidi e lipoproteine.

In natura i lipidi assolvono a diversi compiti, in relazione anche alla differenza di struttura chimica.

Essi rappresentano un'importante fonte di energia, anche sotto forma di grasso di deposito, tramite β -ossidazione degli acidi grassi, infatti, si ricavano 9 Kcal/g di grasso; gli acidi grassi inoltre come costituenti dei trigliceridi entrano nella composizione delle membrane cellulari così come i fosfolipidi ed il colesterolo.

Gli esteri degli acidi grassi con funzioni alcoliche di molecole differenti dal glicerolo, quali ad esempio alcoli alifatici a lunga catena, alcoli terpenici o steroli, costituiscono le strutture di rivestimento degli organismi viventi: della superficie delle foglie e dei frutti, nel regno vegetale, della pelle, dei peli nel regno animale.

Christie (Christie, 1982) definisce i lipidi come una grande varietà di prodotti naturali compresi gli acidi grassi e i loro derivati che hanno in comune la facile solubilità in solventi organici quali etere etilico, esano, benzene, cloroformio o metanolo. Kates (Kates, 1986), afferma che "i lipidi" sono sostanze, insolubili in acqua, solubili in solventi organici come cloroformio, etere o benzene, contengono gruppi di idrocarburi a catena lunga nelle loro molecole e sono presenti o derivati da organismi viventi". Gurr e James (Gurr & James, 1971), ricordano che la definizione standard prevede "un gruppo eterogeneo di sostanze chimicamente aventi in comune l'insolubilità in acqua, ma la solubilità in solventi non polari, come il cloroformio, gli idrocarburi o gli alcoli.

La definizione basata sulla solubilità presenta però dei problemi. Alcuni composti che sono considerati lipidi, come gli acidi grassi a catena molto corta (C1-C4, VSCFAs), sono completamente miscibili con l'acqua e insolubili in solventi non polari. Alcuni ricercatori hanno

comunque accettato questa definizione escludendo però gli acidi grassi dal C1 al C3 mantenendo il C4:0 (acido butirrico) in quanto presente nel grasso dei prodotti caseari.

Inoltre, alcuni composti che sono considerati lipidi, come alcuni acidi grassi trans (quelli non derivati da idrogenazione batteriche), non derivano direttamente da organismi viventi.

La US Food and Drug Administration (FDA) definisce il grasso alimentare come "la somma degli elementi con caratteristiche di lipidi che sono estratti secondo i metodi AOAC (Association of official Analytical Chemists) o da procedure affidabili ed appropriate.

Lehninger (1987), restringe il campo di questa classificazione, definendo semplici i lipidi non saponificabili e complessi quelli saponificabili. Questa classificazione è molto utile dal punto di vista analitico in quanto fornisce elementi adatti a fare ipotizzare strategie analitiche per la separazione dei lipidi nelle singole classi.

In generale è quindi possibile fare una classificazione della struttura lipidica sulla base delle loro caratteristiche fisiche a temperatura ambiente (gli oli sono liquidi e i grassi solidi), della polarità (lipidi polari e neutri), della fondamentale importanza per l'uomo (acidi grassi essenziali e non essenziali) o sulla loro struttura (lipidi semplici o complessi).

Se si fa una classificazione in base alla polarità, i lipidi neutri includono gli acidi grassi, gli alcoli, i gliceridi, e gli steroli, mentre i lipidi polari comprendono i glicerofosfolipidi e i gliceroglicolipidi. Poiché però alcuni acidi grassi a corta catena sono molto polari è preferibile fare una classificazione dei lipidi in base alla loro struttura. In questo modo i lipidi possono essere classificati come derivati, semplici o complessi.

I lipidi derivati comprendono gli acidi grassi e gli alcoli, che sono le basi per la formazione dei lipidi semplici e complessi. I lipidi semplici, comprendono acilgliceroli (Figura 4.1), eteri acilgliceroli, steroli, i loro esteri e gli esteri delle cere. I lipidi semplici possono essere idrolizzati in due diverse componenti generalmente un alcol ed un acido. I lipidi complessi includono glicerofosfolipidi (fosfolipidi, Figura 4.2), gliceroglicolipidi (glicolipidi, Figura 4.3) e sfingolipidi (Figura 4.4). I lipidi complessi per idrolisi danno tre o più composti differenti.

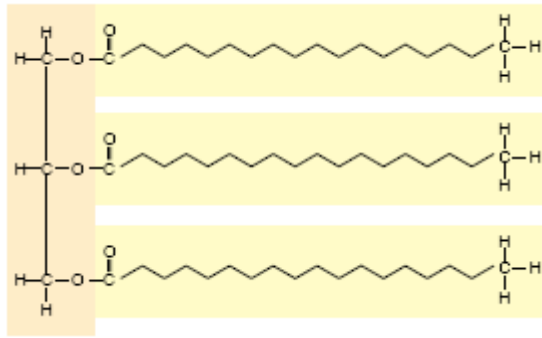


Figura 4.1 - Struttura di un acilglicerolo.

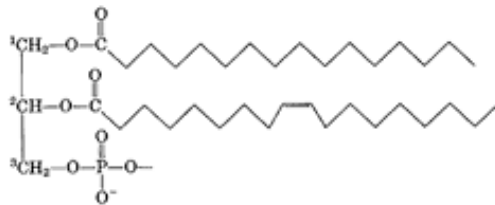


Figura 4.2 - Struttura di un fosfolipide.

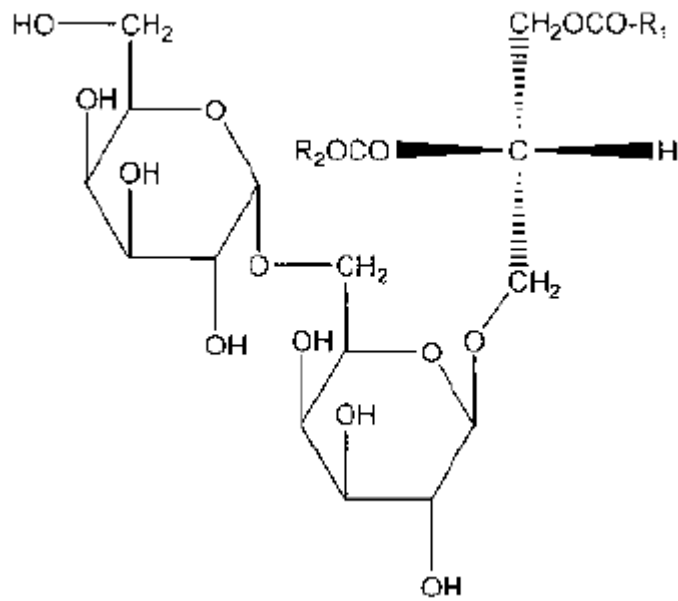


Figura 4.3 - Struttura di un gliceroglicolipide.

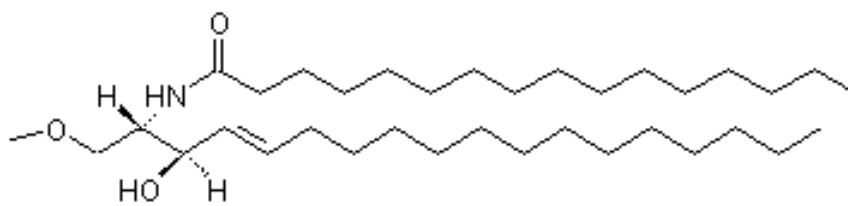


Figura 4.4 - struttura di uno sfingolipide.

4.2 Acidi Grassi

4.2.1 Classificazione e nomenclatura

Gli acidi grassi rappresentano l'elemento costitutivo di quasi tutti i lipidi. Sono molecole costituite da una catena di atomi di carbonio, denominata catena alifatica, che termina con un solo gruppo carbossilico. La catena alifatica che li costituisce è tendenzialmente lineare, e solo in rari casi si presenta in forma ramificata o ciclica. Sono proprio gli acidi grassi a caratterizzare le peculiarità dei grassi introdotti con l'alimentazione. Gli acidi grassi sono comunemente reperibili sia in alimenti di origine animale che vegetale. A seconda delle caratteristiche dei lipidi, essi si ritrovano legati a molecole differenti. Ad esempio i trigliceridi rappresentano i grassi di deposito e sono costituiti da 3 molecole di acidi grassi legate ad una molecola di glicerina. I fosfolipidi e le lipoproteine sono grassi costituenti le membrane cellulari ed elementi circolanti nel plasma sanguigno.

Chimicamente, gli acidi grassi, sono costituiti da catene idrocarburiche (corte o lunghe) che ne consentono la classificazione. Essi possono essere suddivisi in gruppi a seconda della lunghezza della catena carboniosa, numero, posizione e configurazione dei loro doppi legami, e in base alla presenza di ulteriori gruppi funzionali lungo le catene alifatiche.

Le principali classificazioni comprendono:

- acidi grassi saturi, caratterizzati dalla presenza di soli legami semplici carbonio-carbonio nella catena alifatica (SFA, es.: acido butirrico, Figura 4.5), reperibili allo stato solido se posti a temperatura ambiente;
- acidi grassi insaturi, caratterizzati dalla presenza di uno o più doppi legami carbonio-carbonio lungo la catena alifatica e da aspetto liquido a temperatura ambiente.

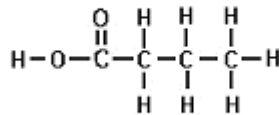


Figura 4.5 - Acido grasso saturo
(acido butirrico).

Un'altra caratteristica molto importante degli acidi grassi riguarda la lunghezza della catena carboniosa che li costituisce. Infatti, gli acidi grassi a corta catena sono solubili in acqua (quindi, in

senso stretto non sono nemmeno dei lipidi); come tali non necessitano dell'azione emulsionante della bile e non rientrano nella composizione delle micelle intestinali, bypassano il circolo linfatico per essere veicolati direttamente nel sangue diretto al fegato. Man mano che la catena si allunga, la solubilità in acqua dell'acido grasso si riduce ed i processi di assorbimento si complicano.

La lunghezza della catena carboniosa influenza anche il punto di fusione del grasso, aumentandolo o diminuendolo in modo proporzionale (se la catena si allunga il punto di fusione aumenta, cioè il grasso è più solido, e viceversa).

La nomenclatura degli acidi grassi è molto importante, anche se abbastanza complessa e per alcuni aspetti controversa. Innanzitutto occorre quantificare la lunghezza della catena alifatica, esprimendola con la lettera C seguita dal numero di carboni presenti nell'acido grasso (es. C14, C16, C18, C20 ecc.). Secondariamente occorre indicare il numero di insaturazioni, facendo seguire alla sigla C_n il simbolo ":" seguito dal numero di doppi o tripli legami (ad esempio, l'acido oleico, avendo una catena di 18 atomi di carbonio in cui è inserita una sola insaturazione, verrà indicato dalla sigla C18:1). Infine, occorre precisare dove si trova l'eventuale insaturazione. A tal proposito esistono due differenti nomenclature:

la prima fa riferimento alla posizione del primo carbonio insaturo che si incontra iniziando a numerare la catena carboniosa dal gruppo carbossilico iniziale; tale posizione è indicata dalla sigla Δ_n, dove n è il numero di atomi di carbonio presenti tra l'estremità carbossilica ed il primo doppio legame.

Nel secondo caso la numerazione degli atomi di carbonio inizia a partire dal gruppo metilico terminale (CH₃); tale posizione è indicata dalla sigla ω_n, dove n è il numero di atomi di carbonio presenti tra l'estremità metilica finale ed il primo doppio legame.

Nel caso dell'acido oleico la nomenclatura completa è C18:1 Δ₉ oppure C18:1 ω₉.

La prima numerazione è preferita dai chimici degli alimenti, mentre in campo medico si preferisce utilizzare la seconda.

4.2.2 Acidi grassi saturi (SFA)

Gli acidi grassi saturi sono formati da una catena carboniosa più o meno lunga, che inizia con un gruppo carbossilico (-COOH), termina con un gruppo metilico (CH₃) e presenta nella parte centrale una serie di atomi di carbonio, ciascuno dei quali è accoppiato a due atomi di idrogeno (CH₂). In Figura 4.5 è rappresentata la struttura chimica di un acido grasso saturo.

Gli acidi grassi saturi (SFA) hanno prevalentemente un significato energetico e sono presenti nei grassi animali, negli oli tropicali e nell'olio di semi di cotone. Numerosi studi epidemiologici indicano che diete con un alto contenuto di SFA sono associate ad alti livelli di colesterolo serico

(in particolare LDL) e, quindi, ad un'elevata incidenza di cardiopatie coronariche. Gli SFA a corta catena (< C10), non comportano aumento del colesterolo nel sangue, mentre gli SFA a media catena laurico (C12:0), miristico (C14:0) e palmitico (C16:0) sono aterogenici come già osservato da Keys *et al.* nel 1965.

Molti studi hanno, poi, dimostrato che gli SFA a media catena, miristico (C14:0), palmitico (C16:0) sono anche trombogenici (Dietschy, 1998). L'acido miristico è il principale aterogenico poiché ha un potere ipercolesterolemico quattro volte superiore rispetto a quello dell'acido palmitico (Hegsted, 1965).

L'acido stearico (C18:0) invece, pur essendo saturo, è poco aterogenico in quanto viene rapidamente desaturato dall'organismo ad acido oleico (Khosla e Sundram, 1996).

L'apporto giornaliero consigliato di acidi grassi saturi deve essere inferiore al 10% (7-10%) in termini di calorie totali, ed il rapporto ottimale SFA/UFA nella dieta deve essere di 1:2 (Gurr, 1998).

In Tabella 4.1 sono mostrati i principali acidi grassi saturi (SFA) e la loro distribuzione in natura.

Tabella 4.1 - Principali acidi grassi saturi e loro distribuzione in natura (Da Chimica Degli Alimenti - Cabras, Martelli – Piccin, 2004).

N° di atomi di carbonio	Composizione	Denominazione comune	Denominazione IUPAC	Notazione abbreviata	Punto di fusione (°C)	Fonti in naturali
4	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	Butirrico	Butanoico	C4:0	-45	Grasso del latte
6	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	Caprinico	Esanoico	C6:0	-2	Grasso del latte, olio di cocco
8	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	Caprilico	Ottanoico	C8:0	17	Grasso del latte, olio di cocco
10	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	Caprico	Decanoico	C10:0	32	Grasso del latte, olio di cocco, semi di olmo (50% degli acidi grassi)
12	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	Laurico	Dodecanoico	C12:0	44	Semi di Lauraceae, oli di cocco
14	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	Miristico	Tetradecanoico	C14:0	58	Presente in tutti gli oli e grassi vegetali ed animali, latte (8-12%), cocco (15-30%), noce moscata 70-80%
16	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	Palmitico	Esadecanoico	C16:0	62	Presente in tutti gli oli grassi animali e vegetali, sego e strutto(25-30%). palma (30-50%), cacao (25%)
18	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	Stearico	Ottadecanoico	C18:0	72	Presente in tutti gli oli e grassi animali e vegetali, sego(20%), strutto (10%), cacao (35%), oli vegetali (1-5%)
20	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	Arachico	Eicosanoico	C22:0	78	Presente in tutti gli oli e grassi animali in quantità limitate, solo nell'olio di arachide 1-2%
22	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	Beenico	Docosanoico	C22:0	80	Presente in tutti gli oli e grassi animali in quantità limitate, solo nell'olio di arachide 1-2%
24	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	Lignocerico	Tetracosanoico	C24:0		Presente in tutti gli oli e grassi animali in quantità limitate, solo nell'olio di arachide 1-2%

4.2.3 Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)

Una catena alifatica con una o più coppie di atomi di carbonio che legano a sé un solo atomo di idrogeno per unità, forma un acido grasso che si definisce insaturo (presenta uno o più doppi legami C=C). A loro volta gli acidi grassi insaturi vengono definiti acidi grassi monoinsaturi (MUFA, es.: acido oleico, Figura 4.6) se lungo la catena alifatica è presente un solo doppio legame e acidi grassi polinsaturi (PUFA, es.: acido linoleico, Figura 4.7) se lungo la catena alifatica sono presenti due o più doppi legami .

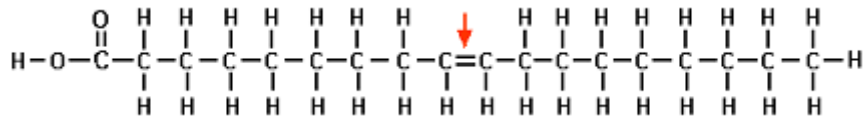


Figura 4.6 - Acido grasso monoinsaturo (acido oleico).

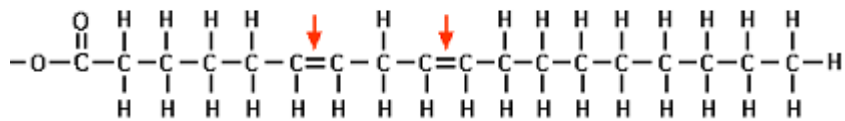


Figura 4.7 - Acido grasso poliinsaturo (acido linoleico).

La presenza di un doppio legame nella catena alifatica implica l'esistenza di due conformazioni:

- ✓ **cis** se i due atomi di idrogeno legati ai carboni impegnati nel doppio legame sono disposti sullo stesso piano
- ✓ **trans** se la disposizione spaziale è opposta.

La forma cis abbassa il punto di fusione dell'acido grasso e ne fa aumentare la fluidità.

Come mostrato in Figura 4.8 (struttura chimica e molecolare dell'acido oleico) in corrispondenza dei doppi legami la molecola perde la sua struttura lineare e forma un ripiegamento; questo perché in natura la maggior parte dei doppi legami ha una configurazione di tipo cis. Un esempio è dato dall'acido oleico, in cui i due atomi di carbonio impegnati nel doppio legame sono legati al proprio idrogeno sullo stesso piano; si forma così una specie di gradino, che modifica l'originaria struttura lineare della molecola dell'acido grasso. Tutto ciò si ripercuote sul grado di fluidità dell'alimento, tanto maggiore quanto più abbondano i doppi legami. Ecco perché gli oli vegetali, ricchi di grassi insaturi, sono generalmente liquidi a temperatura ambiente, mentre nelle medesime condizioni i grassi animali hanno consistenza solida.

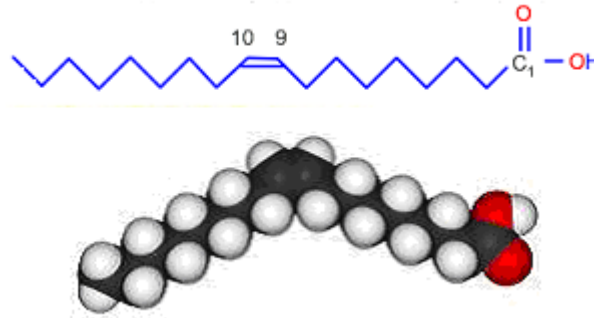


Figura 4.8 - struttura chimica e molecolare (3D) dell'acido oleico.

In natura gli acidi grassi monoinsaturi più comuni sono l'acido palmitoleico (C16:1 6c), ubiquitario, presente in piccole quantità in tutti gli oli vegetali, l'acido oleico (C18:1 9c), presente in tutti gli oli vegetali ed i grassi animali, in quantità variabile. L'acido oleico è l'acido grasso predominante nell'olio d'oliva, il suo contenuto, in relazione ad una serie di fattori quali l'ambiente di coltivazione, le condizioni climatiche e il grado di maturazione delle olive può oscillare tra il 59% e quasi l'80%, registrandosi normalmente contenuti minori per i prodotti dei climi caldi.

L'altro acido grasso monoinsaturo maggiormente rappresentato nel mondo vegetale può essere considerato l'acido erucico (C22:1 13c), caratteristico degli oli di colza in cui può rappresentare sino al 50% degli acidi grassi.

La maggior parte dei grassi insaturi assunti attraverso la dieta è di forma cis mentre una piccola percentuale è di forma trans.

Nell'acido elaidico (C18:1 9t) (Figura 4.9), è possibile osservare come i due atomi di carbonio impegnati nel doppio legame si trovino su piani molecolari opposti. In questo caso la molecola di acido grasso mantiene una struttura lineare e gli alimenti che la contengono saranno quindi meno fluidi rispetto al caso precedente. Questi acidi grassi di tipo trans sono abbastanza rari in natura, ma vengono generati dall'industria alimentare durante la trasformazione degli oli in grassi solidi (margarine); tale risultato si ottiene mediante un processo detto di idrogenazione, con il quale si aggiungono gli idrogeni necessari a saturare il doppio legame, quindi due atomi di idrogeno per ogni coppia (C=C).

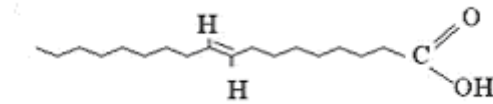


Figura 4.9 - Acido elaidico (C18:1 9t).

Questi acidi grassi trans sono inoltre presenti negli oli utilizzati per friggere nonché nei prodotti di pasticceria, nei dolci e nei prodotti industriali da forno (prodotti con una elevata percentuale di grassi parzialmente idrogenati). La percentuale di acidi grassi trans può raggiungere il 60% dei grassi totali.

Gli acidi grassi trans si trovano naturalmente nelle carni e nel latte degli animali ruminanti, in seguito al processo di bioidrogenazione ad opera dei batteri presenti nel rumine.

Negli alimenti di origine animale, la percentuale di acidi grassi trans è inferiore al 10% del grasso totale. Secondo i dettami dell'Organizzazione Mondiale della Sanità il quantitativo di TFA assunti con la dieta non dovrebbe superare l'1% dell'apporto calorico giornaliero totale.

In Tabella 4.2 sono mostrati i principali acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e la loro distribuzione in natura.

Tabella 4.2 - Principali acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e loro distribuzione in natura.

<i>N° di atomi di carbonio</i>	<i>Posizione dei doppi legami</i>	<i>Composizione</i>	<i>Denominazione comune</i>	<i>Denominazione IUPAC</i>	<i>Notazione abbreviata</i>	<i>Punto di fusione (°C)</i>	<i>Fonti in naturali</i>
10	9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	acido caproleico	acido cis-9-decanoico	C10:1	-	latte
14	9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	acido miristoleico	acido cis-9-tetradecenoico	C14:1	-	latte
16	6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	acido palmitoleico	acido cis-6-esadecenoico	C16:1	-5	Tutti i grassi animali e vegetali
18	cis-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	acido oleico	acido cis-9-ottadecenoico	C18:1	16	Tutti gli oli ed i grassi Olio d'oliva (59-83%, olio di semi (40-70%))
18	trans-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	acido elaidico	acido trans-9-ottadecenoico	C18:1	-	Grassi dei ruminanti
18	trans-11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	acido vaccenico	acido trans-11-ottadecenoico	C18:1	-	Principalmente nei grassi dei ruminanti
20	11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	acido gadoleico	acido cis-11-eicosenoico	C20:1	-	Olio di colza
22	13	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	acido erucico	acido cis-13-docosenoico	C22:1	-	Olio di colza
24	15	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	acido nervonico	acido cis-15-tetracosenoico	C24:1	-	

Tra gli isomeri dei C18:1 trans, l'acido elaidico è quello più pericoloso per la salute del consumatore, infatti determina un aumento del colesterolo cattivo (lipoproteine, LDL) a sfavore della frazione "buona" (lipoproteine, HDL). Un elevato consumo di acidi grassi trans aumenta il rischio di sviluppare gravi patologie cardiovascolari (aterosclerosi, trombosi, ictus, ecc) (Gurr, 1998).

Tra gli acidi grassi monoinsaturi trans (TFA) di origine ruminale il più abbondante è il C18:1 11t (acido vaccenico). Contrariamente all'acido elaidico, l'acido vaccenico ha importanti effetti positivi sulla salute del consumatore in quanto precursore dell'acido rumenico (CLA 9c, 11t) di cui - come in seguito verrà riportato - sono note le proprietà nutraceutiche. L'acido vaccenico viene infatti desaturato ad acido rumenico sia nella ghiandola mammaria dei ruminanti che in alcuni tessuti dell'organismo umano (fegato) ad opera dell'enzima $\Delta 9$ desaturasi.

In particolari condizioni di pH ruminale, dovute ad un'eccessiva ingestione di mangimi concentrati da parte del ruminante, diminuisce nel rumine la concentrazione di acido vaccenico a favore dell'isomero C18:1 10t. Questo isomero, oltre a deprimere la sintesi di grasso a livello della ghiandola mammaria (Milk Fat Depression Sindrome), ha effetti negativi sulla salute del consumatore essendo responsabile dell'insorgenza di alcune patologie cardiovascolari (Bauman *et al.* 2003).

L'apporto giornaliero consigliato di acidi grassi monoinsaturi nella dieta, dovrebbe coprire il 20% del fabbisogno calorico totale (WHO, 1990).

4.2.4 Acidi grassi polinsaturi (PUFA)

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) sono catene lineari costituite da un gruppo carbossile seguito da atomi di carbonio legati ad atomi di idrogeno. Si differenziano dagli acidi grassi saturi e monoinsaturi per la presenza di più doppi legami (Figura 4.10).

In ogni acido grasso polinsaturo si hanno "ripiegamenti" molecolari in corrispondenza dei doppi legami. Per questo motivo i trigliceridi che li contengono non possono "impacchettarsi" al meglio e faticano a formare una struttura solida, gli alimenti che ne sono ricchi, pertanto, presentano un maggior grado di fluidità rispetto alle fonti alimentari di grassi saturi, e rimangono liquidi anche alle temperature di refrigerazione.

In Tabella 4.3 sono mostrati i principali acidi grassi poliinsaturi (PUFA) e la loro distribuzione in natura.

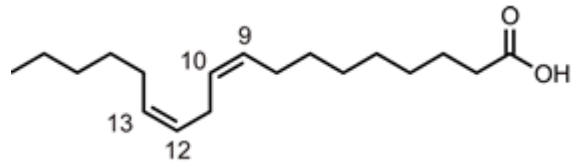


Figura 4.10 - Struttura chimica dell'acido α -linoleico.

Tabella 4.3 - Principali acidi grassi poliinsaturi (PUFA) e loro distribuzione in natura.

Atomi di Carbonio: Doppi legami	Posizione doppio legame	Nome comune	Nome IUPAC	Fonti alimentari
18:2	9, 12	acido linoleico	acido 9,12-ottadecadienoico	Olio di girasole
18:3	9, 12, 15	acido alfa-linolenico	acido 9,12,15-ottadecatrienoico	Salmone, sgombro, sardine, olio di lino
18:4	6, 9, 12, 15	acido stearidonico	acido 6,9,12,15-ottadecatetraenoico	
20:4	5, 8, 11, 14	acido arachidonico	acido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	grassi animali, oli di pesce
20:5	5, 8, 11, 14, 17	acido timnodonico (EPA)	acido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Oli di pesce
22:5	4, 8, 12, 15, 19	acido clupanodonico	acido 4,8,12,15,19-docosapentaenoico	Oli di pesce
22:6	4, 7, 10, 13, 16, 19	acido cervonico (DHA)	acido 4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico	Oli di pesce

4.2.4.1 Acidi grassi essenziali (EFA)

L'organismo umano non è in grado di biosintetizzare tutti gli acidi grassi necessari al suo ottimale funzionamento, in quanto, in particolare, esso non dispone di desaturasi in grado di agire sui primi sette legami (a partire dal CH₃ terminale) della catena alifatica dell'acido grasso. Gli acidi grassi con insaturazioni in una di queste posizioni quindi devono derivare dalla dieta, per questo motivo ad essi è stato attribuito il carattere di "essenzialità". Essi giocano ruoli fondamentali sia dal punto di vista strutturale che da quello funzionale in differenti tessuti, entrando nella costituzione di tutte le membrane.

Gli acidi grassi essenziali sono generalmente suddivisi in due classi, omega-3 (ω 3) ed omega-6 (ω 6), a seconda della posizione del loro primo doppio legame nella porzione metilica della molecola. Gli acidi grassi capostipite dei due gruppi sono l'acido α -linolenico (C18:3 ω 3) e l'acido linoleico (C18:2 ω 6) entrambi di origine vegetale. I microsomi epatici e cerebrali posseggono la capacità di allungare e desaturare ulteriormente gli acidi grassi capostipite della serie ω 6 ed ω 3 forniti con la dieta, formando attraverso una serie alternata di desaturazioni ed allungamenti gli acidi grassi polinsaturi a catena lunga da cui si formano gli eicosanoidi e i mattoni

costituenti le membrane cellulari e mitocondriali. Prostaglandine, trombossani e leucotrieni derivano tutti dal metabolismo degli acidi grassi $\omega 6$ ed $\omega 3$ attraverso reazioni catalizzate dagli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi.

Un'altra caratteristica fondamentale degli acidi grassi $\omega 6$ ed $\omega 3$ è il fatto che il loro metabolismo segue vie totalmente distinte, in quanto un acido grasso $\omega 3$ non può essere trasformato in un acido grasso $\omega 6$ e viceversa. Tuttavia, gli acidi grassi di entrambi i tipi possono essere allungati (aumento del numero di atomi di carbonio) e desaturati (aumento del numero di doppi legami) attraverso processi catalizzati dagli stessi enzimi. Pertanto, le due famiglie di acidi grassi polinsaturi competono per lo stesso sistema enzimatico (Figura 4.11).

Metabolismo degli acidi grassi essenziali

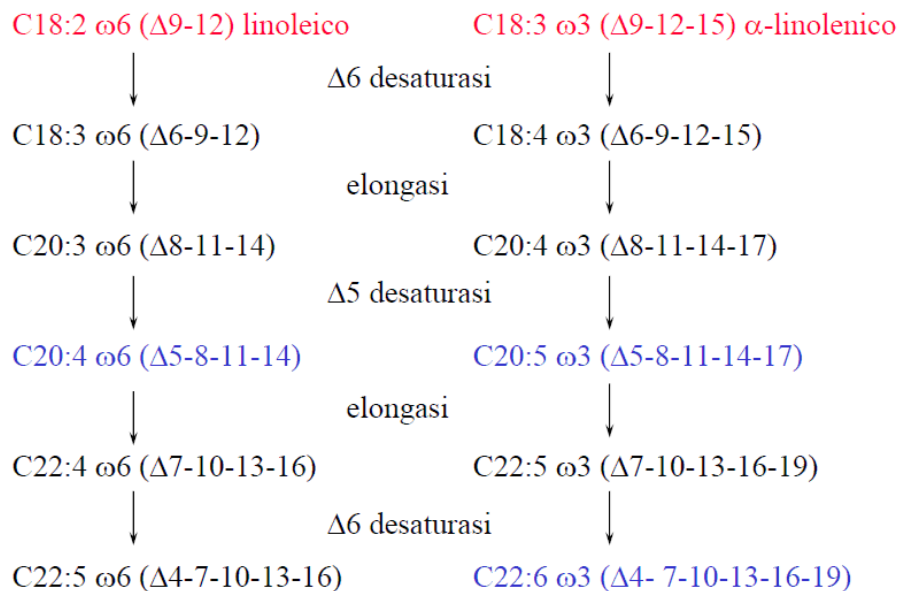


Figura 4.11 - Metabolismo degli acidi grassi essenziali.

L'enzima Δ -6-desaturasi rappresenta una barriera per ambedue le serie $\omega 6$ ed $\omega 3$ trasformando l'acido cis-linoleico in acido γ -linolenico e l'acido α -linolenico in acido stearidonico (C18:4 $\omega 3$). L'attività catalitica dell'enzima è inibita o bloccata da grassi saturi, acidi grassi trans derivati dalla trasformazione degli oli vegetali, l'iperglicemia, l'alcool, l'invecchiamento, l'adrenalina (azione mediata da β -recettori), una dieta ipoproteica, i virus oncogeni, le radiazioni ionizzanti.

Gli acidi grassi della serie $\omega 3$ sono normalmente presenti negli alimenti marini, in alcune piante ed, anche, in alcuni prodotti di origine animale quali latte e derivati, carne ed uova. Gli acidi grassi $\omega 3$ più comuni sono: l'acido α -linolenico (C18:3 $\omega 3$), l'acido stearidonico (C18:4 $\omega 3$),

l'acido eicosatetraenoico (C20:4 ω 3) l'acido eicosapentaenoico o EPA (C20:5 ω 3), l'acido docosapentaenoico (C22:5 ω 3), l'acido docosaesaenoico o DHA (C22:6 ω 3). EPA e DHA sono i più importanti acidi grassi a lunga catena della serie ω 3 e svolgono nell'organismo umano funzioni strutturali e funzionali.

L'acido grasso ω 3 maggiormente presente nel mondo vegetale è l'acido α -linolenico (presente soprattutto nei vegetali a foglia verde, nei legumi, nella frutta secca, nelle noci, in alcuni oli come quelli di lino e di soia, nell'estratto di colza o ravizzone). Questo acido grasso deve essere trasformato in EPA e DHA per esercitare gli effetti biologici determinanti per l'ottimale funzionamento del cervello, della retina e delle gonadi, EPA e DHA esplicano, inoltre, una azione protettiva nei confronti del processo aterosclerotico e dell'insorgenza di malattie cardio-vascolari.

L'acido α -linolenico può essere ottenuto, nelle piante più evolute dall'acido linoleico attraverso sintesi nelle membrane dei cloroplasti, sintesi non possibile nel mondo animale. EPA e DHA sono presenti nel fitoplancton e sono concentrati in particolare in alcune specie ittiche (pesci che vivono nelle acque fredde).

Il DHA ha prevalentemente una funzione strutturale; infatti, è maggiormente presente nei fosfolipidi dei sinaptosomi cerebrali, nella retina e nei fosfolipidi dei canali intramembrana del sodio. Esso ha, quindi, un ruolo importante nello sviluppo e nella maturazione cerebrale, dell'apparato riproduttivo e del tessuto retinico (Jump, 2002).

L'EPA è il principale precursore delle prostaglandine della serie 3, le quali posseggono una importante attività antiaggregante piastrinica.

L'attività biologica degli acidi grassi ω 3 (antiaterogena, antinfiammatoria, antitrombotica) dipende dal prevalere dei fattori protettivi su quelli inducenti rischio. L'assunzione di acidi grassi ω 3 incrementa: la formazione di prostaglandine PGI₃; la produzione di leucotrieni B₅ (molto meno infiammatori rispetto ai leucotrieni B₄), di interleuchina 2, dell'EDRF (Endothelial Derived Relaxing Factor); l'attività fibrinolitica; la deformazione degli eritrociti; l'aumento delle HDL. Una diminuzione o assenza di acidi grassi ω -3 comporta una maggiore produzione di acido arachidonico (C20:4 ω 6) , un aumento dell'aggregazione piastrinica e la formazione di trombociti, un aumento dell'attività dei macrofagi, una aumentata formazione di interleuchina 1, di leucotrieni 4, del PAF (Platelet Activating Factor) e del PDGF (Platelet Derived Growth Factor), un incremento delle LDL, delle VLDL, dei trigliceridi e della viscosità ematica.

Gli acidi grassi più importanti della serie ω -6 sono l'acido linoleico (C18:2 ω 6), l'acido γ -linolenico (C18:3 ω 6), l'acido diomo- γ -linolenico (C20:3 ω 6), l'acido arachidonico (C20:4 ω 6). Il più diffuso è l'acido linoleico che è presente negli oli di semi; l'acido arachidonico è tipico del mondo animale essendo un prodotto di conversione dell'acido linoleico. L'acido γ -linolenico è il

primo intermedio nella conversione dell'acido linoleico ad acido arachidonico; l'acido diomo- γ -linolenico ha un rapido turnover metabolico in quanto è rapidamente convertito a prostaglandine della serie 1.

Gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena $\omega 6$ hanno, anch'essi, un ruolo strutturale e funzionale. L'acido arachidonico è presente nei fosfolipidi di membrana ed è importante, opportunamente bilanciato con il DHA, nello sviluppo embrionale e nell'accrescimento del bambino, produce le prostaglandine della serie 2 (attraverso la via ciclossigenasica) dando luogo alla formazione di intermedi metabolici ad attività pro-infiammatoria e aggregante piastrinica (trombossano A₂). Dall'acido arachidonico tramite la via lipossigenasica si formano i leucotrieni, che hanno una azione broncocostrittrice.

Gli effetti biologici degli acidi grassi della serie $\omega 6$ e della serie $\omega 3$ pur avendo come siti della loro azione gli stessi elementi cellulari (mastociti, neutrofili, eosinofili, macrofagi, trombociti, endotelio vasale) sono spesso di tipo opposto: infatti, gli acidi grassi $\omega 6$ (acido arachidonico) dando origine a prostaglandine della serie 2 e leucotrieni della serie 4 hanno come effetto finale vasocostrizione, broncocostrizione attivazione dei poliformonucleati e aumento della permeabilità, gli acidi grassi $\omega 3$ (EPA) formando prostaglandine della serie 3 e leucotrieni della serie 5 riducono i processi infiammatori, provocano vasodilatazione e riducono la bronco costrizione (Figura 4.12) (Storlien *et al.* 1997).

Il fabbisogno giornaliero degli acidi grassi $\omega 3$ EPA e DHA è di 1 g al giorno (circa lo 0,5% delle calorie totali) mentre per l'acido γ -linoleico $\omega 6$ è di 560 mg al giorno (circa lo 0,25% delle calorie totali) (LARN, 1996). Attualmente Il rapporto tra acidi grassi polinsaturi a lunga catena $\omega 3$ / $\omega 6$ è intorno a 1:10 nella nostra società, tale rapporto dovrebbe invece essere ricondotto, secondo le vedute più moderne, a circa 1:5. Alla luce di questo è probabilmente opportuno aumentare l'apporto di acidi grassi $\omega 3$, insufficiente nella dieta di gran parte delle popolazioni del mondo occidentale

Negli ultimi anni infatti questo rapporto ideale si è notevolmente sbilanciato a favore degli $\omega 6$ per ragioni diverse fra cui l'aumentato consumo di oli vegetali (mais, girasole, arachidi ricchi di $\omega 6$ come l'acido linoleico), per il controllo dell'aterosclerosi, il limitato consumo di pesce e la minor presenza di $\omega 3$ nel pesce di allevamento rispetto a quello pescato che si nutre di fitoplancton, le minime quantità di acido linolenico nelle carni provenienti dai bovini domestici che sono alimentati con prodotti molto poveri di acidi grassi $\omega 3$, la produzione di vegetali a foglia verde contenenti acidi grassi $\omega 3$ in misura minore.

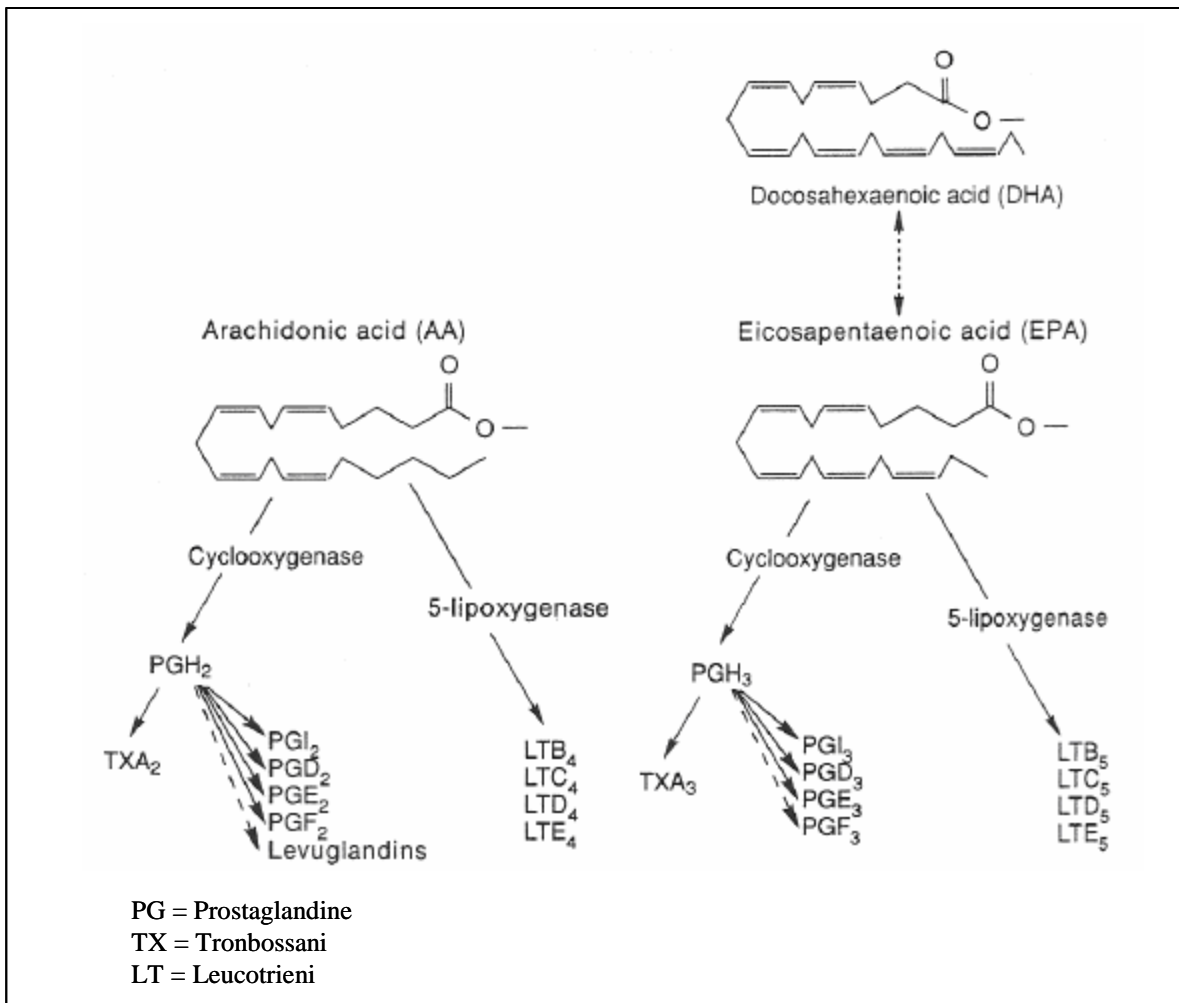


Figura 4.12 - Vie metaboliche di sintesi degli ormoni dei tessuti derivati dagli acidi grassi della serie ω_6 ed ω_3 .

L'assunzione lipidica corretta dovrebbe quindi prevedere un giusto equilibrio fra acidi grassi precursori e derivati che nelle condizioni di normalità apportino buone quantità di C18:2 ω_6 e C18:3 ω_3 e piccole quantità di C18:3 ω_6 , C18:4 ω_3 , C20:5 ω_3 , C20:4 ω_6 e C22:6 ω_3 (Barzanti *et al.*, 1994).

Il fabbisogno minimo per l'adulto deriva da studi in base ai quali sembra che lo 0,5% delle calorie totali sia sufficiente a mantenere l'integrità metabolica. Pertanto viene raccomandato un livello pari all'1-2% delle calorie sotto forma di acido linoleico e lo 0,2-0,5% come acidi grassi poliinsaturi della serie ω_3 (Commission of the European Communities, 1993) (Tabella 4.4).

Tabella 4.4 - Livelli di assunzione raccomandati di acidi grassi essenziali.

Categoria	Età	$\omega 6$		$\omega 3$	
		% energia	g/die	% energia	g/die
lattanti	0,5-1	4.5	4	0.2-0.5	0.5
Bambini	1-3	3	4	0.5	0.7
	4-6	2	4	0.5	1
	7-10	2	4	0.5	1
Maschi	11-14	2	5	0.5	1
	15-17	2	6	0.5	1.5
	>18	2	6	0.5	1.5
Femmine	11-14	2	4	0.5	1
	15-17	2	5	0.5	1
	>18	2	4.5	0.5	1
Gestanti		2	5	0.5	1
nutrici		2	5.5	0.5	1

4.2.5 Acidi linoleici coniugati (CLA)

4.2.5.1 Introduzione

Il termine CLA (conjugated linoleic acid) si riferisce ad un gruppo di isomeri posizionali e geometrici dell'acido octadecadienoico (linoleico, C18:2 9c, 12c), caratterizzati dalla presenza di due doppi legami coniugati, diversi dai classici legami metilenici presenti nella struttura dell'acido linoleico (Figura 4.13). Tali legami coniugati si possono trovare nelle posizioni che vanno da 7,9 a 12,14 e per ogni isomero posizionale sono possibili 4 paia di isomeri geometrici (cis,cis; trans,cis; cis,trans; trans,trans). Di conseguenza il termine CLA include un totale di 24 isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (Cruz-Hernandes *et al.*, 2004).

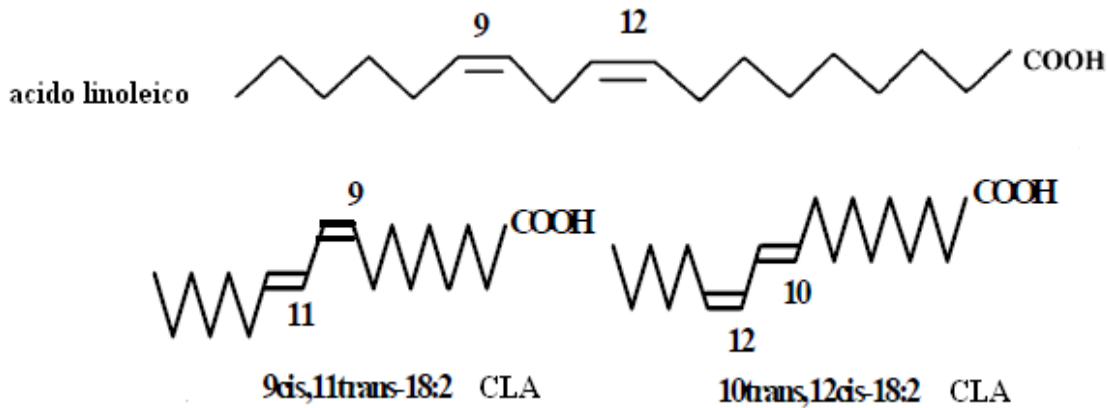


Figura 4.13. - Struttura dell'acido linoleico e dei due principali isomeri dei CLA.

In natura e nelle miscele sintetiche, gli isomeri più abbondanti sono il 9c, 11t detto anche acido rumenico (RA) e il 10t, 12c molto studiati per le diverse attività biologiche.

Le principali risorse alimentari del CLA sono il latte e suoi derivati, e le carni dei ruminanti, dove l'isomero CLA 9c, 11t rappresenta circa il 90% del CLA totale, mentre nei prodotti vegetali tale isomero è presente in quantità limitate.

I CLA furono individuati per la prima volta da Pariza (1985) in uno studio sulle componenti pro-cancerogene della carne bovina sottoposta a cottura con griglia. Questi acidi grassi dienoici trans, derivati dall'acido linoleico (C18:2 ω 6), a differenza di altri acidi grassi trans noti per essere nocivi per la salute umana, mostravano proprietà anti-cancerogene anziché pro-cancerogene.

A tale scoperta, è seguito un largo numero di ricerche sugli effetti dei CLA sulla salute umana, che prevedevano l'impiego di singoli isomeri ad alto grado di purezza o di miscele di isomeri in diverse proporzioni, sia in prove in vivo (su animali da laboratorio) che in vitro (su colture di cellule umane o animali, Mc Guire *et al.* 2000; Romeo, 2001; Lock e Garnsworthy, 2002).

E' comunque ritenuto che le specifiche attività biologiche siano da attribuirsi ai singoli isomeri piuttosto che all'intero pool (McGuire *et al.*, 1999). In particolare è stato accertato che il CLA 9c, 11t possiede proprietà anticancerogene. Infatti nel caso del carcinoma della mammella, l'efficacia del CLA 9c, 11t è dose-dipendente ed è maggiore se la sostanza viene assunta durante lo sviluppo del tumore (Ip *et al.*, 1997). La stessa azione antitumorale è stata osservata per i tumori dell'intestino e della prostata (McGuire *et al.*, 1999; Pariza *et al.*, 2001).

Il meccanismo d'azione non è ancora ben chiaro; è accertato comunque che compete con l'acido linoleico (LA) riducendo la formazione dell'acido Arachidonico (AA), precursore degli eicosanoidi, agenti importanti del processo di carcinogenesi. Soprattutto il CLA 9c, 11t, oltre ad

agire a livello dell'incorporazione dell'acido Arachidonico (AA), induce l'aumento di retinolo (Vitamina A); pertanto l'attività di interferenza nella sintesi degli ecosanoidi e l'aumento del retinolo tissutale potrebbero essere i fattori chiave per spiegare i suoi effetti pleiotropici (McGuire *et al.*, 1999; Pariza *et al.*, 2001).

Nel 2001 Pariza *et al.*, mediante prove su ratti hanno osservato che il CLA 9c, 11t agisce come promotore di crescita senza modificare la composizione corporea. Al contrario l'isomero 10t, 12c, modifica la massa corporea, inducendo l'aumento della massa magra e riducendo la massa grassa. Tale isomero, impedirebbe l'introduzione dei lipidi nelle cellule degli adipociti interferendo con l'attività degli enzimi lipoproteinlipasi e stearoil CoA-desaturasi; in quest'ultimo caso oltre all'inibizione diretta dell'enzima impedirebbe anche la trascrizione del gene con un meccanismo non ancora noto.

L'attività antiaterotogena e ipocolesterolemica dei due isomeri più importanti (9c, 11t e 10t, 12c) è stata documentata con prove su ratti, in cui, in seguito alla somministrazione agli animali di diete arricchite con CLA, si osserva diminuzione del colesterolo LDL plasmatici e conseguente decremento della formazione di placche ateromatose. A integrazione di questo effetto, benché il meccanismo completo non sia ancora noto, ci sarebbe che i due isomeri CLA, attraverso l'azione di competizione con l'AA, responsabile delle sintesi dei fattori promotori l'aggregazione delle placche ateromatose (TXA₂), inibirebbe la ciclossigenasi, che è un enzima molto attivo nella cascata dell'arachidonico.

Gli effetti positivi sul Diabete di tipo II sono correlati al miglior utilizzo del glucosio plasmatico e alla maggior efficienza dell'azione dell'insulina, con modalità non ancora conosciute. Infine, andando agli aspetti generali, nei ratti, l'assunzione elevata di CLA, ottenuta con una dieta a base di burro arricchito, determina un arricchimento di RA CLA 9c, 11t nei tessuti dovuto anche alla desaturazione dell'acido vaccenico (C18:1 11t, VA) ad opera dell'enzima Stearoil CoA-Desaturasi (SCD).

4.2.5.2 Biosintesi dell'acido linoleico coniugato (CLA)

Il CLA è un prodotto intermedio del processo della bioidrogenazione degli acidi grassi polinsaturi che avviene in condizioni fisiologiche nel rumine ad opera di batteri anaerobi, in particolare del *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler *et al.*, 1966).

La bioidrogenazione dell'acido linoleico coinvolge almeno due stadi ed almeno due distinte popolazioni di batteri ruminanti.

A tal proposito la microflora batterica è suddivisibile in due gruppi in funzione del tipo di reazione che catalizzano e dei relativi prodotti finali: (Bauman *et al.*, 1999):

- Batteri del gruppo A, capaci di idrogenare gli acidi linoleico e α -linolenico, producendo principalmente C18:1 11t;
- Batteri del gruppo B, capaci di utilizzare il C18:1 11t come principale substrato per la produzione di acido stearico (C18:0).

La sequenza di bioidrogenazione dell'acido linoleico (C18:2 9c, 12c) inizia con l'isomerizzazione del doppio legame dalla posizione 12 a quella 11, formando così il CLA 9c, 11t. L'enzima responsabile della formazione di doppi legami coniugati a partire dai doppi legami 9c, 12c dell'acido linoleico e degli acidi α - e γ -linolenico è la linoleate isomerasi (EC 5.2.1.5), enzima parzialmente purificato e le cui proprietà cinetiche sono state caratterizzate in diverse specie batteriche (Kepler e Tove, 1967; Kepler *et al.*, 1970; Yokoyama e Davis, 1971; Kemp *et al.*, 1984). Normalmente quest'isomerasi è legata alla membrana cellulare batterica (Griinari e Bauman, 1999) e può utilizzare, come substrato, sia l'acido linoleico sia il linolenico, in quanto entrambi posseggono una struttura a dieni 9c, 12c ed un gruppo carbossilico libero (Kepler *et al.*, 1970).

L'isomerizzazione è seguita da una rapida idrogenazione del legame 9c, ad opera di una riduttasi (Hughes *et al.*, 1982), che porta alla conversione del CLA 9c, 11t in C18:1 11t (acido vaccenico, VA), il più abbondante trans-isomero nei tessuti dei ruminanti. L'idrogenazione di quest'ultimo avviene con minore rapidità, determinando un suo accumulo a livello ruminale (Keeny, 1970) (Figura 4.14).

L'acido vaccenico (C18:1 11t) può a sua volta essere ridotto, mediante una riduttasi microbica, ad acido stearico (C18:0) (Harfoot and Hazlewood, 1988).

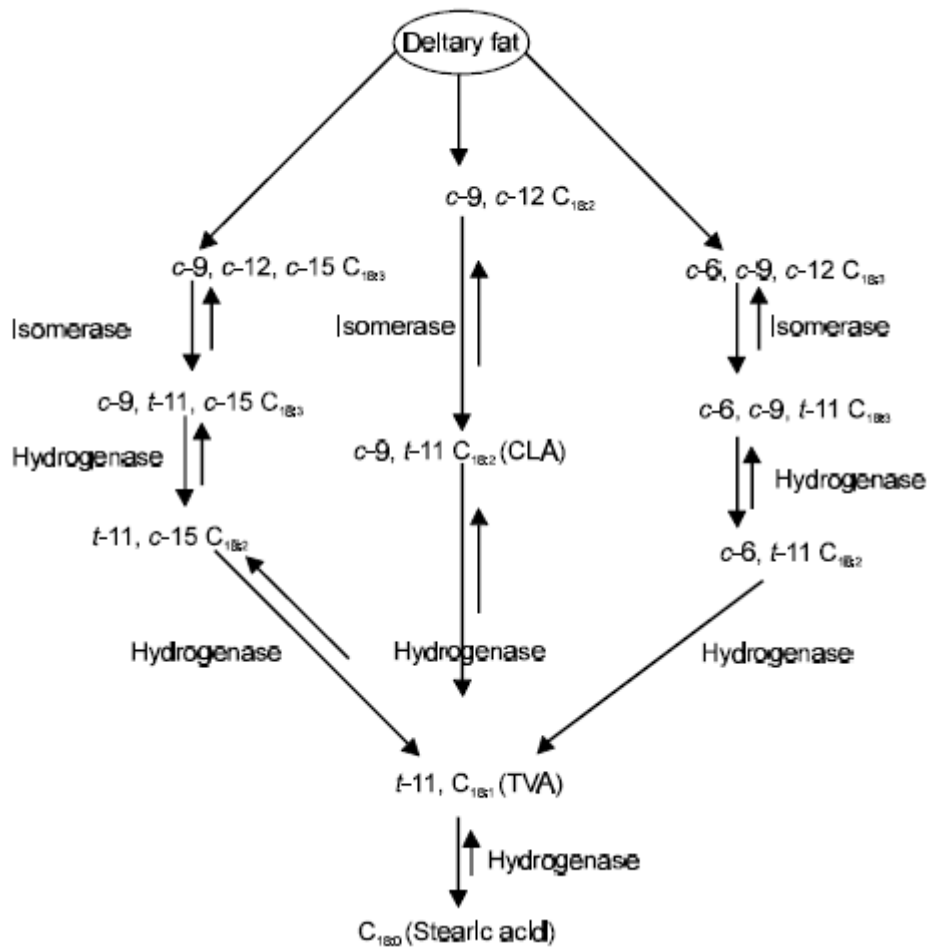


Figura 4.14 - Processo di bioidrogenazione degli acidi linoleico e linolenico nel ruminante (adattato da Harfoot & Hazlewood, 1988).

Anche la bioidrogenazione dell'acido α -linolenico ($C_{18:3}$ 9c, 12c, 15c) inizia con un'isomerizzazione, seguita da una sequenza di riduzioni per terminare con la formazione di acido stearico ($C_{18:0}$). La bioidrogenazione ruminale dell'acido α -linolenico porta alla formazione di 9c, 11t, 15c, acido coniugato octadecatrienoico, come predominante prodotto iniziale dell'isomerizzazione, seguita dalla riduzione dei doppi legami cis. Di conseguenza, l'acido trans vaccenico rappresenta il prodotto intermedio comune della bioidrogenazione degli acidi linoleico ed α -linolenico. Analogamente, anche la bioidrogenazione dell'acido γ -linolenico ($C_{18:3}$ 6c, 9c, 12c, acido octadecatrienoico) porta alla formazione di acido trans vaccenico (Harfoot e Hazelwood, 1988; Griinari e Barman, 1999).

Griinari *et al.* (1998) hanno evidenziato come le modificazioni dell'ambiente ruminale, indotte dalla somministrazione di diete caratterizzate da un basso rapporto foraggi:concentrati, si associno a variazioni del contenuto in acido trans vaccenico nel latte. In questa situazione, l'acido

octadecenoico 10t sostituisce il C18:1 11t, diventando l'isomero trans del C18:1 più abbondante nel grasso del latte.

Sono state avanzate diverse ipotesi sui meccanismi che portano alla produzione dell'acido octadecenoico 10t (Griinari e Bauman, 1999, Figura 4.15). La più plausibile di queste prevede l'azione di una specifica 9c, 10t isomerasi di origine batterica che porterebbe alla formazione dei doppi legami coniugati 10t, 12c. Quest'ipotesi è avvalorata dal fatto che la somministrazione di diete a basso contenuto di fibra induce un aumento della concentrazione di CLA 10t, 12c nel latte (Griinari e Bauman, 1999). Infatti la 12c, 11t isomerasi prodotta dal *B. fibrisolvens* può idrogenare il CLA 10t, 12c (Kepler *et al.* 1966), producendo acido octadecenoico 10t. E' stato dimostrato che più del 50% di acido linoleico è stato convertito a CLA 10t, 12c e solo il 10% viene convertito a C18:1 10t dal batterio anaerobio *Propionibacterium* isolato da topo cieco (Verhulst *et al.*, 1987).

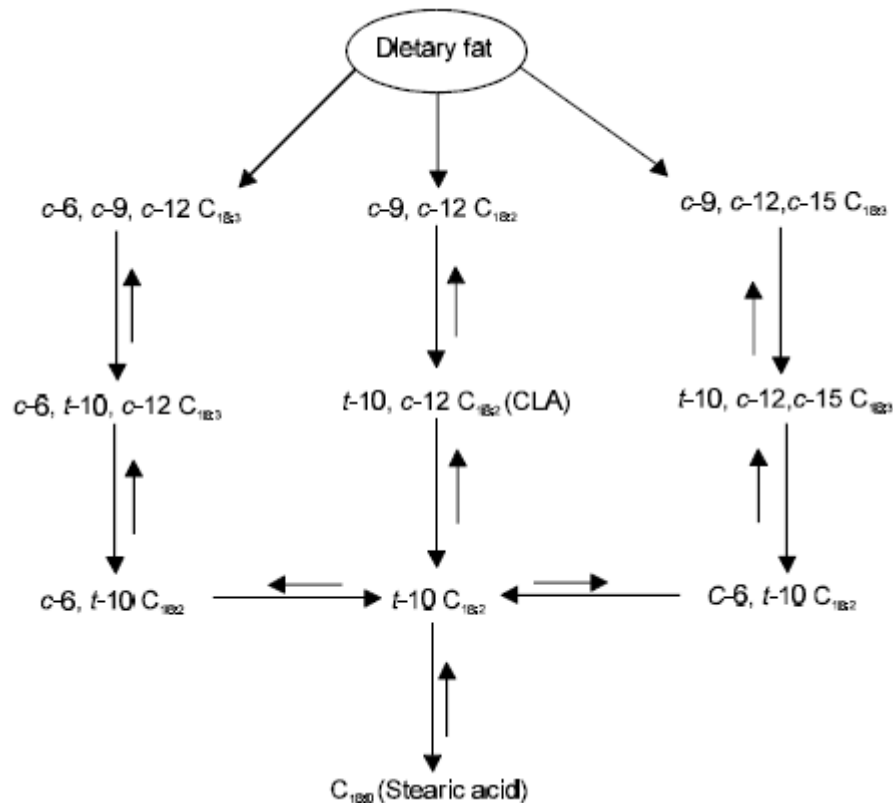


Figura 4.15 - Processo di biodrogenazione degli acidi linoleico e linolenico nel rumine proposta da Griinari e Bauman (1999).

Numerose osservazioni effettuate sia in vivo sia in vitro hanno portato ad ipotizzare che non tutti i CLA presenti nel latte e nella carne dei ruminanti potessero originare dalla bioidrogenazione dell'acido linoleico nel rumine. In particolare, Banni *et al.* (1996) riscontrarono alte concentrazioni di CLA 9c, 11t nel latte di pecore alimentate esclusivamente con il pascolo, ricco in acido linolenico, ma non in linoleico. Inoltre, anche l'arricchimento alla razione con oli di pesce, che sono ricchi di PUFA con 20 o più atomi di carbonio e non producono né CLA né acido vaccenico come prodotti intermedi della bioidrogenazione, porta ad un aumento del contenuto di CLA 9c, 11t nel latte (Franklin *et al.*, 1999; Donovan *et al.*, 2000). Alla luce di tali osservazioni, si iniziò ad ipotizzare che la sintesi ruminale di CLA non fosse né l'unica né la principale fonte dei CLA del latte e della carne. In seguito fu proposto che i CLA potessero essere sintetizzati per via endogena a partire dall'acido vaccenico ad opera di una $\Delta 9$ -desaturasi (Parodi, 1994). Ricerche successive, effettuate utilizzando diversi tipi di diete (Jiang *et al.*, 1996; Griinari e Bauman, 1999), dimostrarono che era il contenuto dell'isomero C18:1 11t ad essere direttamente proporzionale a quello del CLA 9c, 11t nel grasso del latte. Secondo Griinari *et al.* (2000) il contributo della sintesi endogena al contenuto totale di CLA nel latte sarebbe pari al 64%, mentre Lock e Garnsworthy (2002) stimarono un'incidenza superiore all'80%. Secondo Piperova *et al.* (2002) il contributo della sintesi ruminale di CLA sarebbe pari solo al 4-7%. Per Kay *et al.* (2002), infine, la sintesi endogena sarebbe del 100% e tale ipotesi è supportata dall'osservazione che la concentrazione ematica di CLA è nulla o minima (Khanal *et al.*, 2002; Loor *et al.*, 2002). Secondo Gillis *et al.* (2003) circa l'86% del CLA 9c, 11t del grasso della carne bovina viene prodotto dalla desaturazione dell'acido vaccenico. La desaturazione endogena dell'acido vaccenico a CLA 9c, 11t, inoltre, aumenterebbe con l'aumentare della quantità di foraggio nella dieta del ruminante (Sackman *et al.*, 2003). Sebbene il meccanismo di sintesi endogena sia stato trovato sia per i ruminanti che per i non ruminanti (Glaser *et al.*, 2000; Loor *et al.*, 2002; Turpeinen *et al.*, 2002) la disponibilità di acido vaccenico è più elevata nei ruminanti a causa della bioidrogenazione ruminale (Bessa *et al.*, 2000) (Figura 4.16). E' stato ipotizzato che anche l'organismo umano sia in grado di convertire l'acido vaccenico introdotto con la dieta in CLA, mediante meccanismo di sintesi endogena a cui partecipa la Δ -9 desaturasi (Bauman *et al.*, 1999). Turpeinen *et al.* (2002), hanno stimato che mediamente l'uomo può convertire per via endogena il 19% di acido vaccenico in acido rumenico. Banni *et al.* (2001) hanno dimostrato che una dieta contenente il 2% di acido vaccenico nei ratti non solo aumentava la concentrazione di acido rumenico nei tessuti, ma aveva anche un effetto protettivo contro lo sviluppo di tumori alla mammella, un effetto simile è stato successivamente riportato da Lock *et al.* (2004).

La fonte principale di CLA nella dieta umana sembra essere la carne dei ruminanti e prodotti a base di carne così come il latte ed i prodotti caseari (Adlof *et al.*, 2000; Kraft & Jahreis, 2001, Turpeinen *et al.*, 2002).

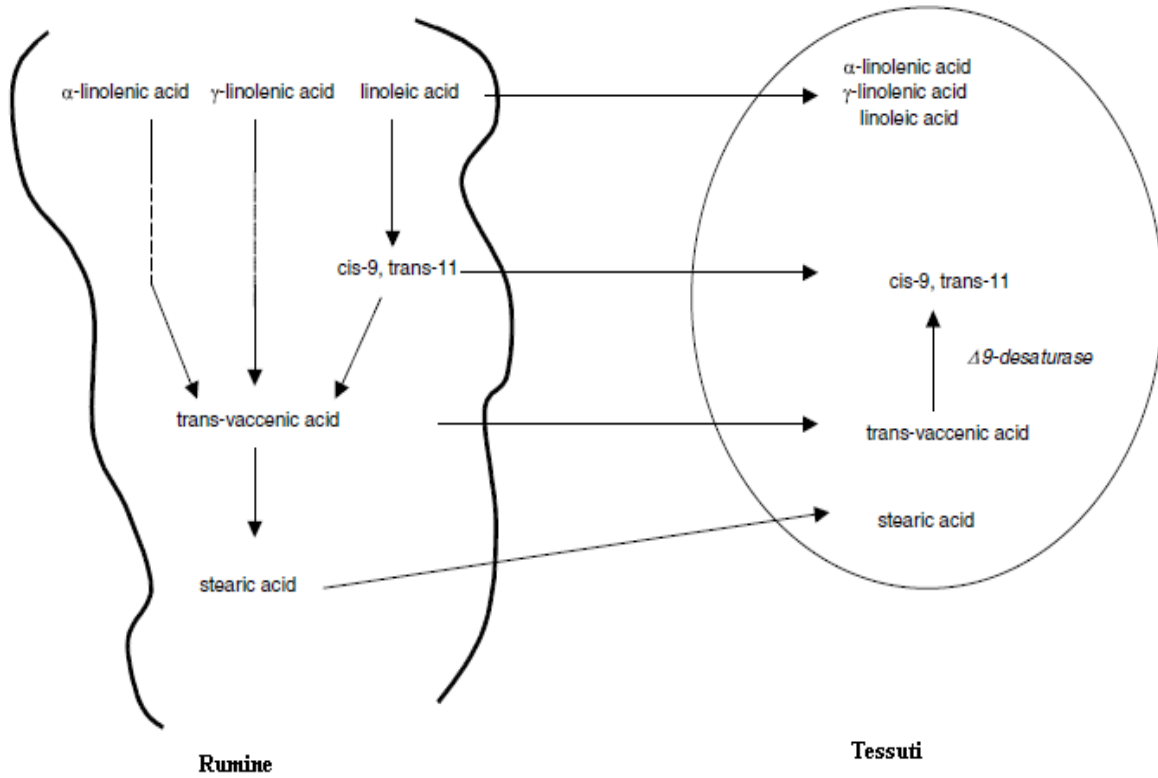


Figura 4.16 - Biosintesi di C18:2 9c, 11t ((Griinari & Bauman, 1999) modificata).

4.3 Triacilgliceroli

I triacilgliceroli (Figura 4.17) sono i lipidi più abbondanti (oltre il 96% del totale) di origine naturale, e costituiscono i grassi animali e gli oli vegetali. Essi sono costituiti da tre molecole di acidi grassi legate ai gruppi ossidrilici di una molecola di glicerolo tramite un legame estereo. Quelli che presentano i tre acidi grassi uguali sono chiamati triacilgliceroli semplici e prendono il nome dell'acido grasso costituente. Normalmente i grassi di origine naturale contengono due o più acidi diversi; in questo caso vengono chiamati triacilgliceroli misti. Sono presenti in misura molto minore anche Di e Monogliceridi (DG e MG). I triacilgliceroli contenenti prevalentemente acidi grassi saturi possono adottare una conformazione estesa di tipo *trans*; quindi allo stato cristallino, si impaccano regolarmente grazie a molte interazioni idrofobiche. Al contrario, la presenza di uno o più doppi legami *cis* tende a produrre aggregati meno stabili. Pertanto, i grassi contenenti elevate quantità di acidi grassi insaturi hanno punto di fusione più bassi rispetto ad acidi grassi saturi con una lunghezza di catena simile. Infatti i lipidi di origine animale (contenuti abbondantemente in burro, strutto e sego e costituiti principalmente da acidi grassi saturi) sono perlopiù solidi a temperatura ambiente. I grassi vegetali, invece, contengono perlopiù acidi grassi insaturi e sono liquidi a temperatura ambiente, e sono detti oli. Gli oli vegetali possono comunque essere idrogenati a grassi saturi e quindi solidi (come nel caso della margarina).

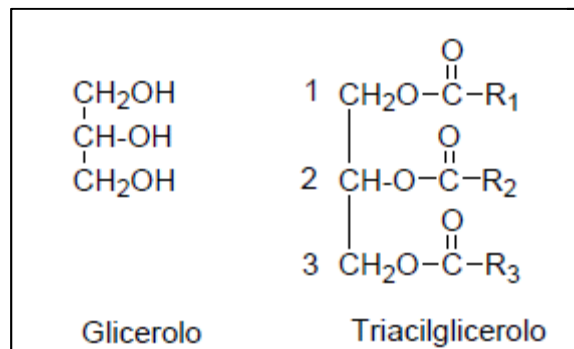


Figura 4.17 - Struttura dei triacilgliceroli R_1 , R_2 e R_3 : acidi grassi.

4.4 Fosfolipidi

I fosfolipidi (PL) sono molecole organiche appartenenti alla classe dei lipidi idrolizzabili, che comprende tutti i lipidi caratterizzati da almeno un acido grasso nella loro struttura. Essi sono i principali costituenti delle membrane cellulari, nelle quali si dispongono in un doppio strato orientando le teste polari all'esterno e le code idrofobiche all'interno. Ciò permette di controllare il flusso delle sostanze che entrano ed escono dalla cellula. Rivestono inoltre una grande importanza nella sintesi delle lipoproteine plasmatiche e nella sintesi degli eicosanoidi. Alcune di queste molecole servono come segnali, come gli ormoni trasportati dal sangue da un tessuto a un altro, o come messaggeri intracellulari generati in risposta a un segnale extracellulare (ormone, o fattore di crescita). Altri funzionano come cofattori di enzimi nelle reazioni di trasferimento degli elettroni, nei cloroplasti o nei mitocondri, o nel trasferimento degli zuccheri in una varietà di reazioni di glicosilazione (Lehninger *et al.*, 2002).

Come costituenti di tutte le cellule, i fosfolipidi sono presenti anche a diverse concentrazioni in vari alimenti. I lipidi di origine alimentare contengono circa il 10% di fosfolipidi di cui fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) sono i due maggior costituenti (Tabella 4.5).

I fosfolipidi introdotti con la dieta vengono assorbiti nel lumen intestinale dove vengono degradati da particolari enzimi. La fosfatidilcolina tramite l'enzima fosfolipase A2 viene scissa in acidi grassi e lisofosfatidilcolina che sono successivamente assorbiti dalla mucosa intestinale.

Alcuni studi sui ratti hanno suggerito che circa metà della fosfatidilcolina somministrata per via orale veniva assorbita come lisofosfatidilcolina, mentre l'altra metà veniva degradata a glicerorofosfatidilcolina o fosforilcolina (Lekim & betzing, 1976).

La fosfatidilserina presente nella dieta può essere sintetizzata nel fegato e nelle cellule intestinali. Viene idrolizzata nel lumen intestinale per dare lisofosfatidilserina e successivamente assorbita e convertita in fosfatidilserina nelle mucose cellulari (Bruni *et al.*, 1989).

I fosfolipidi sono stati utilizzati per lungo tempo nell'industria alimentare come emulsionanti e stabilizzatori di emulsioni.

Recentemente è stato provato che i fosfolipidi di origine alimentare hanno effetti positivi sulla salute umana. In particolare riducono i livelli di colesterolo nel sangue (Eckhardt *et al.*, 2002); migliorano la funzione cerebrale (Pepeu *et al.*, 1996), hanno proprietà antiossidante e batteriostatica (Saito & Ishihara, 1997; Sprong *et al.*, 2002). Gli sfingolipidi inoltre hanno effetti inibitori per il cancro al colon (Vesper *et al.*, 1999, Duan, 2005).

In relazione alla struttura chimica, i fosfolipidi sono suddivisibili in due categorie:

- Fosfogliceroli (o fosfogliceridi),
- Sfingofosfolipidi.

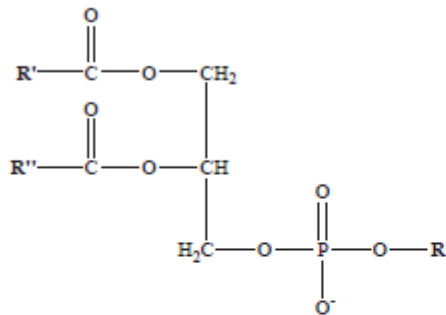
Tabella 4.5 - Contenuto dei lipidi totali e dei fosfolipidi in alcuni alimenti (Weihrauch & Son, 1983).

Alimenti	Lipidi totali (g/100g di prodotto)	PL totali (mg/100g di prodotto)	PC	PE	PI	PS	SPH	LPC	PA
Soia	20.8	2.038	917	536	287	-	-	-	102
Tuorlo d'uovo	31.8	10.306	6.771	1.917	64	-	486	419	-
Latte	3.7	34	12	10	1	2	9	-	-
Manzo	4.1	660	407	207	-	-	46	-	-
Farina	1.0	251	47	10	-	-	78	-	-
Mele	0.09	40	21	10	0.4	6	-	-	0.6
patate	0.15	76	38	22	1	12	-	-	0.4

Abbreviazioni: PL, fosfolipidi totali; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositolo; PS, fosfatidilserina; SPH, sfingomielina; LPC, liso-fosfatidilcolina; PA, acido fosfatidico.

4.4.1 Glicerofosfolipidi

I glicerofosfolipidi, detti anche fosfogliceridi, sono costituiti da una molecola di glicerolo esterificata nelle posizioni sn-1 ed sn-2 con due molecole di acidi grassi, mentre la testa altamente polare o carica è legata con un legame fosfodiesterale al terzo atomo di carbonio in posizione sn-3, (Figura 4.18).



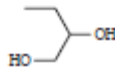
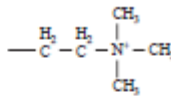
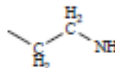
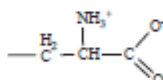
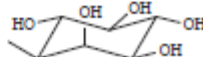
Phospholipid	Head group R	Structure of -R
Phosphatidic acid	Hydrogen	- H
Phosphatidylglycerol	Glycerol	
Phosphatidylcholine	Choline	
Phosphatidylethanolamine	Ethanolamine	
Phosphatidylserine	Serine	
Phosphatidylinositol	Inositol	

Figura 4.18 - Struttura chimica e classificazione dei glicerofosfolipidi in base al gruppo polare di testa R (R' e R'' sono acidi grassi esterificati).

Quindi i fosfolipidi sono trigliceridi in cui due ossidrili sono esterificati con altrettante molecole di acidi grassi mentre il terzo è esterificato con acido fosforico che a sua volta può essere legato ad una molecola polare come un alcol, un amminoalcol o un polialcol (ad es. l'inositolo). Il fosfolipide più semplice viene chiamato acido fosfatidico.

I glicerofosfolipidi prendono il nome dal loro precursore, l'acido fosfatidico, e dai gruppi polari alcolici della testa, per esempio, la fosfatidilcolina e la fosfatidiletanolamina hanno rispettivamente colina ed etanolamina nelle loro teste polari. In questi composti la testa polare è unita mediante un ponte fosfodiesterico e il gruppo fosforico ha una carica negativa a pH 7. La struttura alcolica polare può essere carica negativamente come nel caso del fosfatidilinositolo 4,5 bisfosfato, neutra, come nella fosfatidilserina o carica positivamente come nella fosfatidilcolina e nella fosfatidiletanolamina. Gli acidi grassi nei glicerofosfolipidi possono creare diversità considerevoli, la fosfatidilcolina per esempio, può esistere sotto forma di specie molecolari diverse, ognuna con una propria composizione in acidi grassi. La distribuzione di queste specie molecolari è diversa da organismo a organismo e da tessuto a tessuto nello stesso organismo, mentre la stessa cellula o lo stesso tessuto contengono tipi diversi di glicerofosfolipidi.

In genere i glicerofosfolipidi contengono un acido grasso saturo solitamente da 16 a 18 atomi di carbonio in posizione sn-1 del glicerolo e un acido grasso insaturo da 18 a 20 atomi di carbonio in posizione sn-2.

Fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina sono stati i primi fosfolipidi trovati all'interno della membrana citosolica (Bever *et al.*, 1998).

I fosfolipidi più abbondanti nei tessuti animali sono le fosfatidilcoline che tipicamente contengono come acidi grassi saturi palmitico (C16:0) o stearico (C18:0) e come acidi grassi insaturi acido linoleico (C18:2 9c, 12c) o arachidonico (C20:4 5c, 8c, 11c, 14c).

Buang *et al.*, (2005) hanno dimostrato che nei ratti alimentati con fosfatidilcolina a cui è stato somministrato acido orotico (vitamina B13) si attenua la steatosi epatica (fegato grasso) attraverso la soppressione della lipogenesi epatica. Recentemente è stato osservato che gli ω 3 – PC delle uova di salmone, ricche in EPA e DHA prevengono lo sviluppo di disturbi legati all'obesità tramite la soppressione del gene lipogenico e l'aumento dell'espressione del gene lipolitico nel fegato di ratti obesi (Shirouchi *et al.*, 2007).

Alcuni ricercatori hanno condotto diversi studi per verificare l'effetto della fosfatidilcolina sui danni provocati dalle bevande alcoliche nel fegato. Il primo fu condotto da Lieber *et al.*, (1990) su due gruppi di babbuini. Il primo gruppo era alimentato con una dieta liquida, a base di fosfolipidi estratti da soia (4,1 mg/kcal), contenente alte quantità di fosfatidilcolina polinsatura più etanolo (50% dell'energia totale) o carboidrati. Il gruppo di controllo veniva alimentato con la

stessa dieta ma senza l'estratto liquido. Entrambi i gruppi mostravano un uguale aumento dei lipidi plasmatici, ma differenze nel grado di cirrosi sviluppata. Uno studio successivo ha determinato che la fosfatidilcolina è un agente attivo nella protezione contro le malattie al fegato indotte da alcool, infatti i babuini alimentati con una dieta senza fosfatidilcolina sviluppavano cirrosi mentre quelli supplementati con fosfatidilcolina no. Una dieta supplementata con fosfatidiletanolamina, acidi grassi liberi o colina non ha invece avuto effetti positivi (Lieber *et al.*, 1994).

La fosfatidilserina è distribuita in piccole quantità negli animali e in quantità maggiori nelle piante e nei microorganismi. E' localizzata nella parte interna delle membrane cellulari e comprende il 10-20% dei lipidi totali costituenti il doppio strato delle membrane cellulari dove svolgono funzioni molto importanti. La fosfatidilserina come tutti gli altri fosfolipidi è deacilata dalla fosfolipasi A₂. La sua deacilazione porta alla formazione di lisofosfatidilserina (lysoPtdSer) che esercita azioni biochimiche e farmacologiche. E' stato osservato che le fosfatidilserine preparate sinteticamente come 1,3 dipalmitoil-sn-glicerol-2-fosforilserina e colesterilfosforilserina (Hermetter *et al.*, 1982) hanno azione farmacologica, la prima sul sistema nervoso centrale (CNS) (Pepeu *et al.*, 1993) e la seconda sulla risposta immunitaria (Bruni *et al.*, 1995).

La fosfatidilserina è in grado di migliorare le alterazioni comportamentali associate all'età in modelli animali, per cui si pensava che essa potesse avere un impatto positivo sulla cognizione negli esseri umani, in particolare su quelle funzioni che vengono compromesse durante l'invecchiamento, come la memoria e il linguaggio (Pepeu *et al.*, 1996; 2003). Pertanto si è ritenuto che la fosfatidilserina può essere utile nella prevenzione e nel trattamento delle malattie associate all'età come il morbo di Alzheimer, nella depressione e per altri disturbi cognitivi (Pepping, 1996).

Nel corso degli anni, varie prove sono state condotte su pazienti con malattia di Alzheimer o con altro deficit cognitivo, ma i risultati sono stati inconsistenti (Amaducci, 1988; Jorissen *et al.*, 2001). Gli studi clinici, comunque indicano che la fosfatidilserina potrebbe ridurre il declino cognitivo legato all'invecchiamento, ma a tutt'oggi non ci sono dati convincenti per dimostrare la sua efficacia clinica.

Yanagita nel 2003 ha osservato in un esperimento su animali, che il fosfatidilinositolo proveniente dalla dieta influenzava il livello dei lipidi nel fegato e nel plasma ed era associato con l'inibizione della sintesi dei trigliceridi (TAG) attraverso la soppressione dell'attività della fosfatidilfosfolipasi e della diacilglicerolo aciltransferase.

Una ulteriore suddivisione dei fosfolipidi si basa sul tipo di legame che coinvolge l'acido grasso in posizione sn-1. I legami possono essere di tipo estereo, vinil etere o alchil etere.

Alcuni tessuti animali e alcuni organismi unicellulari sono ricchi di lipidi-etere, in cui una delle due catene aciliche è legata al glicerolo con un legame etere invece che estere. La catene

legata con un legame etere può essere satura, come nei lipidi-etere alchilici, oppure può contenere un doppio legame tra il C-1 ed il C-2 come nei plasmalogeni.

I plasmalogeni, principalmente plasmenilcolina e plasmeniletanolamina (Figura 4.19), costituiscono circa il 18% dei fosfolipidi delle membrane delle cellule miocardiche, muscolari striate e cellule nervose. La funzione dei plasmalogeni nelle membrane cellulari non è del tutto chiara, tuttavia si ritiene che conferiscano alla membrana cellulare una resistenza alle fosfolipasi che staccano dai lipidi gli acidi grassi legati con legami esterei.

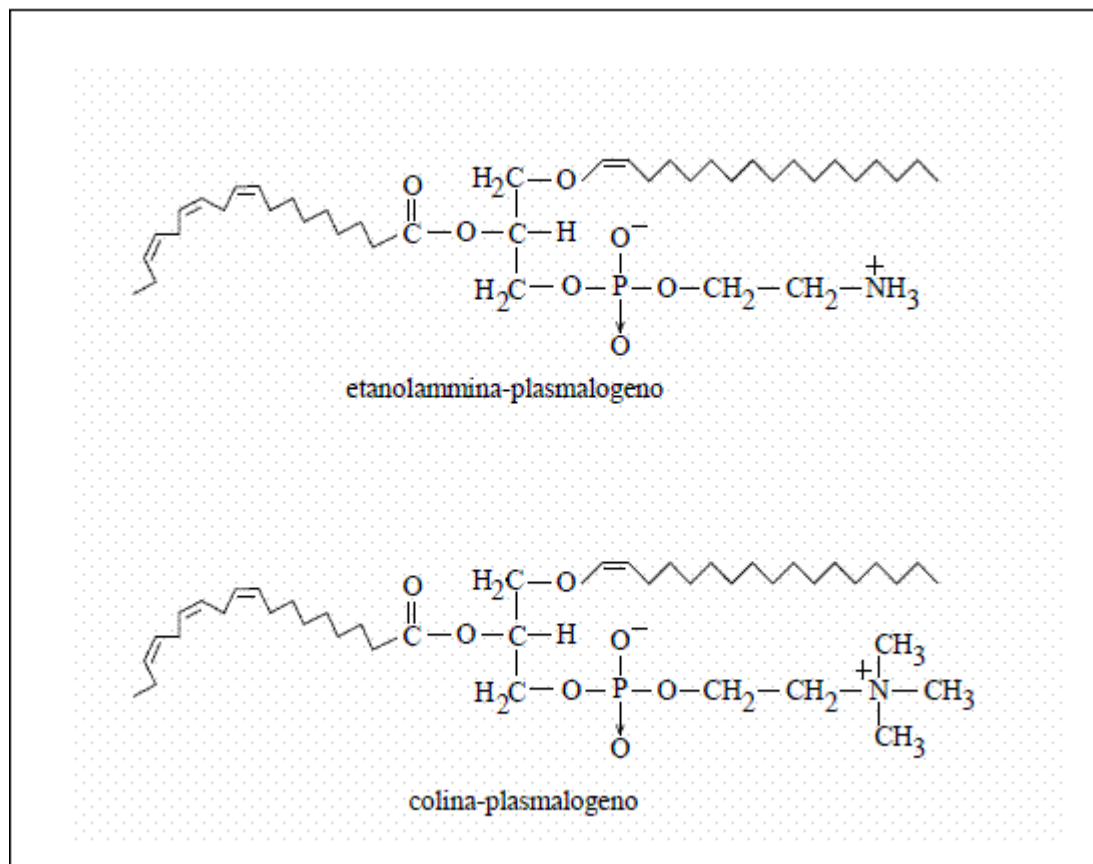


Figura 4.19 - Plasmenilcolina e Plasmeniletanolamina.

4.4.2 Sfingolipidi

La “sfingosina” fu descritta per la prima volta da J.L.W. Thudichum nel 1884 e strutturalmente caratterizzata, come 2S, 3R, 4E-2-aminoottadec-4-ene-1,3-diolo, successivamente nel 1947 da Herbert Carter, che ha anche proposto il nome dei lipidi derivati dalla sfingosina come “sfingolipidi”.

Gli sfingolipidi sono localizzati nelle membrane cellulari, nelle lipoproteine (specialmente LDL), ed in altre strutture ricche in lipidi quali la pelle. Essi sono di importanza fondamentale per il mantenimento della struttura della membrana, modulano il comportamento dei recettori del fattore crescita e le proteine delle matrici extracellulari (Hakomori, 1991), inoltre fungono da siti di legame per alcuni microrganismi, tossine microbiche e virus (Bennun *et al.*, 1989; Fantini *et al.*; 1993, Karlsson, 1986). Dal punto di vista strutturale tali composti sono caratterizzati dalla presenza di un ammino-alcol a catena lunga, la sfingosina, o da un suo derivato, da una molecola di acido grasso a catena lunga e da una testa polare alcolica unita in alcuni casi da un legame glicosidico, in altri da un ponte fosfodiesterico (Figura 4.20).

Come per altri lipidi di membrana, gli sfingolipidi sono molecole anfipatiche per la presenza di una porzione idrofobica e una testa polare variabile. Tale caratteristica garantisce loro la possibilità di permanere nelle membrane e affacciarsi contemporaneamente verso compartimenti citoplasmatici o extracellulari acquosi.

Gli atomi di carbonio C-1, C-2 e C-3 della sfingosina sono strutturalmente analoghi ai tre atomi di carbonio del glicerolo nei glicerofosfolipidi. Quando una molecola di acido grasso si lega mediante legame amidico al gruppo $-NH_2$ sull'atomo di carbonio in posizione sn2 della sfingosina, si forma un ceramide, che è simile strutturalmente ad un diacilglicerolo. Il ceramide è l'unità fondamentale comune a tutti gli sfingolipidi.

Vi sono tre sottoclassi di sfingolipidi, derivate tutte dal ceramide, ma diverse per le loro teste polari:

- ❖ Le sfingomieline;
- ❖ I glicolipidi neutri;
- ❖ I gangliosidi.

Le sfingomieline contengono come testa polare fosfocolina o fosfoetanolamina, sono presenti nella membrana plasmatica delle cellule animali, e sono particolarmente rappresentate nella mielina, una guaina membranosa che circonda e isola gli assoni di alcuni neuroni.

I glicosfingolipidi, localizzati sulla superficie esterna delle membrane plasmatiche, hanno una testa polare costituita da uno o più zuccheri legati direttamente al gruppo ossidrilico del C-1 del

ceramide e non contengono fosfato. I cerebrosidi, chiamati anche glicolipidi neutri, in quanto non posseggono carica a pH 7, hanno un'unica unità saccaridica legata ad un ceramide, quelli con galattosio si trovano nella membrana plasmatica del tessuto neurale, e quelli con glucosio nella membrana plasmatica di cellule di tessuti diversi da quello nervoso. I globosidi sono glicosfingolipidi neutri con due o più zuccheri, di solito D-glucosio o N-acetil-D-galatosammina.

I gangliosidi, gli sfingolipidi più complessi, hanno teste polari formate da oligosaccaridi complessi, che terminano con uno o più residui di acido N-acetilneuramminico (acido sialico), sono localizzati nelle membrane plasmatiche e particolarmente abbondanti nelle cellule del tessuto nervoso.

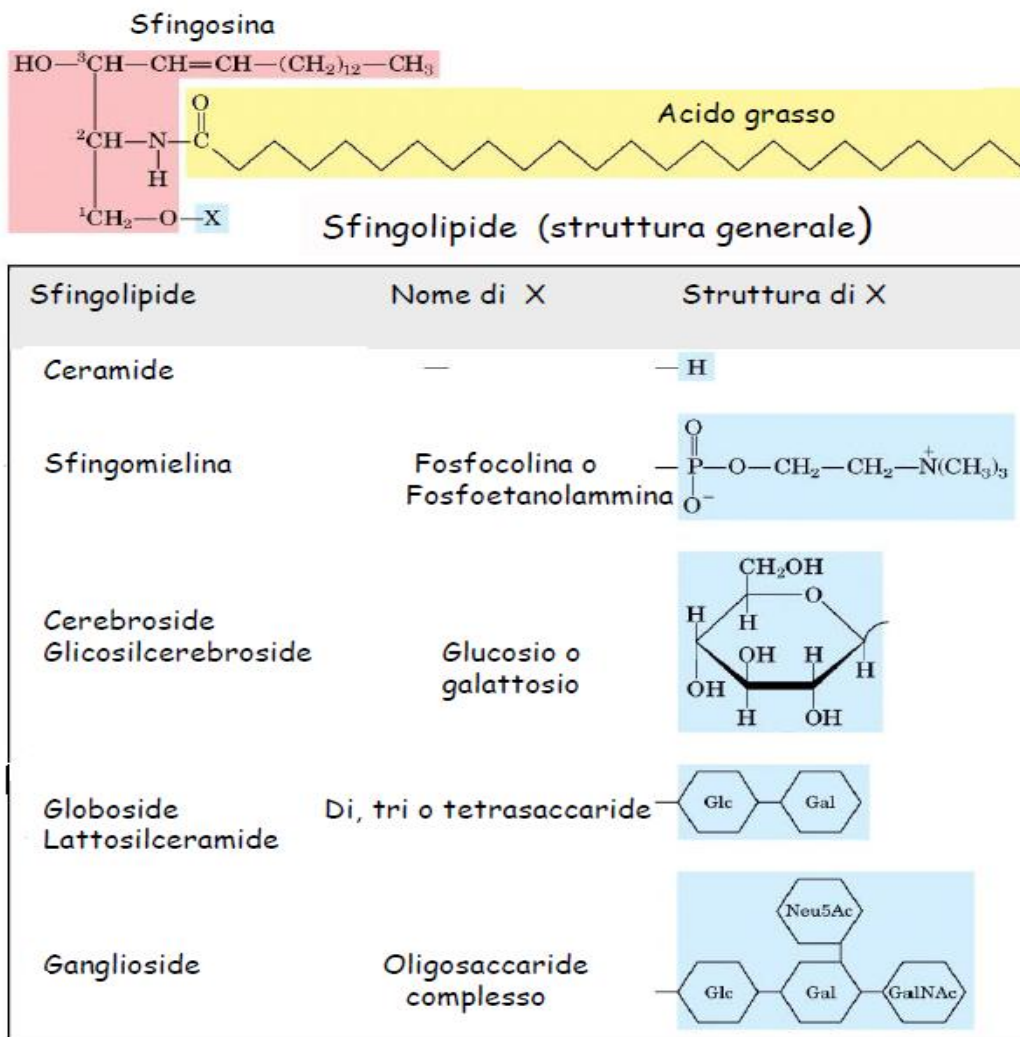


Figura 4.20 - Formula degli sfingolipidi.

Negli uomini sono stati identificati più di 400 sfingolipidi differenti per lunghezza della sfingosina, grado di saturazione degli acidi grassi e per il gruppo di testa, inoltre gli sfingolipidi sono presenti in molti alimenti (Tabella 4.6).

Tabella 4.6 - Contenuto di sfingolipidi in alcuni alimenti e loro consumo annuo pro capite (Vesper et al., 1999).

Food sources	Sphingolipid content ¹	Food consumed per capita ²	Sphingolipids consumed per capita	Reference
	$\mu\text{mol/kg}$	kg/y	$\mu\text{mol/y}$	
Dairy products ³			38,464	
Milk (3.5%)	160	36	5764	Zelsel et al. 1986; Newburg and Chaturvedi 1992;
Lowfat Milk (<2%)	92	60	5486	Jensen 1995
Cream (37%)	1692	1	1692	
Cheese (29%)	1326	12	15,912	
Frozen dairy (11%)	503	14	7042	
Evaporated and condensed (9%)	412	4	1648	
Butter	460	2	920	Zelsel 1994
Meat products and fish			34,270	Blank et al. 1992
Beef and veal	390	29	11,310	
Pork	350	23	8050	
Chicken	530	22	11,660	
Turkey	390	6	2340	
Fish	130	7	910	
Eggs	2250	14	31,500	Zelsel 1994
Vegetables			8122 [33,782] ⁹	
Bell peppers	36	3	108	Whitaker 1996
Tomato	424	41	1722	Whitaker 1996, Zelsel 1994
Potato	694	64	4116	Galliard 1968a, Zelsel 1994
Sweet potato	669 ⁵	2	1338	Walter et al. 1971
Spinach	67 ⁵	0.3	20	Ohnishi et al. 1983
Soybeans	2410 ⁵	NA		Ohnishi and Fujino 1982
Cauliflower	183 ⁶	1	183	Zelsel 1994
Cucumber	27 ⁶	5	135	Zelsel 1994
Lettuce	50 ⁶	10	500	Zelsel 1994
Other vegetables			[25,660] ⁷	7
Fruits			3179 [5387] ⁹	
Apples	69	25	1725	Galliard 1968b
Orange	24 ⁶	40	960	Zelsel 1994
Peanuts	78 ⁶	3	234	Zelsel 1994
Banana	20 ⁶	13	260	Zelsel 1994
Other fruits			[2208] ⁸	8
Cereals				
Wheat flour	576 ⁵	66	38,016	Laine & Renkomen 1974
Total sphingolipid intake ($\mu\text{mol/y}$)			153,551	[181,419] ⁹
Total sphingolipid intake (g, calculated as sphingomyelin)			116	[139] ⁹

¹ Sum of sphingomyelin and glycosphingolipids. Where the amounts have been published in grams, the conversion to moles was calculated using an average molecular weight for sphingomyelin of 751 g/mol or an average molecular weight for glycosylceramide of 747 g/mol.

² Putman and Allhouse 1995

³ Dairy calculated with a density of milk of 1.03 g/mL. Milk (<2%) includes lowfat milk, skim milk, buttermilk and dry milk products. Sphingolipid estimate for whole milk based on the sum of ca 120 μmol sphingomyelin/kg (Zelsel et al. 1986), 26 μmol cerebrosides/kg (Newburg & Chaturvedi, 1992) and 14 μmol gangliosides/kg (Jensen 1995). For other sources, the estimates have been based on the average milk fat content of the product (shown in brackets; data obtained from USDA Nutrition Database for Standard Reference, Release 12, March 1998) and the sphingolipid content of the fat component of whole milk.

⁴ Sum of reported contents of sphingomyelin and glycolipids.

⁵ Estimation based on glycolipid content only.

⁶ Estimation based only on reported sphingomyelin content (glycosphingolipid contents have not been reported).

⁷ Estimated from the average sphingolipid content of vegetables listed above (including soybeans) of 394 $\mu\text{mol/kg}$ multiplied by the remaining vegetable consumption (65 kg).

⁸ Estimated from the average sphingolipid content of the fruits listed above (48 $\mu\text{mol/kg}$) multiplied by the remaining fruit consumption (46 kg).

⁹ Total including estimates in brackets.

Come mostrato in tabella la quantità degli sfingolipidi nei prodotti alimentari varia notevolmente passando da poche micromoli per chilogrammo nella frutta e in alcuni vegetali a circa 2mmol/Kg (1-2 g/Kg) nei prodotti caseari, nelle uova e nella soia. Le voci in Tabella 4.6 coprono quasi l'80% (in peso) dei cibi consumati negli Stati Uniti, mentre il resto è composto da edulcoranti (9%) (che non contengono sfingolipidi), altra frutta e verdura (12%) e varie (3%).

Se ci si basa su un consumo pro capite annuo di 873 kg di prodotti alimentari, gli sfingolipidi costituiscono lo 0,01-0,02% della dieta (in peso). Questa quantità (0,3-0,4 g/d), è paragonabile, ai lipidi come il colesterolo e i tocoferoli (Ensminger *et al.* 1994).

Molti sfingolipidi oltre che provenire dalla dieta possono essere sintetizzati e metabolizzati nel corpo come mostrato in Figura 4.21.

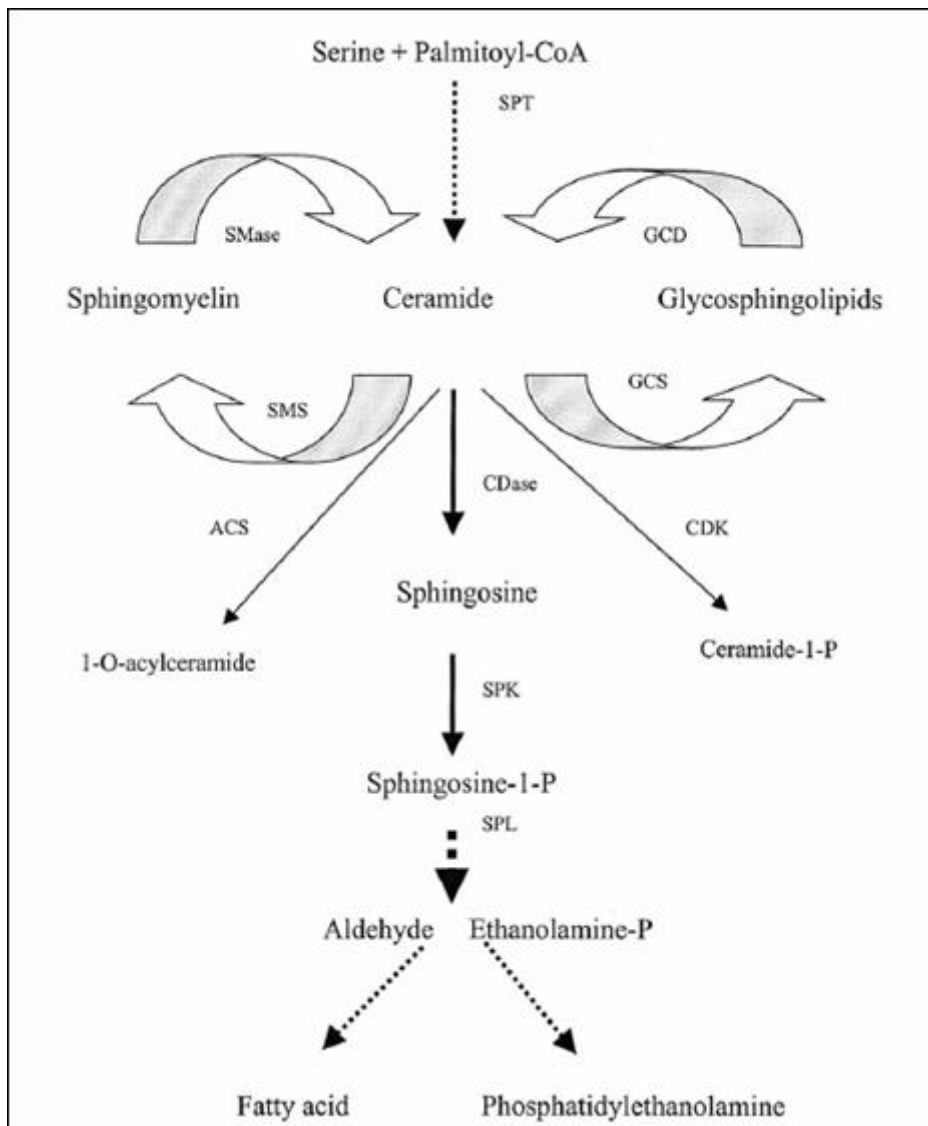


Figura 4.21 - Schema del metabolismo degli sfingolipidi (Duan, 2005).

Abbreviazioni: ACS: acilceramide sintetasi, CDase: ceramidase, CDK: ceramide Kinasi, GCD: glicosidasi, GCS: glucosilceramide sintasi, SMase: sfingomielinasi, SMS: sfingomielina sintasi, SPK: sfingosina Kinasi, SPL: sfingosina-p liasi, SPT: serina palmitoiltransferasi.

La sintesi di tutti gli sfingolipidi ha inizio dalla condensazione della serina con il palmitoil-CoA. Dopo una serie di reazioni comprendenti riduzioni, acilazioni e desaturazioni, viene formato il ceramide, se a questo si lega una colina derivata dalla fosfatidilserina, si forma la sfingomieline (SM). Invece se il ceramide viene glicosilato si formano i glicosfingolipidi.

Sia la SM che alcuni glicosilceramidi possono essere degradati a ceramide rispettivamente da una sfingomielinasi (SMase) e glicosidasi. Il ceramide se non va incontro al meccanismo di sintesi, sarà idrolizzato a sfingosina da una ceramidasi, la sfingosina così ottenuta può essere fosforilata a sfingosina-1-fosfato. Il ceramide può a sua volta essere fosforilato o acilato per formare rispettivamente il ceramide-1 fosfato e 1-O- acilceramide. I principali prodotti degli sfingolipidi sono fosfoetanolamina e palmitaldeide, che possono essere riutilizzati una per la sintesi della fosfatidiletanolamina e l'altra per gli acidi grassi.

Il metabolismo degli sfingolipidi genera segnali biologicamente attivi che influenzano la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi. Tra questi metaboliti il ceramide e la sfingosina sono molecole che inibiscono la proliferazione cellulare, stimolano la differenziazione cellulare e inducono apoptosi, al contrario la sfingosina 1-fosfato promuove la sopravvivenza cellulare e inibisce l'apoptosi, ed è pertanto mitogenico (Hannun & Bell, 1989), (Figura 4.22).

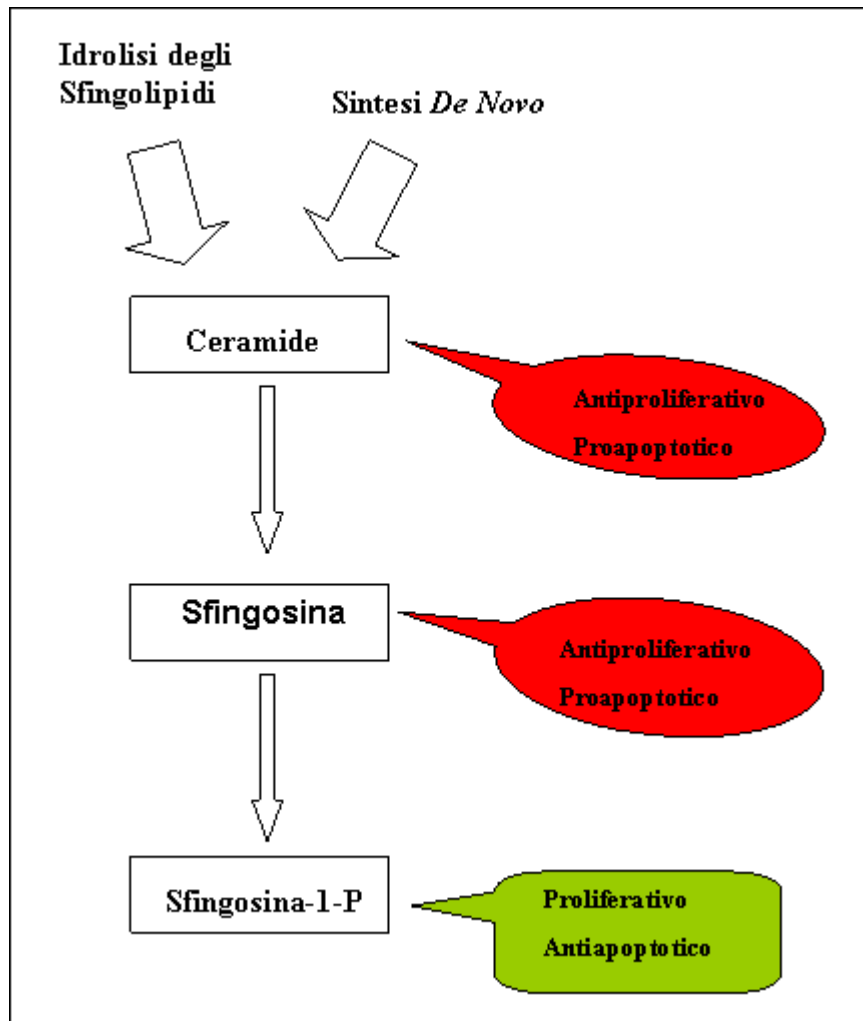


Figura 4.22 - Effetti biologici dei principali metaboliti degli sfingolipidi.

I meccanismi degli effetti di questi messaggeri lipidici coinvolgono una specifica proteina fosfatasi, una proteasi e una chinasi, che modificano le espressioni o le attività di molte molecole chiave e i fattori trascrizionali quali per esempio JNK, pRb, e c-myc.

Le molecole antiproliferative e proliferative derivate dal metabolismo degli sfingolipidi evidenziano un ruolo degli sfingolipidi nello sviluppo del cancro in particolare sullo sviluppo del cancro al colon. Brasitus *et al.*, (1986) per primi, hanno osservato che un accumulo di SM nel colon di ratti a cui è stato indotto il cancro con 1,2 dimetilidrazina (DMH, agente cancerogeno chimico), precede lo sviluppo del cancro. Risultati simili sono stati ottenuti in uno studio sugli uomini (Merchant *et al.*, 1995), in cui la SM è stata determinata nei linfonodi di pazienti con tumore al colon, e livelli più elevati di SM sono stati determinati nei linfonodi positivi rispetto a quelli negativi. L'aumento della SM nei tessuti malati si può riflettere sull'inibizione dell'idrolisi di SM, in quanto i livelli di ceramide nei pazienti con tumore al colon sono ridotti del 50%.

Dillehey *et al.*, (1994) hanno dimostrato che una dieta a base di SM inibiva la carcinogenesi in topi trattati con DMH. Questo effetto antitumorale è stato poi confermato in altri studi in cui la somministrazione di altri tipi di sfingolipidi inibivano lo sviluppo della carcinogenesi al colon (Schmelz *et al.*, 1996; 2000). Poiché gli sfingolipidi non sono assorbiti intatti, probabilmente l'effetto antitumorale è ascrivibile ai metaboliti quali ceramide e sfingosina. Questa ipotesi è stata confermata, da studi in vivo, in cui è stato dimostrato che la somministrazione di ceramide imitava l'effetto della SM proveniente dalla dieta, e da studi in vitro che dimostravano gli effetti antitumorali del ceramide e della sfingosina sulle cellule cancerogene nel colon (Schmelz *et al.*, 1999; Ahnn & Schroeder, 2002).

Prove di alimentazione con ratti sia a breve che a lungo termine (Imaizumi *et al.* 1992; Kobayashi *et al.* 1997) hanno indicato che gli sfingolipidi possono ridurre il colesterolo plasmatico, fattore di rischio per l'aterosclerosi. In questo esperimento il colesterolo plasmatico totale è diminuito del 30% nei ratti alimentati con diete semipurificate integrate con una miscela di sfingomielina e glicosfingolipidi (1% della dieta totale) più 4% di olio di soia per un massimo di due generazioni, rispetto ai ratti alimentati con il 5% olio di soia (il livello dei trigliceridi plasmatici era lo stesso).

Fantini *et al.*, (1997) hanno osservato che gli sfingolipidi di origine sintetica possono inibire virus e batteri, pertanto, è plausibile che gli sfingolipidi presenti nel cibo possano competere con i microorganismi per i siti di legame cellulari e facilitare l'eliminazione di organismi patogeni dall'intestino. E' stato ipotizzato che i glicofosfolipidi possano proteggere contro microorganismi patogeni (Newburg & Chaturvedi, 1992, Zopf, 1996). Purtroppo, alcuni glicosfingolipidi sembrano invece partecipare a disturbi indotti da microrganismi. Una parte delle persone infettate con il *Campylobacter jejuni* hanno sviluppato la sindrome di Miller Fisher, che sembra coinvolgere lo sviluppo di anticorpi cross-reattivi contro gangliosidi e *C. jejuni* lipopolisaccaridi (Jacobs *et al.* 1997).

Attualmente, le malattie per le quali esistono più prove sull'effetto benefico degli sfingolipidi introdotti con la dieta sono l'aterosclerosi e il cancro al colon, tuttavia, gli studi sono ancora pochi per cui c'è la necessità di ulteriori studi su animali da laboratorio e sugli uomini (Vesper *et al.*, 1999).

Capitolo 5

I lipidi della carne

5.1 Introduzione

Il contenuto in lipidi e la composizione in acidi grassi della materia grassa della carne variano in relazione a diversi fattori quali la specie, il tipo di muscolo, l'età dell'animale, il regime alimentare, il tipo di allevamento ecc..

In una carcassa e nei vari tagli anatomici da essa prelevati si possono individuare tre tipologie di lipidi:

- ❖ tessuto adiposo,
- ❖ grasso intermuscolare,
- ❖ grasso intramuscolare.

Il tessuto adiposo è costituito dai depositi di grasso localizzati sulla superficie del muscolo o a livello addominale, e per questo facilmente separabili. La sua presenza nelle carni fresche determina un aumento del contenuto lipidico medio con importanti implicazioni dal punto di vista nutrizionale, in quanto questi grassi sono costituiti prevalentemente da trigliceridi ed acidi grassi saturi.

Il grasso intermuscolare è rappresentato dal grasso localizzato tra i fasci muscolari di una determinata parte anatomica (es. coscia). Questo tipo di grasso sembra determinare il miglioramento di alcune caratteristiche organolettiche delle carni quali la tenerezza e la succulenza.

Il grasso intramuscolare rappresenta quantitativamente il grasso meno soggetto a variabilità (1-4%), in quanto costituito prevalentemente da fosfolipidi. Per questa ragione il grasso intramuscolare è spesso caratterizzato da livelli di acidi grassi polinsaturi superiori rispetto alle altre due tipologie di grasso.

Gli acidi grassi costituenti la componente lipidica nei mammiferi derivano in parte dalla dieta ed in parte sono sintetizzati dall'organismo stesso. Nel grasso intramuscolare gli acidi grassi

saturi (SFA), rappresentano circa il 45 – 48%, dei lipidi totali, mentre quelli monoinsaturi e polinsaturi costituiscono circa il 35 - 45% ed il 5%, rispettivamente.

In termini di composizione, i principali acidi grassi saturi presenti nelle carni sono rappresentati dall'acido miristico (C14:0), palmitico (C16:0) e stearico (C18:0). Tra questi l'acido miristico rappresenta lo 0,3% degli SFA totali.(tabella 5.1).

Tra gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) i più abbondanti sono l'acido linoleico e linolenico, mentre tra gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) l'acido oleico è il più importante.ed è predominante nei lipidi neutri. Questo acido grasso deriva dall'acido stearico (C18:0) per insaturazione ad opera dell'enzima stearoil Co-A desaturasi.

Tabella 5.1. Composizione in acidi grassi (%) dei lipidi muscolari di differenti animali, (Enser *et al.*, 1996).

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

E' possibile intervenire sulla composizione degli acidi grassi presenti nei lipidi della carne agendo sulla composizione della dieta degli animali (Pariza *et al.*, 1996). Alcuni dati evidenziano come il pascolo influisca sulla diminuzione di acido palmitico sia nel muscolo dei bovini (French *et al.*, 2000) che in quello degli ovini (Velasco *et al.*, 2001).

La composizione acidica della materia grassa contenuta negli alimenti contemplati nella dieta giornaliera dell'uomo è molto importante in quanto se da un lato può contribuire all'insorgenza di importanti disturbi, dall'altro può aiutare a prevenire alcune patologie invalidanti. Come già precedentemente accennato, l'assunzione, da parte dell'uomo, di acidi grassi saturi, ed in particolare di acido palmitico e miristico, con la dieta, aumenta la sintesi del colesterolo e favorisce l'accumulo di lipoproteine a bassa densità (LDL), fattore di rischio di disturbi dell'apparato cardiovascolare (Keys, 1970).

Il rapporto PUFA/SFA (P:S) è, come già accennato in precedenza un indice importante nel determinare la salubrità della frazione lipidica degli alimenti. Tale rapporto assume un valore di circa 0,11 nella carne di manzo e 0,15 nella carne d'agnello, ed è quindi inferiore al rapporto di 0,4, considerato ottimale dai nutrizionisti, a causa dell'elevato grado di bioidrogenazione che gli acidi grassi insaturi subiscono nel ruminante (Scollan et al., 2006).

E' stato dimostrato che aumentando il rapporto P:S della dieta, si può ottenere una riduzione del colesterolo plasmatico totale. Conseguentemente a queste osservazioni vi è stato negli ultimi anni un grande interesse scientifico e diversi sono stati gli studi rivolti al miglioramento di questo rapporto nella carne (Howell *et al.*, 1997, Scollan *et al.*, 2001).

In Tabella 5.2 sono riportati gli studi in cui sono stati dimostrati i diversi effetti benefici sul consumatore imputato al consumo di carne. In particolare è stato osservato che il consumo moderato di carne magra abbassa il contenuto di colesterolo totale, colesterolo LDL e trigliceridi (TG) (Beauchesne-Rondeau *et al.*, 2003), e non ha alcun effetto sui marker di aggregazione piastrinica (Li *et al.*, 1999) o sui marcatori di stress ossidativo (Hodgson *et al.*, 2006), rispetto ad un gruppo controllo.

La carne dei ruminanti è una buona fonte alimentare di alcuni nutrienti benefici per la salute umana tra cui gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (PUFA), i fosfolipidi e gli isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA).

Tabella 5.2- Studi su alcuni effetti benefici della carne

Author (year)	Study, country	Subject status (n)	Sex (age range)	Length of study (wks)	Type of meat	Groups	Markers examined	Main outcomes (↑, ↓, ~) ^a	Significance (vs. control/ between groups)
Mann et al. (1999)	Cross-sectional intervention, Australia	Healthy (147)	m (20-55)	~	~	Vegans & vegetarians vs. moderate meat-eaters (<285 g/d) & high meat-eaters (>285 g/d)	Dietary data, plasma & serum folate, vitamin B12 & homocysteine	↑ Plasma B12 ↓ Homocysteine	Sig Sig
Li et al. (1999)	Cross-sectional analysis, Australia	Healthy (147)	m (20-50)	~	~	Vegans & vegetarians vs. moderate meat-eaters (<285 g/d) & high meat-eaters (>285 g/d)	Markers of platelet aggregation, inflammatory markers	- Folate status - Ex vivo platelet aggregation	NS NS
Mann et al. (2006)	Cross-sectional analysis, Australia	Healthy (47)	m (20-55)	~	~	Vegans & vegetarians vs. moderate meat-eaters (<285 g/d) & high meat-eaters (>285 g/d)	Nutrient intakes	- TXB ₂ ↑ LCN-3 PUFA - SFA	NS Sig NS
Beauchesne-Rondeau et al. (2003)	Cross over intervention, France	Healthy (18)	m (50.1) ^b	12	Lean beef	Lean beef diet vs. poultry vs. lean fish diet	Plasma lipids	↓ TC ↓ LDL ↓ VLDL ↓ TC	NS NS NS NS
Cosgrove et al. (2005)	Cross-sectional analysis, Ireland	Healthy (958)	m & f (18-64)	~	~	Red meat consumers vs. vegetarians	Nutrient deficiency	↓ Zinc ↓ Riboflavin ↓ Vitamin C ↓ Vitamin B12 ↓ Iron	Sig Sig Sig NS NS
Hodgson et al. (2006)	Parallel intervention, Australia	Hypertensive (60)	m & f (58.6) ^b	8	Lean red meat	~21.5 g/d lean meat diet vs. control	Blood pressure, serum lipids	↓ Folate ↑ Systolic blood pressure	NS Sig
Hodgson, Wards, Burke, Beilin, and Puddey (2007)	Parallel intervention, Australia	Hyperlipidaemic (60)	m & f (58.6) ^b	8	Lean red meat	~21.5 g/d lean meat diet vs. control	Markers of iron status, inflammatory markers (SAA, CRP, plasma fibrinogen), markers of oxidative stress (GCT, plasma & urinary isoprostanes), dietary data	- Iron status - Plasma F ₂ - Isoprostanes - Serum GGT - Serum SAA - Plasma fibrinogen Leukocyte count	NS NS NS Sig NS Sig
Wagemakers et al. (2009)	Cross-sectional analysis, UK	Healthy (2256) ^f	m & f (43, 53) ^b	~	Red meat	High consumers (38-127 g/d) vs. low/moderate consumers (0-15 g/d)	Dietary data, blood pressure, serum lipids, waist circumference	↓ CRP - TC - LDL	NS NS NS
Prynne et al. (2009)	Cross-sectional analysis, UK	Healthy (2256) ^f	m & f (43, 53) ^b	~	Red meat	High consumers (38-127 g/d) vs. low/moderate consumers (0-15 g/d)	Nutrient intakes	↑ Vitamin B12 ↑ Haem iron ↑ Zinc	Sig Sig Sig

Abbreviazioni: NS, non significativo; Sig, significativo; TC, il colesterolo totale; LDL, lipoproteine a bassa densità di colesterolo; VLDL, lipoproteine a densità molto bassa; HDL, lipoproteina ad alta densità di colesterolo; TG, trigliceridi; TXB₂, trombossano, B2; ASA, amiloide sierica; CRP, proteina C-reattiva; GGT, gamma-glutamyl transferasi; SFA, acidi grassi saturi.

□ Dati non misurati o riportati ; ↑ Aumento osservato; ↓ diminuzione osservata, nessun cambiamento osservato; ^bEta media; ^cnumero di soggetti nel 1989

5.2 Acidi grassi polinsaturi (PUFA)

La componente lipidica della carne degli animali è la fonte principale di SFA. Il rapporto tra PUFA e SFA nel grasso dei ruminanti è minore rispetto a quello dei lipidi costituenti la carne degli animali monogastrici a causa della intensiva bioidrogenazione che gli acidi grassi insaturi, assunti con la dieta dal ruminante, subiscono nel rumine ad opera di microorganismi. Una porzione di acidi grassi insaturi provenienti dalla dieta bypassano, comunque, il rumine intatti e vengono assorbiti e depositati nel grasso corporeo (Wood & Enser, 1997).

Gli acidi grassi polinsaturi possono essere suddivisi in due classi molto importanti gli $\omega 3$, il cui precursore è l'acido linolenico (C18:3 9c, 12c, 15c), e gli $\omega 6$ derivanti dall'acido linoleico (C18:2 9c, 12c).

Gli acidi linoleico e linolenico, sono acidi grassi essenziali in quanto il corpo umano non è in grado di sintetizzarli autonomamente, occorre quindi introdurli con la dieta nelle giuste quantità. A partire da queste due molecole lipidiche l'organismo umano è invece in grado di produrre acidi grassi a catena più lunga che costituiscono i precursori degli eicosanoidi. Gli eicosanoidi che derivano dall'acido arachidonico (C20:4 5c, 8c, 11c, 14c, appartenente alla famiglia degli $\omega 6$) hanno la capacità di aumentare la pressione sanguigna, le reazioni infiammatorie, l'aggregazione piastrinica, la trombogenesi, il vasospasmo, le reazioni allergiche e la proliferazione cellulare. Gli eicosanoidi derivanti dall'acido eicosopentaenoico (EPA, C20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c, della famiglia degli $\omega 3$) hanno invece effetti benefici nella prevenzione e nel trattamento di patologie croniche quali: patologie coronariche, ipertensione, diabete mellito di tipo II, artrite, cancro e altri disordini immunitari ed infiammatori.

Queste due famiglie di acidi grassi competono per gli enzimi coinvolti nella loro desaturazione ed elongazione, e pertanto il consumo eccessivo di cibi ricchi in acidi grassi omega 6 può compromettere la conversione dell'acido linolenico in EPA, con effetti negativi sullo stato di salute.

Il grasso intramuscolare contiene proporzioni significative di PUFA a lunga catena (C20-22), formati a partire dai due precursori acido linoleico e acido linolenico per azione degli enzimi $\Delta 5$ e $\Delta 6$ desaturasi ed elongasi. Nel muscolo e nel tessuto adiposo dei ruminanti i PUFA si trovano quasi esclusivamente nella frazione dei fosfolipidi.

Le differenze tra i muscoli, dovute al tipo di fibra muscolare, si riflettono nella diversa composizione in acidi grassi dei lipidi che li compongono. I muscoli "rossi" hanno una percentuale più alta di fosfolipidi rispetto ai muscoli "bianchi" e quindi una percentuale più elevata di PUFA.

Gli acidi grassi presenti nei fosfolipidi vengono scarsamente influenzati dalla dieta dell'animale, anche se, qualora si riscontrino delle differenze, queste sono principalmente attribuibili al contenuto di acidi grassi a lunga catena della serie $\omega 6$ ed $\omega 3$.

L'acido linoleico (C18:2 9c, 12c), presente in concentrazioni elevate nei mangimi concentrati (cereali e semi di lino), viene degradato nel rumine, da batteri ruminali, ad acidi grassi monoinsaturi ed acidi grassi saturi. Solo una piccola parte, circa il 10%, di acido linoleico assunto dal ruminante con la razione alimentare viene incorporato nei lipidi dei tessuti.

L'acido linolenico (C18:3 9c, 12c, 15c), costituisce più del 50% degli acidi grassi presenti nell'erba e nei prodotti a base di erba, un'elevata percentuale di esso viene biodegradata nel rumine ad acidi grassi saturi. Doreau & Ferlay (1994), hanno osservato che una proporzione variabile di acido linolenico della dieta viene bioidrogenata (85 - 100%) in misura maggiore rispetto all'acido linoleico (70 - 95%), per cui vi è una minore concentrazione di acido linolenico rispetto al linoleico che risulta disponibile ad essere incorporata nei tessuti. La concentrazione di acido linoleico e acido linolenico nei ruminanti è più elevata nel grasso intramuscolare rispetto al tessuto adiposo.

Le ricerche attuali suggeriscono che i livelli di questi due acidi grassi essenziali e l'equilibrio tra essi possa giocare un ruolo fondamentale non solo nella crescita e nello sviluppo, ma anche nella prevenzione e nel trattamento di patologie croniche. Gli stessi studi suggeriscono quindi un maggior consumo di alimenti con un rapporto $\omega 6/\omega 3$ basso, in generale un rapporto $\omega 6/\omega 3 < 4$ è considerato valido dal punto di vista nutrizionale (Collomb *et al.*, 2004).

5.3 CLA nella carne e nei prodotti carnei

La carne dei ruminanti è caratterizzata da un contenuto di CLA superiore rispetto alla carne dei monogastrici. In Tabella 5.3 sono riportate le concentrazioni di CLA nella carne di differenti specie animali normalmente contemplate nella composizione della dieta umana.

Tabella 5.3 - Contenuto di CLA in varie specie di carne (Schimid *et al.*, 2006).

Riferimenti	Agnello	Manzo	Vitello	Maiale	Pollo	Tacchino	Cavallo
	mg/g di grasso						
Chin <i>et al.</i> (1992)	5,6	2,9-4,3 ^b	2,7	0,6	0,9	2,5	
Shantha <i>et al.</i> (1994)		5,8-6,8 ^b					
Dufey (1999)	11,0 ^c	3,6-6,2 ^{a,c}		0,7 ^c			0,6 ^c
Ma <i>et al.</i> (1999)		1,2-3,0 ^{b,c}					
Raes <i>et al.</i> (2003)		4,0-10,0 ^{a,c}					
Badiani <i>et al.</i> (2004)	4,32						
	mg/g di FAME						
Fritsche & Steinhardt (1998)	12,0 ^c	6,5 ^c		1,2/1,5 ^{b,c}	1,5 ^c	2,0 ^c	
Rule <i>et al.</i> (2002)		2,7-5,6 ^{a,b,d}			0,7 ^d		
Wachira <i>et al.</i> (2002)	8,8-10-8 ^c						
Knight <i>et al.</i> (2004)	19,0 ^c						

^a Carne di differenti sistemi di produzione e città

^b Parti diverse della carcassa (ed eventualmente animali diversi)

^c E' stato determinato solo il CLA 9c, 11t

^d Sono stati determinati solo il CLA 9c, 11t e CLA 10t, 12c.

Tra i tanti fattori che possono influenzare il contenuto di CLA nella carne e nei prodotti derivati il più importante è la dieta dell'animale in quanto fornisce gli acidi grassi precursori alla sintesi ruminale del CLA. Un' alimentazione basata sul pascolo per esempio, incrementa il livello di CLA nei tessuti. French *et al.*, (2000) hanno determinato nel grasso intramuscolare dei manzi (muscolo *longissimus dorsi*), un incremento del contenuto di CLA con l'aumentare dell'assunzione di erba. Poulson *et al.*, (2004) hanno riportato un contenuto di CLA di circa 6,6 volte superiore nel muscolo *longissimus* e *semitendinosus* di manzi alimentati con foraggi, rispetto a manzi la cui dieta si basava prevalentemente su grano (13,1 vs 2,0 mg/g FAME).

Manzi alimentati, nel periodo di crescita, con una dieta a base di grano e, durante il periodo di finissaggio, con una dieta al pascolo avevano un contenuto di CLA nel tessuto 4 volte più elevato rispetto ai manzi alimentati solo con una dieta a base di grano. Il finissaggio dei manzi al pascolo in sostituzione ai concentrati porta ad un maggior contenuto di CLA nel grasso intramuscolare (Realini *et al.*, 2004).

Bessa, e Santos-Silva (2002) hanno determinato concentrazioni di CLA più elevate nel muscolo *longissimus* di agnelli allevati al pascolo rispetto agli agnelli alimentati con una dieta a base di concentrati.

Spada *et al.*, (2009) hanno osservato nel muscolo *longissimus* di agnelli pesanti (22-27 kg di peso vivo) sottoposti a tre differenti regimi alimentari un aumento del contenuto di CLA nel muscolo degli agnelli alimentati al pascolo rispetto sia agli agnelli alimentati con una dieta a base di concentrato commerciale e allevati in stalla, sia agli agnelli alimentati con una dieta a base di concentrato, mais, polpa di bietola e farina di soia.

Il contenuto di CLA nei trigliceridi del muscolo non dipende solo dalla dieta ma anche dalla velocità di crescita dell'animale. Auroseau *et al.*, (2004) hanno osservato che la concentrazione di CLA è risultata superiore in agnelli alimentati al pascolo rispetto a quelli alimentati con il concentrato, con valori direttamente proporzionali al tasso di crescita dell'animale. Gli autori hanno giustificato questo andamento con il maggiore apporto quotidiano di erba degli agnelli più grandi.

Il maggiore contenuto di CLA nella carne degli animali al pascolo viene correlato con l'elevato contenuto di acidi grassi poliinsaturi (PUFA) dell'erba (in particolare C18:3 ω 3, con un rapporto ω 6: ω 3 di circa 1:3-5).

L'alimentazione prevalentemente basata sul pascolo non solo influenza il contenuto di CLA ma anche l'intera composizione acidica della materia grassa. Una diminuzione del rapporto ω 6: ω 3, così come un aumento nel rapporto PUFA:SFA è stato osservato, in generale, nel tessuto adiposo e muscolare di manzi la cui alimentazione prevedeva una dieta contenente erba (French *et al.*, 2000; Nuernberg *et al.*, 2002). Negli agnelli una diminuzione del rapporto ω 6: ω 3 è stata riscontrata anche da Auroseau *et al.* (2004) e Santos-Silva *et al.*, (2002), Spada *et al.*, (2009).

L'aggiunta di semi oleosi alla dieta degli animali si è rivelata essere un metodo efficace per aumentare il CLA contenuto nei lipidi del muscolo. Jeronimo *et al.*, (2009) per esempio, hanno osservato che una dieta a base di una miscela di semi di girasole e semi di lino è un buon approccio per arricchire di CLA la carne d'agnello.

Capitolo 6

Tecniche analitiche utilizzate nella caratterizzazione della frazione lipidica della carne

La caratterizzazione della frazione lipidica di una qualsiasi matrice alimentare prevede numerosi passaggi chiave quali:

- estrazione della frazione lipidica dalla matrice;
- separazione delle diverse frazioni lipidiche,
- caratterizzazione analitica delle frazioni lipidiche separate.

6.1 Estrazione della frazione lipidica

L'estrazione della materia grassa da una qualsiasi matrice sia essa animale o vegetale è il primo passo per la caratterizzazione dei lipidi di un alimento (latte, formaggio, carne, pesce e vegetali).

I lipidi presenti nei tessuti si trovano in una varietà di forme fisiche. I lipidi semplici (trigliceridi, digliceridi, ecc.) sono spesso sotto forma di grandi aggregati nei tessuti di deposito, da cui sono estratti, con relativa facilità. D'altra parte i lipidi complessi (fosfolipidi, sfingolipidi, gangliosidi) di solito sono costituenti delle membrane, dove si trovano in stretta associazione con composti come proteine e polisaccaridi, con cui interagiscono, e non sono così facilmente estraibili.

In generale i lipidi sono legati ad altri componenti cellulari con deboli forze idrofobiche o di Van der Waals, da legami idrogeno o legami ionici. Occorre quindi avere a disposizione un metodo analitico che permetta di estrarre quantitativamente la frazione lipidica senza alterarne la composizione.

Il metodo di estrazione deve essere in grado di:

- inibire l'azione di enzimi come lipasi e fosfolipasi, al fine di evitare fenomeni di degradazione lipolitica della materia grassa durante le varie fasi di analisi;
- limitare il più possibile i fenomeni autossidativi durante l'estrazione (indotti generalmente dall'impiego di elevate temperature e da solventi non idonei);
- estrarre in modo non selettivo tutti i costituenti della frazione lipidica;

- separare i lipidi dai componenti a ridotta polarità (interferenti apolari), che potrebbero introdurre errori nelle successive determinazioni.

Esistono due differenti tipologie di metodi di estrazione della materia grassa dalla carne:

- metodi di riferimento: normalmente utilizzati per determinare in modo quantitativo ed aspecifico il tenore totale in materia grassa della carne;
- metodi alternativi: alcuni di questi, detti “a freddo”, sono normalmente utilizzati per estrarre la materia grassa qualora la stessa debba essere successivamente frazionata e caratterizzata.

Dal buon esito di questo stadio iniziale dipenderà la qualità del risultato di tutte le analisi successive volte a quantificare e caratterizzare i lipidi estratti (lipidi totali, trigliceridi, mono e digliceridi, fosfolipidi, sfingolipidi, acidi grassi, etc.).

6.1.1 Metodi di riferimento

I metodi di riferimento, o metodi ufficiali, sono metodi validati, derivano quindi da una estesa sperimentazione volta a definirne le caratteristiche di accuratezza e precisione.

Nella maggior parte dei casi tali metodi sono stati messi a punto e validati nell'ambito di gruppi di lavoro che fanno capo ad organizzazioni internazionali che riuniscono esperti del settore specifico.

Nel caso della carne la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) e la ISO (International Standard Organization) sono le due organizzazioni internazionali che provvedono allo sviluppo dei metodi analitici da utilizzare.

I metodi di riferimento che sono normalmente utilizzati per la determinazione quantitativa del contenuto dei lipidi totali (tenore in materia grassa) nei prodotti carnei sono:

- ❖ ISO 1443:1973;
- ❖ AOAC,1990 (24005 e 960.39, Foster *et al.*, 1992).

Il primo metodo d'estrazione si basa su un'idrolisi acida della matrice, associata ad un trattamento termico necessario per la dissociazione dei complessi lipidi-proteine presenti nella carne. La dissociazione è seguita da un'estrazione con solvente (esano o etere di petrolio).

Il secondo metodo consiste in un'estrazione a caldo ed in continuo con solvente (etere di petrolio).

Tuttavia in questi metodi analitici il calore sviluppato o indotto e la presenza dell'acido aggiunto possono indurre fenomeni di idrolisi, isomerizzazioni ed ossidazione di alcune classi

lipidiche (in particolare dei fosfolipidi e degli acidi grassi coniugati) alterandone quindi la composizione.

6.1.2 Metodi alternativi

I metodi d'estrazione della materia grassa "alternativi", chiamati anche metodi a freddo, vengono normalmente utilizzati quando i lipidi estratti devono essere sottoposti ad ulteriore caratterizzazione. Le condizioni di estrazione dei metodi a freddo limitano il più possibile i processi ossidativi della frazione lipidica, permettendo di preservarne la composizione originale.

Generalmente questi metodi si basano sull'utilizzo di una miscela binaria di solventi come cloroformio/metanolo (Folch *et al.*, 1956; Bligh & Dyer, 1959), diclorometano/metanolo, esano/isopropanolo (Hara & Radin, 1978).

6.2 Separazione delle classi lipidiche

I lipidi estratti con i metodi di riferimento o i metodi “alternativi” possono essere ulteriormente frazionati nelle varie classi tramite l’uso di tecniche cromatografiche quali la TLC (Thin Layer Chromatography) o la SPE (Solid Phase Extraction).

6.2.1 Introduzione alle separazioni cromatografiche

La cromatografia è una tecnica in uso da molto tempo che permette di separare molecole sulla base di interazioni specifiche con un ligando immobilizzato (fase stazionaria). I primi esperimenti risalgono al 1903, quando Mikhail Tswett separa pigmenti estratti da piante mediante cromatografia di adsorbimento usando carbonato di calcio come adsorbente e una miscela di benzina e etanolo come eluente.

La cromatografia è un metodo chimico-fisico di separazione, basato sulla diversa distribuzione di composti in due fasi non miscibili. La separazione cromatografica consiste nello sfruttare la diversa capacità che ogni molecola o ione possiede nel distribuirsi fra le due fasi. La separazione avviene nel corso del passaggio di una fase mobile attraverso una fase stazionaria. Le fasi possono essere solide, liquide o gassose in varie combinazioni in dipendenza del tipo di cromatografia, ad esempio fase mobile liquida e stazionaria solida o liquida, oppure fase stazionaria liquida e fase mobile gassosa.

Le tecniche cromatografiche possono essere classificate sulla base della matrice usata per la fase stazionaria, del tipo di fase mobile, del meccanismo di interazione tra le molecole da separare e il sistema cromatografico o infine sulla base della tecnica usata per l’eluizione (Tabella 6.1).

Tabella 6.1 Classificazione dei metodi cromatografici.

Classificazione	Metodi specifici	Fasi stazionarie	Tipo di equilibrio
Cromatografia in fase liquida (LC) (fase mobile: liquida)	Liquido-liquido o di ripartizione Liquido-fase legata Liquido-solido o di adsorbimento Scambio ionico Esclusione dimensionale	Liquido adsorbito su un solido Specie organica legata ad una superficie solida Solido Resina a scambio ionico Liquido nella porosità di un solido polimerico	Ripartizione tra liquidi immiscibili Ripartizione tra liquido e superficie legata Adsorbimento Scambio ionico Ripartizione/effetto di esclusione dimensionale
Gascromatografia (GC) (fase mobile: gas)	Gas-liquido Gas-fase legata Gas-solido	Liquido adsorbito su un solido Specie organica legata ad una superficie solida solido	Ripartizione tra gas e liquido Ripartizione tra liquido e fase legata adsorbimento
Cromatografia in fase supercritica (SFC) (Fase mobile: fluido supercritico)		Specie organica legata ad una specie solida	Ripartizione tra fluido supercritico e fase legata

Le interazioni che si instaurano tra molecola e fase stazionaria sono spesso legami chimici secondari (in certi casi si arriva a meccanismi più complessi come lo scambio ionico). Il coefficiente di ripartizione (K_d) di una data molecola è definito come il rapporto tra la sua concentrazione nella fase mobile e quella nella fase stazionaria.

La classificazione delle tecniche cromatografiche viene fatta in base alle caratteristiche della fase stazionaria e della fase mobile, le quali influenzano il tipo di meccanismo che sta alla base della distribuzione dei vari soluti fra le due fasi ossia, in analisi, del processo separativo. Esistono due metodi di separazione cromatografica principali:

1. cromatografia planare: la fase stazionaria è una lastra piana e la fase mobile scorre su di essa per capillarità (thin layer chromatography, TLC);
2. Cromatografia su colonna: la fase stazionaria è un tubo stretto in cui viene fatta passare la fase mobile col soluto;

Altri metodi possono essere inoltre classificati a seconda della fase mobile usata:

- cromatografia liquida (su colonna o planare)
- cromatografia gassosa o gascromatografia (solo su colonna)
- cromatografia con fluidi supercritici (solo su colonna).

6.2.1.1 Cromatografia su strato sottile (TLC)

La cromatografia su strato sottile (TLC) è una tecnica di cromatografia liquida piana di ripartizione solido-liquido semplice e veloce, che permette l'analisi di più campioni contemporaneamente, può essere impiegata sia a scopi analitici sia preparativi.

La fase stazionaria è immobilizzata sotto forma di strato sottile, su una superficie, lungo la quale viene fatta correre la fase mobile (per capillarità, per gravità oppure esercitando una certa pressione). Più precisamente la fase stazionaria è costituita da un materiale granulare omogeneo fatto aderire a un supporto piano o più raramente (cilindrico); l'insieme della fase stazionaria e del supporto è detto lastrina.

Se la fase stazionaria è un materiale polare (come il gel di silice), la separazione di miscele è dovuta principalmente a meccanismi di adsorbimento e perciò la fase mobile non deve essere polare; in questo caso si parla di cromatografia normale (o in fase diretta). Se invece lo strato è modificato (o imbevuto) con sostanze non polari, la separazione è dovuta principalmente a meccanismi di ripartizione per cui la fase mobile deve essere polare; in questo caso si parla di cromatografia a fase inversa. Attualmente si possono preparare strati di vario tipo, che permettono di sfruttare, per la separazione, anche fenomeni di scambio ionico e di esclusione.

Secondo la procedura più diffusa, il campione è depositato sulla lastrina mediante un capillare che permette di porre una piccola quantità sotto forma di macchia a circa un centimetro dalla base, sopra il livello raggiunto dal solvente nella camera di sviluppo. Successivamente la lastrina viene posta in verticale nella camera facendo in modo che peschi nel solvente. Man mano che il solvente risale lungo la lastrina si ha la ripartizione del campione in base alla diversa affinità fra la fase stazionaria e quella mobile. La velocità di risalita del solvente è determinata dalla sua polarità.

Dalla polarità, dipende l'entità del trascinarsi delle sostanze lungo la lastrina in una TLC normale. È possibile ordinare i solventi puri e anche le miscele di solventi in una serie eluotropa, secondo la polarità crescente (Tabella 6.2). In generale più una molecola è polare, maggiore è la sua capacità di eluire altre molecole.

Tabella 6.2 - Serie Eluotropa di miscele di solventi adatti per TLC.

Miscele o solventi puri	composizione
Benzene	
Benzene/cloroformio	1+1
Cloroformio	
Cicloesano/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/acetone	95+5
Benzene/acetone	9+1
Benzene/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/dietiletere	9+1
Benzene/metanolo	95+5
Benzene/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	8+2
Benzene/acetone	8+2
Cloroformio/metanolo	99+1
Benzene/metanolo	9+1
Cloroformio/acetone	85+15
Benzene/dietiletere	4+6
Benzene/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato d'etile	2+8
Acetato di butile	
Cloroformio/metanolo	95+5
Cloroformio/acetone	7+3
Benzene/acetato di etile	3+7
Acetato di butile/metanolo	99+1

L'analisi viene interrotta quando l'eluente raggiunge la sommità della lastrina che viene quindi tolta dalla camera di sviluppo. Prima che l'eluente si asciughi è bene segnare a matita la linea del fronte del solvente.

Si può controllare lo sviluppo con luce ultravioletta se il composto è UV visibile. L'esame della lastra sotto UV mostrerà la posizione delle macchie di sostanze che assorbono nell'ultravioletto o la posizione delle macchie di composti fluorescenti.

E' possibile confrontare fra loro le sostanze, presenti nella lastrina, attraverso i loro RF (Fattori di Ritenzione) cioè in base al rapporto tra la distanza percorsa dalla sostanza e la distanza percorsa dal solvente.

La tecnica TLC può essere usata come metodo separativo, in questo caso il supporto rigido è in vetro in modo da permettere l'asportazione delle macchie tramite raschiamento. Il campione viene applicato sotto forma di striscia continua sulla lastra preparativa e il controllo (che può essere uno standard) viene applicato sotto forma di goccia con capillare in una porzione ristretta a lato del campione. Dopo lo sviluppo della lastra, le bande vengono visualizzate attraverso luce ultravioletta e differenziate con un tratto di matita. La banda d'interesse viene asportata tramite raschiamento e

posta in una colonna di piccole dimensioni dove un solvente opportuno scioglie e asporta dal materiale della fase stazionaria il composto d'interesse.

Questa tecnica cromatografica presenta numerosi vantaggi poiché consente la separazione delle sostanze con rapidità e permettere l'analisi contemporanea di più campioni, usandone una quantità molto piccola. Il processo di separazione è facile da seguire e la velocità con la quale si possono ottenere i cromatogrammi rendono la cromatografia su strato sottile un mezzo utile per indagini preliminari e di routine.

La cromatografia su strato sottile può essere un metodo analitico qualitativo basato sulla valutazione dei valori degli RF delle macchie. Il maggior inconveniente è costituito dal fatto che gli RF per le diverse sostanze non sono spesso riproducibili in modo esatto, ciò è dovuto ad una serie di fattori sperimentali che devono essere perfettamente controllati come la natura dell'adsorbente e lo spessore dello strato.

L'uso di adsorbenti commerciali standard superiori a 0,15 mm e soprattutto un controllo rigoroso del tempo di essiccamento, e quindi dei tenori di umidità, sono in grado di ridurre al minimo le eventuali variazioni, inoltre l'eluente deve essere sempre del medesimo grado di purezza.

Bisogna considerare che, mentre la natura delle sostanze da analizzare sfugge evidentemente ad ogni controllo, la loro quantità non comporta alcun effetto, basta che non si superi la capacità del sistema.

Occorre anche ricordare che per una certa sostanza il valore dell'RF può essere leggermente diverso a seconda che sia stato determinato analizzando la sostanza pura o in miscela.

Un altro fattore importante è la saturazione della camera prima dell'inizio dello sviluppo della lastra cromatografica. Si può ottenere facilmente un buon grado di saturazione collegando, con strisce di carta da filtro, il solvente, presente sul fondo della camera, con le pareti e le sommità della camera. Una completa saturazione rende più rapido lo sviluppo della lastrina e permette di ottenere valori degli RF più costanti, inoltre il fronte del solvente e le macchie appariranno meglio definite.

La TLC è una delle tecniche più usate per la separazione delle classi lipidiche. Sebbene per questa applicazione possano essere utilizzate diversi tipi di lastre, quelle maggiormente impiegate sono quelle in gel di silice G (contenenti solfato di calcio come legante). Un esempio di sistemi di solvente utilizzati per la separazione delle differenti classi lipidiche è riportato in Tabella 6.3.

Tabella 6.3 Solventi utilizzati per la separazione nelle differenti classi lipidiche.

Lastre		Solvente	Rapporto	Separazione di
1	G	Esano/dietil etere/acido acetico	85:15:1	CE, FAME, TAG, FFA, Ch
2	G	Esano/dietil etere/acido acetico	70:30:1	MAG, (DAG più Ch), FFA, TAG
3	G	1,2 dicloroetano	100	FAME da dimetilacetali
4	G, BA	Benzene	100	Sn 2-MAG da sn 1e sn 3-MAG; sn 1,3-DAG da sn 1,2- e sn 2,3 -DAG
5	G; Ag+	Esano/dietiletere	90:10	FAME di monoeni <i>cis</i> e <i>trans</i> , saturi
6	G; Ag+	Esano/dietiletere	70:30	FAME di triinsaturi <i>cis</i> e <i>trans</i>
7	H	Cloroformio/metanolo/acqua	65:25:4	DGP, PE (PS più PI) PC, SPH
8	H	1: cloroformio/metanolo/idrossido d'ammonio	50:20:10:15:5	PC, PE, PS, PI, DPG, PA, SPH,
		2: cloroformio/acetone/metanolo/acido acetico/acqua	85:15:1	LPC, CER, FFA
		3: esano/dietil etere/ acido acetico		Ch, TAG, FAME, CE

Abbreviazioni: BA- acido bórico; Ag+- ioni d'argento; G-lastra in gel di silice G; H-lastre in gel di silice H; CE-esteri del colesterolo; FAME-metil esteri degli acidi grassi; TAG-triacilglicerolo; Ch-colesterolo; MAG-monoacilglicerolo; DAG- diacilglicerolo; FFA- acidi grassi liberi; PE-fosfatidiletanolamina; DGP-difosfatidilglicerolo (cardiolipina); PS- fosfatidilserina; PI- fosfatidilinositolo; SPH- sfingomielina; PA- acido fosfatidico; PC- fosfatidilcolina; LPC-lisofosfatidilcolina; CER-cerebrosidi.

Generalmente la fase mobile è costituita da una miscela trifasica formata da esano/dietil etere/acido acetico (85:15:1; v/v/v). Un esempio di separazione delle varie classi lipidiche nelle condizioni suddette è mostrato in Figura 6.1.

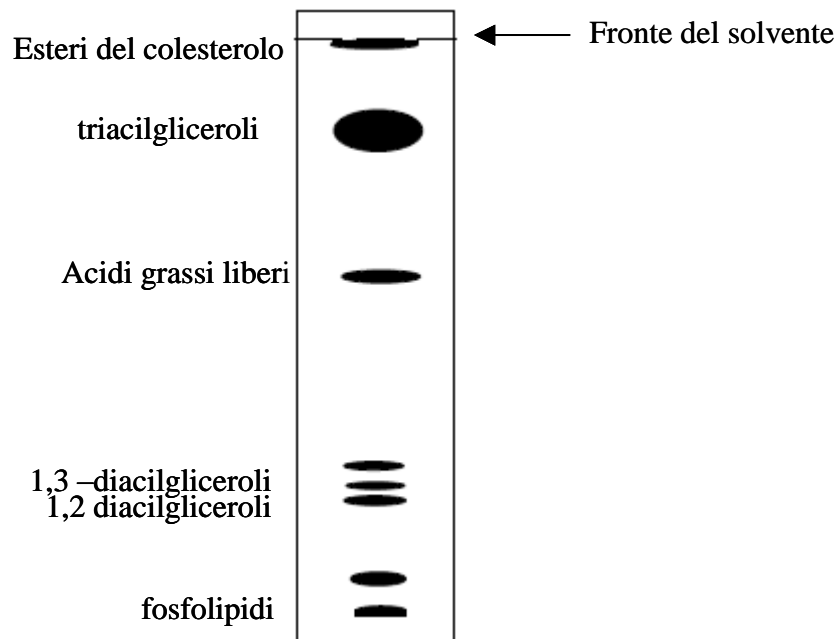


Figura 6.1 - Separazione delle classi lipidiche su lastre in gel di silice G.

Gli esteri del colesterolo migrano verso il fronte del solvente, seguiti dai trigliceridi, dagli acidi grassi liberi, dal colesterolo, dai digliceridi, dai monogliceridi ed infine dai fosfolipidi (con gli altri lipidi polari).

Le bande sono evidenziate mediante una soluzione di 2',7'-diclorofluorescina e osservate alla luce ultravioletta.

Le lastre in gel di silice G così come quelle con rivestimento in allumina possono essere usate anche per la separazione in classi della frazione polare dei fosfolipidi. E' possibile modificare chimicamente queste lastre rivestendole per esempio, con silicato od ossalato di magnesio in modo tale da migliorare la separazione di tutte le classi di fosfolipidi. L'aggiunta di acido etilendiammino tetra acetico o solfato di ammonio migliora la risoluzione dei fosfolipidi acidi (fosfatidilserina, (PS), fosfatidilinositolo (PI)). Anche l'acido bórico e il nitrato d'argento aggiunti possono dare una risoluzione migliore.

La fase mobile è generalmente costituita da cloroformio/metanolo/acqua (25:10:1; v/v/v). La separazione avviene come mostrato in Figura 6.2.

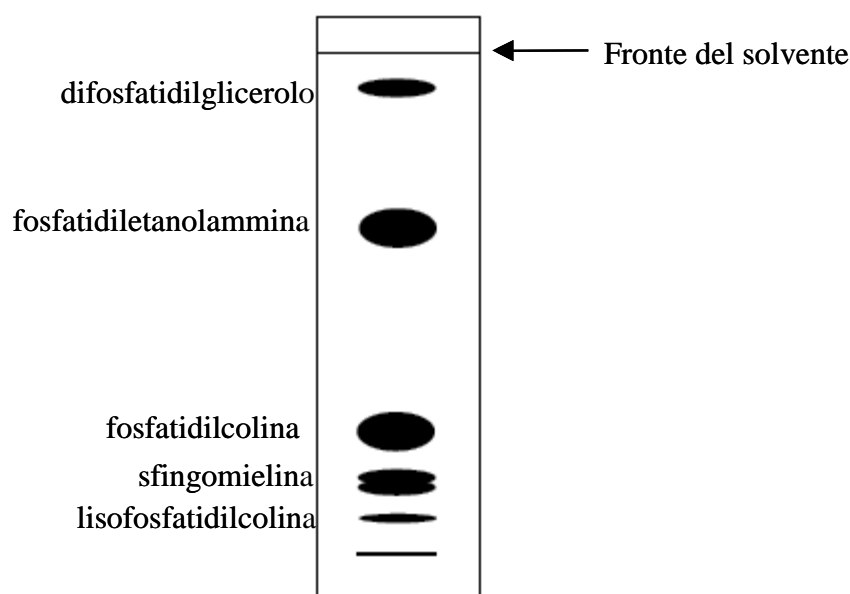


Figura 6.2 - Separazione della frazione polare dei fosfolipidi su lastre in gel di silice G.

I lipidi meno acidi come il difosfatidilglicerolo, migrano prima rispetto ai fosfolipidi contenenti fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina tende a eluire con la fosfatidiletanolamina mentre il fosfatidilinositolo co-eluisce con la fosfatidilcolina.

In alcuni casi è preferibile usare lastre di silice H (senza legante), per ottenere separazioni più nitide, poiché permettono di separare la fosfatidilserina dal fosfatidilinositolo.

Tuttavia queste lastre risultano essere molto più fragili rispetto a quelle G.

Un sistema di separazione di questo tipo, utilizzato specialmente per i lipidi di tessuti di origine animale, è costituito da uno strato di gel di silice H, preparato con una soluzione di carbonato di sodio 1mM per rendere la fase stazionaria leggermente basica, e sviluppato in cloroformio/metanolo/acido acetico/acqua (25:15.4.2 v/v/v/v, Figura 6.3).

Il difosfatidilglicerolo e l'acido fosfatidico si spostano verso il fronte del solvente, mentre la fosfatidilserina ed il fosfatidilinositolo migrano tra i costituenti fosfolipidici più abbondanti. Se nel campione sono presenti lipidi semplici, questi possono essere posizionati sulla parte alta della lastra mediante eluizione con acetone/esano (1:3 v/v) prima della separazione dei fosfolipidi.

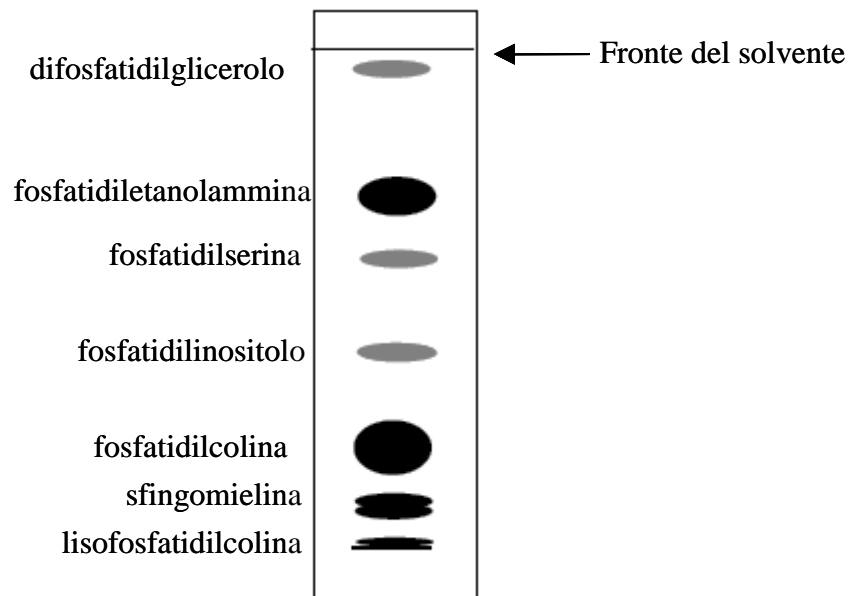


Figura 6.3 - Separazione della frazione polare dei fosfolipidi su lastre in gel di silice H.

6.2.1.2 Separazione mediante SPE (Solid Phase Extraction)

Nella cromatografia su colonna, la fase stazionaria, in genere associata a una matrice inerte e insolubile, è contenuta in una colonna di vetro, plastica o metallo. La fase mobile passa attraverso quella stazionaria in seguito alla pressione generata per gravità dal dislivello del liquido o dalla rotazione di una pompa peristaltica. Le colonne correntemente in uso sono corredate di valvole, rubinetti, sistemi di collegamento che ne facilitano l'uso. La tecnica è utilizzata sia per scopi analitici che preparativi. Tipicamente si procede in questo modo:

La colonna viene preparata equilibrando la matrice con il mezzo utilizzato per la fase stazionaria.

All'inizio della colonna si deposita la miscela contenente le sostanze da separare. Si fa scorrere poi un solvente (la fase mobile, detta eluente): la fase mobile trascinerà in modo diverso le diverse sostanze lungo la colonna, a seconda della loro affinità verso le due fasi (Figura 6.4).

La separazione delle molecole dipende dalle interazioni delle molecole stesse con la fase stazionaria, che consentono la ripartizione delle componenti tra le due fasi. L'eluato viene raccolto in frazioni con un collettore automatico.

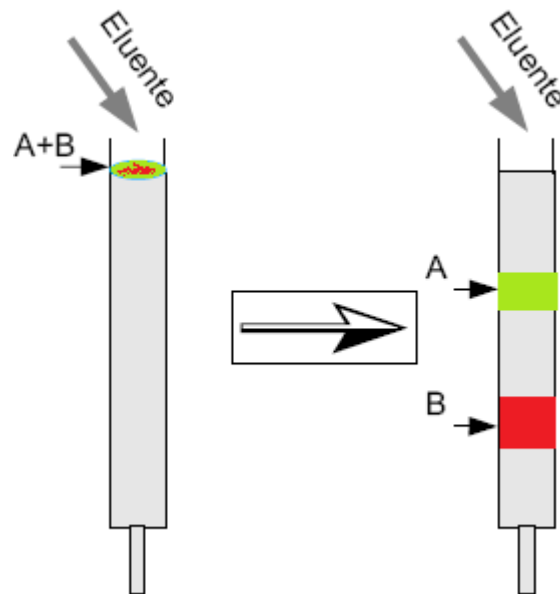


Figura 6.4 - Esempio di colonne cromatografiche SPE.

La classificazione delle diverse tecniche in SPE si basa su un criterio che tiene conto sia dello stato fisico delle due fasi sia del meccanismo della separazione; le tecniche principali si possono suddividere in:

- Cromatografia di adsorbimento – ripartizione;
- Cromatografia di esclusione;
- Cromatografia di scambio ionico;
- Cromatografia di affinità;
- Cromatografia di interazione idrofobica;
- Cromatografia su idrossiapatite.

Le applicazioni di queste tecniche sono vastissime, in quanto consentono di separare specie chimiche di tutti i tipi: dalle molecole e ioni più semplici fino alle macromolecole tipiche dei sistemi viventi come le proteine e gli amminoacidi.

Oggi sono disponibili in commercio colonnine preimpaccate, che consentono di velocizzare i tempi di analisi e garantiscono una maggiore riproducibilità. Le performances analitiche variano in relazione al tipo di fase usata, alla natura del campione ed alla composizione.

In base alla natura delle fase solida presente nella colonnina variano sia la quantità di campione depositato sia la composizione della miscela eluente.

La fase stazionaria è costituita generalmente da un materiale adsorbente silice o silice modificata con gruppi cianopropil-, amminopropil- o diidroidrossipropile (Ruiz-Gutierrez e Perez-camino, 2000).

L'eluizione delle diverse frazioni viene fatta utilizzando come fase liquida solventi organici.

Una semplice procedura per l'isolamento delle classi lipidiche in piccola scala consiste nel preparare una colonnina cromatografica in gel di silice (circa 1 g) e depositare circa 30 mg di estratto lipidico. L'eluizione con cloroformio o dietilere (10 ml) favorirà il recupero dei lipidi meno polari, la successiva aggiunta di acetone (10 ml) favorirà l'eluizione dei glicolipidi ed infine l'eluizione con metanolo (10 ml) permetterà il recupero dei componenti a maggiore polarità (fosfolipidi). Molto spesso però può capitare ad esempio che, nella frazione eluita con acetone, si possa avere coeluizione di glicolipidi e fosfolipidi.

I trigliceridi sono in genere eluiti con una miscela cloroformio/isopropanolo (2:1, v/v) da colonnine in amminopropile, mentre il cloroformio è un buon eluente ove si impieghino colonnine a fase inversa C8.

Gli acidi grassi liberi (FFA) vengono eluiti con una miscela dietilere/acido acetico (98:2, v/v) quando si utilizzano colonnine in amminopropile.

La frazione contenente monogliceridi può essere eluita con cloroformio/metanolo (49:1, v/v) su colonnine in silice o con diclorometano/t-butilmetilere (1:1 v/v) ove si impieghino colonnine in Mega BE-Si (silice) o Mega BE-2OH (diol) da 1g.

Caboni *et al.* (1996) hanno confrontato le performance di diverse colonnine SPE preimpaccate a fase normale (silice, amminopropile) e a fase inversa (C18, C8) nella separazione di fosfolipidi da estratti lipidici ottenuti da diverse matrici alimentari (uova in polvere, carne di pollo, formaggi e salami). In questo caso è stato osservato che le performance migliori sono ottenute con le SPE a fase inversa C8.

6.3 Caratterizzazione delle classi lipidiche

6.3.1 Caratterizzazione della composizione acidica

I componenti principali della frazioni lipidiche di origine animale sono gli acidi grassi. Il termine “acidi grassi” raggruppa tutta una serie di molecole con caratteristiche molto diverse tra loro. Nel caso specifico della carne sono stati identificati acidi grassi che differiscono tra loro per lunghezza di catena (che varia da 4 a 26 atomi di carbonio), grado di insaturazione (monoinsaturi, polinsaturi, coniugati etc.) nonché per isomeria geometrica (cis, trans).

Per poter identificare il maggior numero di acidi grassi occorre ricorrere a tecniche analitiche complesse che utilizzano avanzati metodi cromatografici e spettroscopici.

Le principali tecniche analitiche strumentali utilizzate per la separazione e la successiva identificazione e quantificazione degli acidi grassi individuali in matrici alimentari e biologiche sono tecniche cromatografiche quali la gascromatografia (GC) e l’HPLC (High Performance Liquide Chromatography).

La tecnica gascromatografica è sicuramente quella più comune e conveniente in quanto permette, con un’unica corsa analitica, la determinazione di un numero elevato di acidi grassi grazie all’impiego di un detector universale quale il FID (Detector a Ionizzazione di Fiamma).

In particolari situazioni analitiche viene utilizzata la cromatografia liquida HPLC.

6.3.1.1 Derivatizzazione degli acidi grassi

L’identificazione e la quantificazione, tramite tecniche gascromatografiche o HPLC, degli acidi grassi che compongono le varie frazioni lipidiche viene preceduta dalla loro conversione per derivatizzazione in molecole apolari a basso peso molecolare, spesso in esteri metilici (FAME, Fatty Acid Methyl Esters). Questa trasformazione, detta metilazione quando produce esteri metilici, è fondamentale in quanto permette l’analisi cromatografica di composti altrimenti difficilmente analizzabili consentendo inoltre un’accurata identificazione e quantificazione dei composti stessi. A volte potrebbe essere necessario mascherare anche altri tipi di gruppi funzionali (oltre al gruppo carbossilico), con specifici agenti derivatizzanti. Prima di procedere all’analisi gascromatografica è necessario considerare quale tipologia di derivati è essenziale produrre e quale metodo deve essere impiegato per la loro preparazione. Alcuni metodi di preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi possono essere utilizzati quando gli acidi grassi sono in forma di triacilgliceroli, ma non sono adatti quando questi sono in forma libera. Ce ne sono altri che pur riuscendo a produrre tali derivati da entrambe le forme di acidi grassi, potrebbero provocare reazioni indesiderate a carico di specifiche categorie di acidi grassi (ad esempio a carico dei CLA).

La molteplicità e la complessità delle specie chimiche dei composti noti con il termine “acidi grassi” sono un fattore importante nella scelta del metodo di derivatizzazione da utilizzare nella loro determinazione analitica. Bisogna anche tener presente che tali differenze determinano, in primo luogo, diversità funzionale, che sono alla base della distribuzione e localizzazione delle diverse classi di lipidi all’interno dei vari tessuti fisiologici.

Sarà infatti più probabile trovare fosfolipidi ed esteri degli steroli nei lipidi contenuti nelle membrane, mentre si potrà trovarli sotto forma di trigliceridi, in strutture di accumulo, come i tessuti adiposi. All’interno di ciascuna classe di composti lipidici, poi si differenzieranno per quanto riguarda il tipo, la composizione percentuale, e la quantità nell’ambito delle diverse matrici lipidiche. Altro punto importante da considerare è che spesso alcune matrici, soprattutto quelle di origine animale, presentano una composizione in acidi grassi molto variegata, per esempio nel latte ne sono stati identificati circa 400. Il problema più grande, dal punto di vista analitico, non è però dato dal numero elevato di composti ma dalla vasta gamma di lunghezza della catene carboniosa degli acidi grassi che costituiscono le matrici. In particolare gli acidi grassi a corta catena (dal C4:0 al C10:0), tipici delle matrici come il latte, sono, sotto forma di esteri metilici, molto volatili. Questo fatto rende assai facile la loro perdita per evaporazione, sarà quindi necessario prendere maggiori precauzioni e di conseguenza la loro determinazione analitica risulterà più complicata.

Le differenze di acidità riscontrabili in funzione dell’allungamento della catena alifatica comportano l’instaurarsi di equilibri chimico-fisici assai diversi al variare del peso molecolare. Questo fatto è spesso alla base di ripetibilità/riproducibilità analitiche spesso insoddisfacenti.

6.3.1.2 Metodi di preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi

La formazione degli esteri metilici (FAME) avviene normalmente in presenza di un catalizzatore, sotto forma di miscela o disciolto in metanolo. Esistono molti catalizzatori adatti allo scopo alcuni acidi (HCL, H₂SO₄ e BF₃) e altri basici (NaOCH₃, KOH e NaOH). Quando i FAME sono formati dall’interazione tra acidi grassi e metanolo, la reazione prende il nome di “metilazione” (esterificazione). Dal punto di vista strettamente chimico metilazione e transesterificazione (o esterificazione e transesterificazione) si riferiscono a due differenti reazioni. Sia la transesterificazione che l’esterificazione sono reazioni reversibili. Inoltre mentre la transesterificazione può essere catalizzata sia da acidi che da basi, la reazione di esterificazione è catalizzata solamente da acidi

I triacilgliceroli sono velocemente transesterificati con metanolo anidro e in presenza di un catalizzatore basico secondo lo schema di seguito riportato (Figura 6.5).

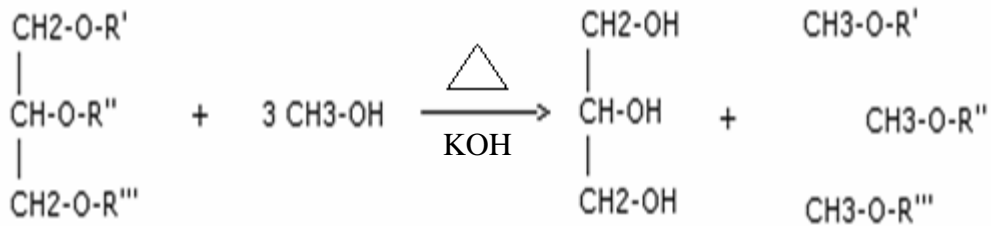


Figura 6.5 - Transmetilazione dei triacilgliceroli in ambiente basico.

La reazione è essenzialmente irreversibile perché l'anione carbossilato stabilizzato per risonanza presenta una piccola tendenza a reagire con l'alcol. Invece l'anione reagisce con Na^+ o K^+ presenti nel mezzo di reazione formando sali stabili detti saponi. Quindi l'idrolisi alcalina degli esteri viene anche detta saponificazione.

La stessa reazione non avviene nel caso degli acidi grassi liberi. Molta attenzione deve essere posta nell'evitare la presenza d'acqua nell'ambiente di reazione per impedire la loro formazione per idrolisi dei trigliceridi.

La metilazione in ambiente basico in presenza di un catalizzatore (NaOCH_3 , KOH , NaOH) avviene in tempi molto ridotti rispetto a quella in ambiente acido e consente di lavorare a temperatura ambiente. In tali condizioni di reazione si evitano in particolare sia i problemi di isomerizzazione dei doppi legami legati alla transesterificazione degli acidi grassi coniugati, sia i problemi legati alla volatilità degli acidi grassi a corta catena.

I catalizzatori basici più comunemente utilizzati hanno il vantaggio di possedere un'ottima attività catalitica anche a temperatura ambiente, per contro non reagiscono con gli acidi grassi liberi e non transesterificano gli sfingolipidi. Tale aspetto non è trascurabile per campioni di latte che abbiano subito fenomeni di lipolisi e campioni di formaggio, specialmente se stagionati, in cui la frazione degli acidi grassi liberi sia piuttosto rilevante o nei campioni di carne e prodotti carnei dove la componente fosfolipidica è importante.

La metilazione in ambiente acido permette invece di transesterificare sia acidi grassi esterificati nel glicerolo che quelli in forma libera; in questo caso le condizioni di reazione prevedono un largo eccesso di metanolo anidro in presenza di un catalizzatore acido ed elevate temperature. Quando si utilizzano alte temperature sarebbe opportuno proteggere gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) con antiossidanti tipo butilato di idrossitoluene (BHT).

L' HCl e l' H_2SO_4 hanno lo svantaggio che - se usati a temperature elevate ($80\text{-}100^\circ\text{C}$) e per tempi di reazione prolungati - provocano reazioni di isomerizzazione dei sistemi coniugati verso

isomeri *trans-trans*, migrazioni dei doppi legami e formazione di metossi e idrossi artefatti, modificando conseguentemente il contenuto originario in acidi grassi del campione di partenza.

Quando si utilizza l'HCl si può ovviare a questi problemi lavorando a 60°C per tempi di reazione inferiori ai 60 minuti in presenza di CH₃COCl come ulteriore catalizzatore di reazione.

Il BF₃ ha gli stessi vantaggi e svantaggi dell'HCl ma - a differenza di quest'ultimo - ha vita molto breve e l'utilizzo di un reattivo vecchio provoca la formazione di artefatti di reazione e la perdita di apprezzabili quantità di acidi grassi polinsaturi (Christie, 1982).

6.3.1.3 Identificazione degli acidi grassi tramite GC

I metodi più comunemente utilizzati per la determinazione del contenuto in acidi grassi presenti nelle matrici di origine naturale sono le tecniche gascromatografiche (GC) o di cromatografia liquida (LC).

La gascromatografia è una tecnica cromatografica in cui la fase mobile è un gas permanente (detto carrier o gas di trasporto) che fluisce attraverso una colonna in cui è posta la fase stazionaria la quale può essere un solido granulare poroso oppure un liquido. All'uscita della colonna un rivelatore segnala il passaggio dei diversi componenti della miscela a un sistema di elaborazione dei segnali (Figura 6.6).

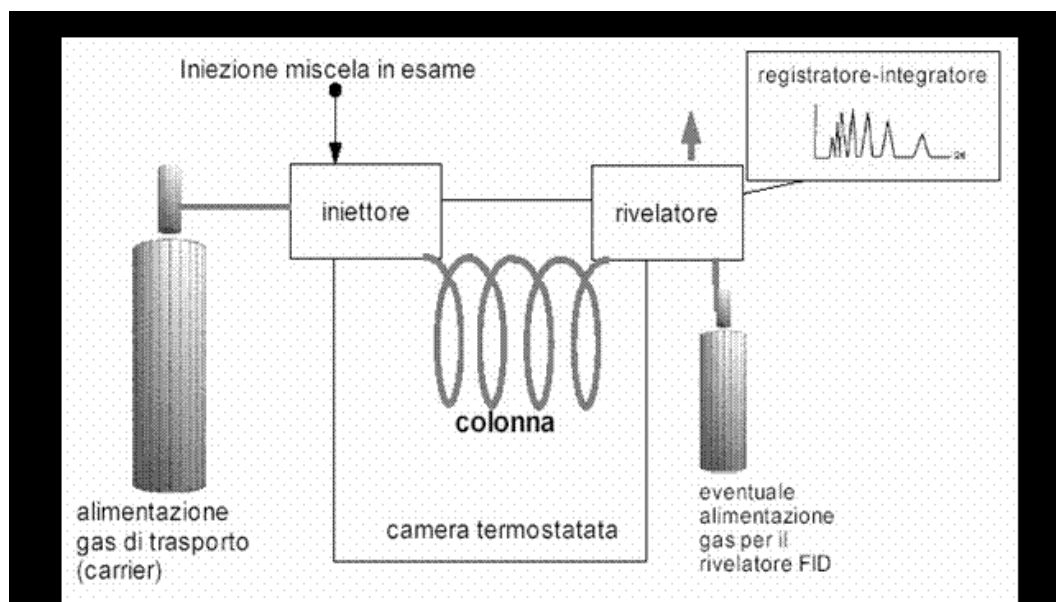


Figura 6.6 - Schema di un gascromatografo.

Quest'ultimo fornisce il cromatogramma, in cui la quantità di sostanza eluita è diagrammata in funzione del tempo che la sostanza ha impiegato per attraversare la colonna detto tempo di ritenzione (RT).

I meccanismi di separazione e le prestazioni della tecnica gascromatografica sono determinati dalle caratteristiche chimico-fisiche della fase stazionaria e dalla forma con cui questa è presente nella colonna (particelle granulari eventualmente ricoperte da un liquido di ripartizione oppure un semplice film fatto aderire sulle pareti interne di un capillare).

Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi, purché siano opportunamente solubilizzati e possano essere evaporati.

Una prima classificazione delle tecniche gascromatografiche fa riferimento allo stato fisico della fase stazionaria e distingue così fra:

- Cromatografia di adsorbimento gas-solido (Gas Solid Chromatography, GSC);
- Cromatografia di ripartizione gas-liquido (Gas Liquid Chromatography, GLC).

La cromatografia di adsorbimento (GSC) fa uso di colonne con materiale impaccante che possiede siti attivi e di un gas di trasporto, in questo caso i soluti vengono separati durante lo sviluppo cromatografico per interazione dei singoli componenti della miscela con il solido di riempimento.

I singoli componenti da separare migrano con velocità diverse perché le interazioni di adsorbimento possiedono una loro specificità.

La cromatografia di ripartizione (GLC) è una tecnica che utilizza una fase stazionaria liquida in cui le specie da separare si sciolgono, ed il gas di trasporto non dà alcuna interazione né con il soluto né con la fase stazionaria.

Una seconda classificazione prende in considerazione sia la geometria della colonna sia la collocazione della fase stazionaria in essa:

- GC su colonne "impaccate": in cui la fase stazionaria è formata da un solido granulare poroso o di un liquido supportato da particelle porose e inerti; la colonna è costituita da vetro o acciaio è lunga da 1 a 6 m con un diametro interno di 0.75-4 mm.
- GC su colonne "capillari": (80% delle colonne per GC vendute) in cui la fase stazionaria è sotto forma di film sottile (0.1-5 μm) adeso alle pareti inerti del capillare caratterizzato da un diametro interno di 0.1-0.75 mm e da una lunghezza che va da 15 a 100 m, (in essa il contatto carrier /fase fissa è migliore).

La classificazione in cui si considera come si presenta la fase stazionaria prevede:

- GC colonne aperte (WCOT): le pareti sono ricoperte da un film di liquido.

- GC colonne aperte con rivestimento supportato (SCOT): come le WCOT ma supportate da materiale granulare poroso fine.
- GC colonne aperte con rivestimento poroso (PLOT): la fase stazionaria è costituita solo da particelle porose fatte aderire alle pareti.

Oggigiorno sono impiegate quasi esclusivamente colonne capillari. Le colonne maggiormente utilizzate nell'identificazione degli esteri metilici sono colonne apolari la cui fase stazionaria è costituita in genere da cianopropil-polisilossano. La separazione dei metilesteri avviene in base al numero di atomi di carbonio della catena e, a parità di lunghezza della catena, in base al grado di insaturazione. La ritenzione gascromatografica aumenta in funzione del numero dei doppi legami, con una discriminazione determinata dalla posizione dei doppi legami (gli acidi grassi insaturi sono tanto più trattenuti quanto più il doppio legame si allontana dal metile terminale della catena alifatica) e dalla loro configurazione (si osservano tempi di ritenzione maggiori per gli isomeri in configurazione *cis* rispetto a quelli con configurazione *trans*). Le colonne rivestite con cianopropil-polisilossano sono adatte alla separazione degli isomeri *cis/trans* dei metil esteri degli acidi grassi, non lo sono invece le colonne rivestite con fasi polari quali polietilenglicole.

Se sono presenti acidi grassi a catena ramificata, l'ordine di eluizione, nelle colonne in cianopropil-polisilossano, prevede, dopo il corrispondente acido a catena lineare, l'uscita dell'isomero il cui metile sostituito è sul carbonio che precede il gruppo terminale (iso) e successivamente quella dell'isomero con il sostituito sul secondo atomo di carbonio prima del metile terminale (anteiso). Le colonne con fase tipo cianopropil-polissilossano, in caso di significative variazioni della programmata di temperatura del forno, potrebbero evidenziare modificazioni importanti nella sequenza di eluizione dei composti, dovute all'elevata affinità di questa fase stazionaria per i composti insaturi.

Per l'analisi degli esteri metilici da matrici alimentari, vengono normalmente utilizzate colonne capillari della lunghezza di 100 metri.

Le prestazioni di un sistema gascromatografico vengono valutate in base a fattori quali:

- Selettività; capacità di eluire due sostanze in tempi diversi, dipende sia dalla temperatura che dalla fase stazionaria, ed è leggermente più elevata per le colonne capillari;
- Efficienza, la capacità di eluire una data sostanza in una banda stretta. La maggior differenza tra impaccata e capillare sta nel fatto che le capillari hanno un numero di piatti teorici tra i 50000 e 150000 e per le impaccate è dell'ordine di 4000, ne deriva che a parità di lunghezza le colonne capillari sono di poco più efficienti delle impaccate, e l'efficienza delle capillari si mantiene quasi inalterata all'aumentare del

flusso del carrier per diminuire i tempi di lavoro. Per ottimizzare l'efficienza di una colonna si può agire su :

- Lunghezza;
 - diametro delle particelle,
 - liquido di ripartizione (poco viscoso, bassa tensione di vapore),
 - temperatura,
 - diametro interno (per le impaccate è meglio piccolo),
 - carrier (dipende dal tipo di rivelatore),
 - flusso.
- Risoluzione,
 - Tempi di lavoro;
 - Asimmetria dei picchi e capacità, una buona separazione non deve presentare fenomeni di tailing (presenza di una coda) e fronting (eccessiva estensione del fronte del picco). Le cause più probabili di asimmetria sono:
 - una scorretta introduzione del campione,
 - particolari caratteristiche chimico-fisiche della fase stazionaria o sua sovrassaturazione.

Per ottenere la massima efficienza si può iniettare piccole quantità di campione compatibili con i limiti di rilevabilità. Le colonne impaccate hanno una capacità maggiore delle capillari.

Come detto all'inizio del paragrafo lo strumento che consente la separazione, il riconoscimento e la quantificazione dei componenti di una data miscela è il gascromatografo. Esso è costituito essenzialmente da quattro parti: la sorgente del gas di trasporto, la zona d'iniezione e vaporizzazione della miscela in esame, la colonna cromatografica (contenuta in una camera termostata) ed il rivelatore (detector), collegato ad un sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati (computer).

La fonte del gas di trasporto, di per sé, non è parte integrante del GC ma ha comunque una funzione fondamentale per tutto il dispositivo. In genere si usano bombole di acciaio di capacità diversa secondo il tipo di gas. Il gas di trasporto normalmente usato è elio o idrogeno per colonne capillari, mentre per quelle impaccate è azoto o elio.

La zona di iniezione il cui compito è quello di assicurare l'istantanea vaporizzazione del campione è corredata da un sistema di resistenze variabili attraverso le quali è possibile fissare la temperatura ritenuta più adatta per la vaporizzazione della miscela. L'introduzione del campione viene effettuata con una iniezione su un apposito disco di gomma al silicone, posto tra una ghiera metallica e il dispositivo di attacco alla colonna.

Le colonne sono alloggiare in una camera termostatica, in genere a circolazione di aria calda, con questo sistema viene assicurata una buona stabilità di temperatura. Un dispositivo permette all'operatore di fissare la temperatura, la quale può essere mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi (isoterma) oppure fatta variare (programmata).

I dispositivi in grado di rivelare la presenza di una sostanza estranea nel gas di trasporto, a valle della colonna, possono dividersi in universali e selettivi. I primi consentono di individuare tutti i componenti di una miscela, i secondi rivelano solo particolari categorie di composti.

Attualmente i rilevatori più usati sono di tipo differenziale, ossia forniscono una linea di base piatta quando dalla colonna esce solo il carrier, mentre danno un picco più o meno simmetrico in corrispondenza di una banda di eluizione. I rilevatori più utilizzati sono:

- ❖ Rivelatore a cattura di elettroni (ECD);
- ❖ Rivelatore a termoconducibilità (HWD);
- ❖ Rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Nel caso della determinazione degli esteri metilici il detector utilizzato è il FID (FID, Flame Ionization Detector). Questo tipo di rivelatore consente l'individuazione di tutti i componenti di una miscela con una sensibilità più o meno elevata e – nel caso dei FAME – in linea di principio costante. Il FID è un detector di tipo distruttivo, in quanto le sostanze separate vengono bruciate e portate allo stato di ioni in fase gassosa. Il flusso ionico determina un incremento di corrente proporzionale al numero di atomi di carbonio presenti nella molecola combusta.

Il FID è un rivelatore poco selettivo, quasi universale. Infatti sono poche le sostanze con potenziale di ionizzazione così alto da non poter essere ionizzate nelle condizioni di esercizio dei rivelatori. Poiché non rivela l'acqua, è adatto anche per analisi di soluzioni acquose e, nel caso di gas, non risente della presenza di umidità.

Il FID è un rivelatore molto sensibile. In condizioni ottimali il limite di rivelabilità, può arrivare a circa $10^{-9} \div 10^{-12}$ g con dinamiche di risposta lineare di $10^6 \div 10^8$. E' molto robusto e può sopportare un esercizio continuo per tempi lunghi assicurando comunque prestazioni soddisfacenti.

L'identificazione dei singoli esteri metilici avviene per confronto dei tempi di ritenzione degli analiti con quelli di opportuni standard.

6.3.1.4 Identificazione degli acidi grassi tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

La cromatografia in fase liquida a elevata prestazioni (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), rappresenta la naturale evoluzione strumentale della cromatografia su colonna a bassa pressione. In pochi minuti si possono effettuare separazioni di miscele anche molto complesse ed è possibile determinare anche la composizione quantitativa oltre a ottenere informazioni decisive sulla natura chimica delle sostanze analizzate. La separazione dei componenti avviene tramite interazioni che si creano fra i costituenti della miscela e le due fasi. Le interazioni possono essere di tipo elettrostatico, dipolo-dipolo, forze di Van Der Waals oppure tramite un meccanismo di scambio ionico. Questo dipende dalle proprietà sia delle due fasi sia della miscela da separare.

La fase mobile è un liquido a bassa viscosità, mentre la fase stazionaria è costituita da microparticelle porose, eventualmente rivestite da una fase liquida. La fase stazionaria è ben impaccata in una colonna, lunga in genere da 3 a 50 cm, con un diametro interno (ID) di pochi millimetri, sono comunque disponibili anche colonne capillari.

Nell'HPLC la forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna, è rappresentata dalla pressione che è applicata da una pompa in testa alla colonna e forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria. Questo permette non solo di rendere il processo più rapido ma anche di ottenere un maggior numero di piatti teorici il che vuol dire una migliore risoluzione.

Nella moderna cromatografia liquida, sono richieste pressioni di pompaggio di diverse centinaia di atmosfere, per raggiungere velocità di flusso sufficienti a permettere una buona separazione in colonne impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 10 μm . Alla fine della colonna è presente un opportuno rilevatore (IR, UV-VIS, spettrofluorimetro, spettrometro di massa) e un sistema di elaborazione dei dati che permettono una analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi la quantificazione e/o identificazione delle sostanze iniettate.

La Figura 6.7 mostra i più importanti componenti di un tipico strumento per HPLC.

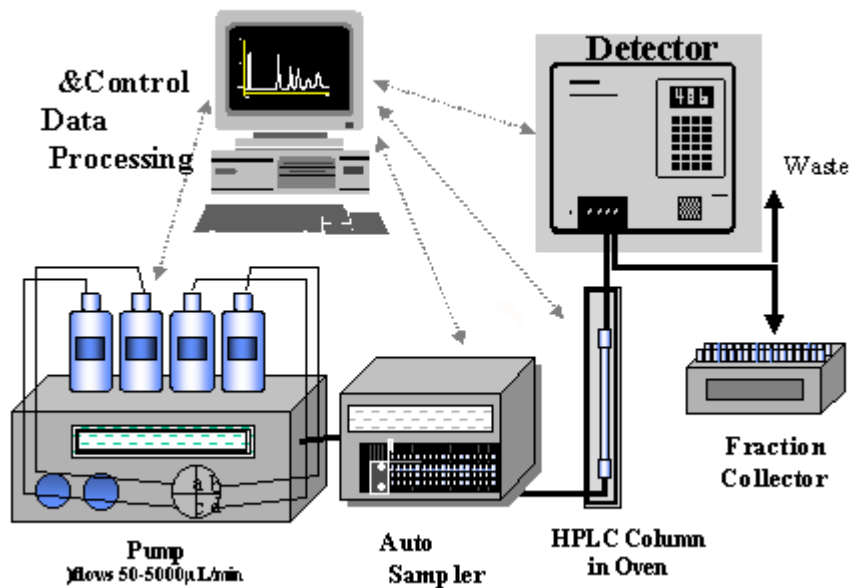


Figura 6.7 - Rappresentazione di un tipico strumento per HPLC.

I principali vantaggi di questa tecnica sono: la pressoché assenza di diffusioni longitudinali (movimenti longitudinali dell'analita all'interno della colonna in funzione di gradienti di concentrazione); costanza e regolarità della velocità di eluizione (passaggio della fase mobile attraverso la colonna); velocità di analisi; piccole quantità di analita necessaria all'analisi (nell'ordine dei 5-10 microgrammi di campione solubilizzato in apposito solvente) non a discapito dell'accuratezza e della precisione.

Come per la GC esistono diversi criteri di classificazione delle numerose varianti della tecnica HPLC. Una prima classificazione molto generale fa riferimento alla nota consuetudine di definire "normale" una cromatografia eseguita con fase stazionaria polare e fase mobile apolare per cui si distingue fra:

- *Cromatografia normale (Normal Phase Chromatography, NPC);*
- *Cromatografia a fase inversa (Reverse Phase Chromatography, RPC).*

Se invece ci si basa sul meccanismo principale della separazione e sulla natura delle fasi, si distingue fra:

- *Cromatografia di adsorbimento liquido-solido (Liquid-Solid Chromatography, LSC);*
- *Cromatografia di ripartizione liquido-liquido (Liquid-Liquid Chromatography, LLC);*
- *Cromatografia d'esclusione (Size Exclusion Chromatography, SEC);*

- *Cromatografia di scambio ionico (Ion, Exchange Chromatography, IEC) e cromatografia ionica (Ion Chromatography, IC);*
- *Cromatografia di affinità (Affinity Chromatography, AFC);*
- *Cromatografia di coppia ionica (Ion Pair Chromatography, IPC);*

Infine, se si fa riferimento alle particolari caratteristiche delle fasi stazionaria, si può distinguere fra:

- *Cromatografia su fase legata (Bonded Phase Chromatography, BPC);*
- *Cromatografia su fase chirale (Chiral Phase Chromatography, CPC).*

Le tecniche HPLC hanno ricoperto sino a poco tempo fa un ruolo marginale nell'analisi della composizione lipidica nelle matrici alimentari, in quanto il rivelatore UV a serie di diodi, normalmente accoppiato a questi strumenti, permetteva l'identificazione di molecole dotate di assorbimento nella regione UV dello spettro, in possesso quindi di almeno un doppio legame carbonio-carbonio nella catena alifatica. Il crescente interesse scientifico nei confronti degli acidi grassi insaturi ha fatto sì che la tecnica HPLC sia stata, negli ultimi anni, spesso applicata alla separazione e alla quantificazione degli isomeri geometrici e posizionali dei CLA, i cui due doppi legami coniugati assorbono all'UV con massimo compreso tra 232 e 234 nm. L'HPLC è stata utilizzata anche nelle indagini su matrici non tradizionali o in presenza di analiti con gruppi funzionali sensibili al calore; inoltre, dal momento che le tecniche HPLC sono generalmente di tipo non distruttivo e permettono l'introduzione di una maggiore quantità di campione in colonna, esse possono essere impiegate per scopi semi-preparativi o preparativi.

Le tecniche HPLC che trovano maggiore impiego nell'analisi degli isomeri dell'acido linoleico coniugato prevedono sostanzialmente l'uso di fasi stazionarie inverse o a ioni argento.

Le fasi stazionarie a base di gel di silice (HPLC in fase diretta) possono essere impiegate per l'analisi o per l'isolamento di acidi grassi che contengono gruppi funzionali polari, in particolare porzioni ossigenate come gli idroperossidi. La separazione avviene in base al numero ed al tipo di gruppi funzionali polari presenti negli analiti di interesse. L'HPLC in fase diretta risente tuttavia di grossi svantaggi che ne hanno notevolmente ridotto il campo di utilizzo, legati essenzialmente all'impiego di solventi poco polari e al ristretto range di pH sfruttabile.

6.4 Determinazione degli Acidi Linoleici Coniugati (CLA)

La determinazione degli isomeri degli acidi linoleici coniugati (CLA) e dei C18:1 (*cis/trans*) può essere effettuata sia mediante analisi gascromatografica sia mediante cromatografia HPLC. Negli alimenti sono stati individuati 20 isomeri CLA differenti (Sehat *et al.* 1998). L'utilizzo della gascromatografia con le migliori colonne capillari attualmente disponibili non consente di ottenere una sufficiente risoluzione per separarli ed identificarli tutti. Questo è invece possibile mediante l'impiego di tecniche HPLC con colonne a ioni d'argento.

6.4.1 Identificazione degli isomeri coniugati dell'Acido Linoleico Coniugato (CLA) mediante gascromatografia (GC)

I primi passi per la separazione degli isomeri del CLA furono fatti negli anni '60, con l'introduzione della TLC a ioni di argento (Thin Layer Chromatography). Il vero salto in avanti fu, però, fatto solo con l'utilizzo della gascromatografia con colonne capillari, data la bassa concentrazione di queste sostanze, nelle matrici naturali (0.1%-2 %). Attualmente le colonne migliori sono quelle apolari che hanno almeno una lunghezza di 100 m. La gascromatografia, però, non è completamente risolutiva. Esistono, infatti, problemi di coeluizione anche con le colonne lunghe 100m. E' possibile che alcuni isomeri del CLA coeluiscono con altri acidi grassi che si ritrovano naturalmente nelle matrici lipidiche di origine animale come il C21:0 (figura 6.8).

Fra i vari isomeri del CLA quelli che presentano il primo doppio legame con geometria *cis* sul carbonio a numero più basso, eluiscono a tempi minori rispetto a quelli che lo recano su di un carbonio a numerazione più alta. A parità di posizione del legame *cis*, fluisce a tempi più bassi, l'isomero con il legame *trans* sul carbonio a più bassa numerazione. Come conseguenza si ha che gli isomeri del tipo *cis, trans* escono prima di quelli *trans, cis*. Un altro aspetto importante è legato al fatto che il secondo isomero più rappresentato nel latte e nella carne dei ruminanti, dopo il 9c, 11t, è il 7t, 9c che coeluisce con il 9c, 11t anche usando colonne capillari da 100 m, ma può essere separato in HPLC utilizzando tre colonne in serie a ioni. L'identificazione dei differenti isomeri del CLA tramite gascromatografia può essere fatta accoppiando tale tecnica ad uno spettrofotometro FTR o ad uno spettrometro di massa.

Nel primo caso si sfruttano le differenze nel numero di bande e nella loro esposizione in due regioni dello spettro 2800-3000 e 980-950 cm^{-1} , nel secondo caso si sfrutta la differente frammentazione degli addotti di Diels Alder dei dieni coniugati con il 4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-dione (MTAD) o con il 2-alchenil-4,4-dimetilossazolina (DMOX).

Spesso la quantificazione per via gascromatografica viene effettuata utilizzando delle curve di calibrazione con standard interno, quello più utilizzato è il MeC19:0, metilestere del C19:0.

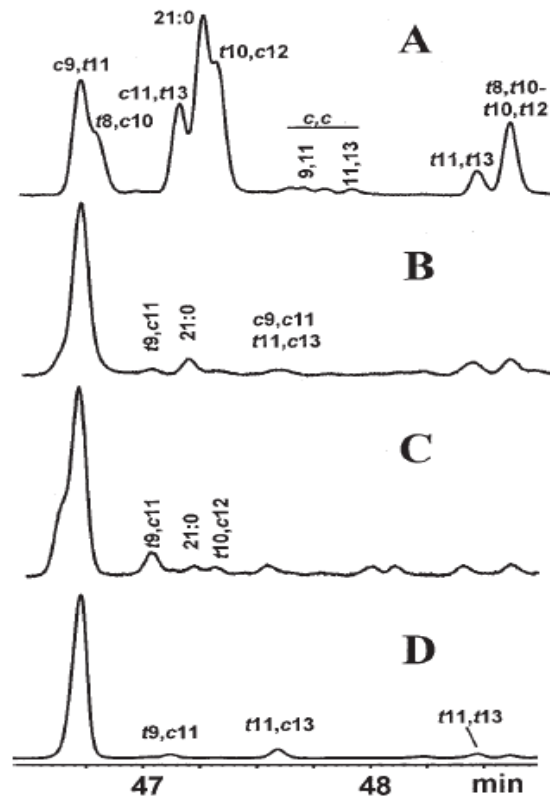


Figura 6.8 - Separazione degli isomeri di CLA in gascromatografia utilizzando una colonna apolare da 100 m.

Il cromatogramma A mostra il profilo di una miscela standard di CLA addizionata con C21:0, il cromatogramma B mostra un campione di latte dove il C21:0 è naturalmente presente, il cromatogramma C mostra un campione di latte prodotto da vacche alimentate con farina di pesce, mentre il cromatogramma D mostra il formaggio prodotto dal latte di vacche al pascolo, da Kramer *et al.*, (2004).

6.4.2 Identificazione degli isomeri dell'Acido Linoleico Coniugato (CLA) mediante cromatografia liquida (HPLC)

L'identificazione degli isomeri dell'acido linoleico coniugato realizzata mediante HPLC con colonna a ioni d'argento è attualmente il miglior metodo a disposizione per separare ed isolare gli isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico coniugato (CLA).

Si utilizzano colonne impaccate con particelle del diametro di 5-10 μ m con gruppi di acido fenilsolfonico legati ad un substrato di silice o con substrati simili che prevedano lo scambio dei protoni dell'acido solfonico con gli ioni d'argento. La separazione degli isomeri del CLA può essere realizzata secondo tre approcci differenti:

- Come esteri metilici,
- Come p-metossifenacilesteri,
- Come acidi grassi liberi.

Il più utilizzato è il primo che prevede l'uso di una fase mobile costituita da esano e piccole quantità di acetonitrile (0.1%) in fase mobile isocratica ad un flusso di 1 ml/min e una rivelazione al detector UV a 233 nm, (Kramer *et al.* 1999). Buoni risultati in termine di separazione sono stati ottenuti anche con una fase mobile costituita da esano/etere dietilico/acetonitrile in proporzione 99.4/0.5/0.1 (Kramer *et al.* 2004). Per ottimizzare la separazione dei singoli isomeri è necessario collegare in serie più colonne. Anche se in letteratura si ritrovano casi in cui sono state utilizzate fino a sei colonne contemporaneamente, per la maggior parte degli scopi è sufficiente utilizzare tre colonne. La sequenza d'eluizione prevede che compaiano prima gli isomeri *trans, trans*, poi i *cis, trans* e infine i *cis, cis* (Tabella 6.4).

Tabella 6.4 - Ordine di eluizione degli isomeri metilesteri geometrici e posizionali del CLA con colonna a ioni d'argento in HPLC (Ag^+ -HPLC)^a (da Kramer *et al.*, 1999).

trans,trans-18:2^b	cis,trans-18:2^{b,c}	cis,cis-18:2^b
(13t,15t) ^d	(13,15 c/t)	(13c,15c)
12t,14t	12,14 c/t	12c,14c
11t,13t	11t,13c	11c,13c
10t,12t	11c,13t	10c,12c
9t,11t	10,12c/t	9c,11c
8t,10t	9c,11t	8c,10c
7t,9t	9t,11c	7c,9c
(6t,8t)	8,10c/t	
	7t,9c	

^a L'eluizione della classe prevede : tutti gli isomeri posizionali (CLA) trans,trans, seguiti da tutti i *cis/trans*, seguiti a loro volta da tutti i *cis/cis*.

^b L'eluizione osservata di ogni classe di isomeri geometrici CLA aumenta al diminuire del valore di Δ .

^c Per lo stesso isomero posizionale, l'isomero geometrico *cis,trans* ed il relativo *trans,cis* è stato analizzato per coppie dispari di valori di Δ , e non per Δ dispari. L'ordine di eluizione dell'11,13-18:2 si è dimostrato opposto comparato con quello dell'isomero geometrico 9,11-18:2. L'ordine di eluizione del 7,9-18:2 non è stato determinato.

^d Gli isomeri CLA mostrati in parentesi non sono stati confermati.

Le problematiche più comuni legate a questo tipo di separazioni risiedono nella difficoltà di raggiungere tempi di ritenzioni complessivi riproducibili. Questo problema deriva principalmente dalla temperatura e dalla precisione con la quale è possibile preparare la fase mobile, che è costituita in questo caso da solventi assai volatili e solo in minima parte reciprocamente miscibili. In più la maggior parte dei sistemi cromatografici muniti di pompa multisolvente riescono a miscelare i vari solventi con una precisione massima dell' 1% per componente, per cui non è possibile automatizzare la composizione della fase mobile in linea. L'impiego di solventi preparati di fresco ad ogni sessione analitica unitamente alla costante agitazione della fase mobile riducono questi effetti senza tuttavia annullarli

Per far fronte al problema dello scostamento dei volumi di ritenzione tra un'analisi e l'altra, può essere utilizzato il toluene come picco di riferimento, il cui volume di ritenzione viene utilizzato per calcolare quello relativo di ogni isomero di CLA (Delmonte *et al.*, 2005).

Poiché non è attualmente disponibile uno standard interno per i CLA, cioè uno standard con doppi legami coniugati non presente nella matrice, la determinazione quantitativa può essere

realizzata o con il metodo dell'aggiunta, utilizzando standard commerciali dei singoli isomeri, oppure mediante la realizzazione di curve di calibrazione con il metodo dello standard esterno.

6.5 Determinazione dei fosfolipidi (PL)

I fosfolipidi sono molecole simili ai trigliceridi, infatti la molecola del glicerolo invece di essere esterificata con tre acidi grassi è esterificata con due acidi grassi e una molecola di acido fosforico, alla quale poi è legata un'altra molecola caratterizzante il fosfolipide. I fosfolipidi sono componenti biologicamente importanti, in quanto si trovano nelle membrane cellulari dei sistemi vegetali e di quelli di origine animale, insieme a steroli, come fitosteroli e colesterolo rispettivamente. La loro presenza e la loro composizione, insieme ad altre molecole, sono determinanti nella trasmissione di molecole (cataboliti e metaboliti), da una parte all'altra della cellula. Negli alimenti sono quindi naturalmente presenti, ma possono anche essere aggiunti, soprattutto nei formulati, in relazione alla loro capacità di stabilizzare le emulsioni. La scissione di un acido grasso dalle molecole di fosfolipidi dà origine ai corrispondenti liso-fosfolipidi, che rappresentano i componenti traccianti della degradazione dei fosfolipidi.

L'analisi di questa classe di lipidi può essere eseguita tramite risonanza magnetica nucleare ^{31}P , HPLC, TLC, e misurando il contenuto totale in fosforo (Vanhoutte *et al.*, 2004). Nel corso degli ultimi decenni, tuttavia, l'HPLC è divenuto il metodo più utilizzato per la determinazione dei fosfolipidi in quanto l'analisi qualitativa e quantitativa può essere facilmente realizzata a costi relativamente bassi se confrontati con quelli della risonanza magnetica nucleare ^{31}P . L'applicazione del metodo HPLC per separare le diverse classi di fosfolipidi è stata eseguita per la prima volta da Jungalwala *et al.* (1975). Il metodo offre velocità, risoluzione, alta sensibilità e specificità (Lima, 2002), inoltre l'uso di temperature inferiori a quelle della tecnica gascromatografica, riduce il rischio di isomerizzazione degli acidi grassi insaturi. Rispetto alla TLC si ha una minore esposizione del campione all'ossigeno atmosferico, diminuendo il rischio di autossidazione dei fosfolipidi (Pulfer e Murphy, 2003). Le frazioni separate per HPLC possono essere, inoltre raccolte per analisi successive (Robins e Patton, 1986).

La tecnica HPLC è utilizzata principalmente per la separazione delle diverse classi lipidiche, tuttavia, per la separazione delle specie molecolari di una specifica classe sono stati sviluppati alcuni metodi usando la cromatografia a fase inversa (Olsson e Salem, 1997).

6.5.1 Fasi stazionarie

6.5.1.1 HPLC a fase inversa (RP-HPLC)

Nella RP-HPLC la fase mobile è più polare della fase stazionaria. Essa viene utilizzata per separare le singole specie molecolari di una classe particolare di fosfolipidi (Bunger e Pison, 1995). Il campione sarà separato in base ad un meccanismo di partizione e sarà eluito in base alla lipofilicità legata all'effetto combinato della lunghezza della catena e del numero di doppi legami delle catene laterali degli acidi grassi (Perona e Ruiz-Gutierrez, 2003). Gli acidi grassi a catena più corta avranno tempi di ritenzione più lunghi (Pacetti *et al.*, 2004). Ogni doppio legame è equivalente, in termini di tempi di ritenzione, a circa due gruppi metileneci poiché i doppi legami accorciano la lunghezza della catena. Questo porterà alla coeluizione di alcuni picchi. Al fine di ottimizzare le condizioni di separazione di coppie critiche, è stata concepita la seguente equazione:

$$ECN = CN - 2n$$

dove ECN sta per numero di carbonio equivalente, CN per la somma degli atomi di carbonio degli acidi grassi esterificati sulla frazione del triacilglicerolo, e n per la somma dei doppi legami (Andrikopoulos, 2002). E' possibile migliorare la tecnica RP-HPLC per l'analisi dei fosfolipidi agendo sulla temperatura. L'utilizzo di una programmata in cui la temperatura aumenta gradualmente in modo da tener conto della volatilità del campione, aumenta la risoluzione dei picchi. L'uso di TLC o HPLC a fase normale, prima dell'analisi con la RP-HPLC, per la separazione delle differenti classi lipidiche elimina il problema delle specie molecolari PE, PC e la co-eluzione di PI. Infine, può rivelarsi utile idrolizzare prima il campione con fosfolipasi C per rimuovere i gruppi di testa polari, dato che sono le catene di acidi grassi la componente che discrimina le specie molecolari dei fosfolipidi con RP-HPLC (Zhang *et al.*, 2002).

6.5.1.2 HPLC a fase normale

La tecnica HPLC a fase normale è costituita da una fase mobile non polare e da una fase stazionaria polare.

Questo tipo di tecnica prevede per la separazione dei fosfolipidi, l'utilizzo di una colonna in silice in genere lunga tra i 100 e 250mm e un diametro interno da 2 a 4.6mm. Alcuni metodi utilizzano il gel di silice chimicamente modificato con diolo, cianopropile, o più comunemente con amminopropile per modificare la polarità. I fosfolipidi sono separati tramite un meccanismo di adsorbimento e l'eluizione avviene in base alla polarità del gruppo di testa, dai fosfolipidi non

polari a quelli polari (Andrikopoulos, 2002). Questo in genere si traduce in un ordine di eluizione di PG, PE, PI, PS e PC.

6.5.2 Fasi mobili

La scelta della fase mobile per l'analisi dei fosfolipidi è legata al tipo di rivelatore che si sceglie di utilizzare. La maggior parte dei metodi usano un gradiente di eluizione che può essere un sistema di solventi binario o ternario a causa della polarità delle differenti classi di fosfolipidi. Generalmente si utilizza all'inizio dell'analisi un solvente a bassa polarità e si finisce con una miscela di solventi a polarità maggiore in modo da permettere una buona separazione di tutte le classi di fosfolipidi (Breton *et al.*, 1989). La fase mobile più comune è una miscela di cloroformio-metanolo in cui la percentuale di metanolo viene mano a mano aumentata oppure viene aggiunta acqua al gradiente. Altri popolari solventi includono esano, 2-propanolo, etanolo, acqua e acetonitrile. L'idrossido di ammonio o l'ammoniaca possono essere aggiunti come buffer per rendere la fase mobile più alcalina e migliorare la separazione del PI (Gunnarsson *et al.*, 1997). I sali d'ammonio prevengono anche il degrado della colonna (Guan *et al.*, 2001). L'acido trifluoroacetico (TFA) è spesso aggiunto come catalizzatore per neutralizzare il gruppo fosfato carico dei fosfolipidi e ridurre i rischi di reazioni secondarie tra la fase stazionaria e i gruppi funzionali polari. (Suchocka *et al.*, 2003).

6.5.3 Rivelatori

In cromatografia liquida il problema della rivelazione è piuttosto complesso poiché l'analita è presente in soluzione in concentrazioni molto inferiori a quelle dell'eluente, creando l'esigenza di sfruttare proprietà specifiche dell'analita o caratteristiche comuni all'eluente ma che varino notevolmente in presenza dell'analita.

Si sono quindi sviluppate principalmente due classi di rivelatori, quelli bulk property, che misurano una proprietà fisica comune all'eluente e al soluto, e quelli solute property che funzionano misurando una proprietà chimica o fisica del soluto. Anche nel caso dei fosfolipidi la scelta del detector influisce spesso pesantemente sullo sviluppo del metodo e quindi sulla scelta delle condizioni analitiche da impiegare per la separazione cromatografica.

I rivelatori spettrofotometrici UV sono sicuramente i detectors più comunemente impiegati in HPLC. Molti fosfolipidi assorbono nel range UV di 190–210 nm. Nonostante i rivelatori UV siano molto sensibili, molti solventi utilizzati per la determinazione dei fosfolipidi come il cloroformio, il dietilere e l'acetone, non possono essere usati come fase mobile in quanto assorbono nel range UV. La rivelazione tramite i detectors UV dipende inoltre, dai doppi legami presenti nei gruppi acilici insaturi. Questo perché il carbonile ed i doppi legami C = C sono i soli gruppi funzionali che assorbono nell'UV (Hoving, 1995).

Per migliorare l'assorbimento dei campioni all' UV è possibile derivatizzarli con benzoati, dinitrobenzoati, pentafluorobenzoati (Dobson e Deighton, 2001).

Tra i rivelatori per HPLC che presentano il vantaggio di non richiedere procedure di derivatizzazione post-colonna, sono di notevole interesse quelli a indice di rifrazione e quelli evaporativi a diffusione di luce laser (ELSD).

I rivelatori ad indice di rifrazione non sono molto sensibili e possiedono un alto indice di variabilità dovuta alle differenze di temperatura, pressione, e portata dei solventi (Stith *et al.*, 2000). Inoltre tali rivelatori richiedono condizioni di eluizione isocratiche che non consentono una buona risoluzione di tutte le classi fosfolipidi (Hoving, 1995). Un altro rivelatore di recente introduzione che per le sue caratteristiche di universalità può essere scelto per la rivelazione dei differenti fosfolipidi mediante HPLC è il detector evaporativo a diffusione di luce laser (ELSD). Il solvente che emerge dalla fine della colonna viene evaporato in un flusso di aria o azoto in una camera di riscaldamento (Figura 6.9), il soluto non evapora, ma viene nebulizzato e passato, sotto forma di minute goccioline, attraverso un fascio di luce, che è riflessa e rifratta. La luce diffusa viene raccolta da un fotodiodo che genera un segnale elettrico. Con questo tipo di detector i solventi utilizzati per l'eluizione devono essere più volatili del campione e non devono contenere ioni organici. Uno dei principali vantaggi è il fatto che i detectors ELSD sono sensibili alla massa dell'analita e quindi non limitati dalle caratteristiche di assorbimento delle specie in soluzione o dalla natura dell'eluente stesso, consentendo una maggiore flessibilità nella scelta della fase mobile e nella impostazione di eluizioni a gradiente. Lo svantaggio principale di questo tipo di detectors sta nel fatto di essere distruttivi, limitando l'applicazione a scopi analitici e precludendo la possibilità di corse preparative. Ai fini della quantificazione ciascuna classe può essere calibrata separatamente. Generalmente i fosfolipidi acidi quali PI e PS hanno un segnale minore (Stith *et al.*, 2000). Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che additivi post-colonna, come il nitrato d'argento consentono una risposta del rivelatore che può essere monitorata e un aumento della precisione di quantificazione attraverso la creazione di una relazione lineare (Heron *et al.*, 2004).

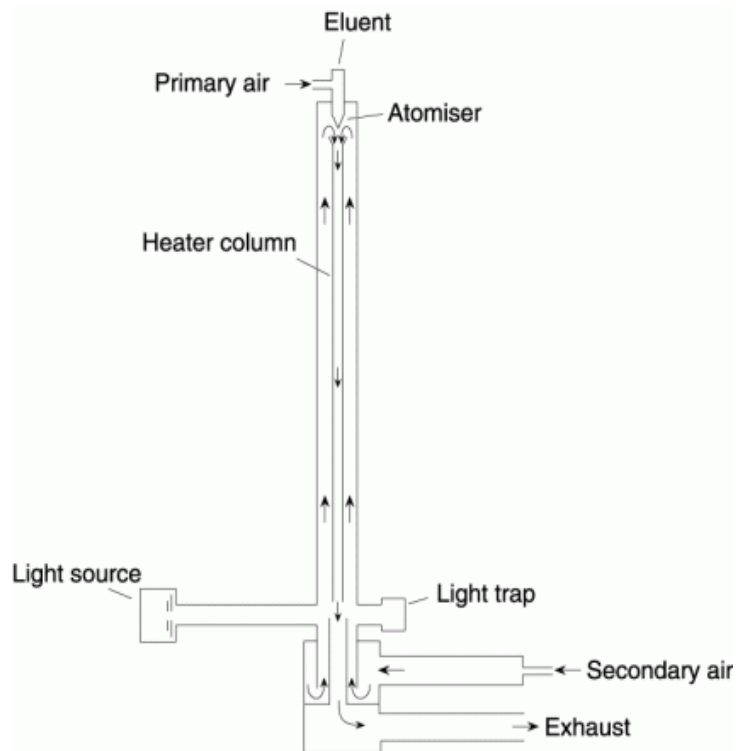


Figura 6.9. - Rappresentazione schematica di un detector ELSD.

Capitolo 7

I° Contributo sperimentale

Come riportato nell'introduzione l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di confrontare, su carne d'agnello, le principali metodologie di estrazione della materia grassa, il metodo di riferimento e diversi metodi alternativi "a freddo", valutandone le performance relativamente alla capacità quantitativa di estrazione, alla quantità ed alla composizione acidica delle varie classi lipidiche estratte, nonché alla identificazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi.

7.1 Materiali e Metodi

Il campionamento della carne d'agnello è stato effettuato presso il settore di chimica del DIRPA (Dipartimento per la ricerca nelle produzioni animali, Agris Sardegna). I campioni di carne sono stati prelevati da un agnello macellato nel mese di maggio del 2009. I muscoli prelevati (*Quadriceps Femoris e Gluteosbiceps*), sono stati triturati con un tritacarne, omogeneizzati e suddivisi in aliquote di 10g circa. Ciascuna aliquota è stata messa sotto vuoto e congelata ad una temperatura di -20°C . Prima di ogni analisi i campioni sono stati scongelati gradualmente mantenendo il campione ad una temperatura di circa 4°C per 12 ore.

Su ciascun campione di carne d'agnello sono state effettuate le seguenti determinazioni analitiche:

- Estrazione della frazione lipidica e determinazione del contenuto ponderale in grasso;
- Identificazione qualitativa delle diverse classi di composti che costituiscono gli estratti lipidici dei campioni di carne tramite cromatografia su strato sottile;
- Separazione quantitativa delle diverse classi di composti che costituiscono gli estratti lipidici dei campioni di carne mediante cromatografia su fase solida SPE;
- Separazione e quantificazione dei FAME componenti le classi lipidiche separate;
- Identificazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi.

7.2 Estrazione della frazione lipidica

La frazione lipidica di ciascun aliquota di carne è stata estratta in triplo con le principali metodologie d'estrazione della materia grassa, il metodo di riferimento e tre metodi "alternativi".

- metodo di riferimento (AOAC,1990);
- metodo Folch (J. Folch *et al*, 1956);
- metodo Folch modificato (Christie W.W., 1989);
- metodo Hara-Radin (A. Hara and N. Radin, 1978).

7.2.1 Metodo di riferimento: AOAC, 1990

Questa procedura consente la quantificazione del contenuto in lipidi grezzi o estratto etereo, determinato gravimetricamente mediante estrazione con apparecchiatura Soxtec. Il campione viene estratto mediante etere di petrolio, il solvente viene evaporato ed il residuo essiccato e pesato.

Reagenti

Etere di petrolio con punto di ebollizione compreso fra 40 e 60°C.

Sabbia lavata con acido cloridrico e calcinata.

Apparecchiature

Ditali in cellulosa

Cotone sgrassato

Bagnomaria

Apparecchiatura di estrazione automatica con bicchieri di estrazione in alluminio o vetro e supporti per ditali

Stufa elettrica

Bacchettine di vetro della lunghezza di circa 12cm.

Palline di vetro

Bilancia analitica

Essiccatore

Procedimento:

- Pesare circa 3-5 g di campione ed introdurli nel ditale di estrazione contenente una piccola quantità di sabbia.

- Mescolare con una bacchettina di vetro e dopo aver aggiunto altra sabbia se necessario, mettere il ditale nel supporto per ditali ed essiccare in stufa a 125°C per un'ora.
- Essiccare i bicchieri di estrazione contenenti le palline di vetro in stufa a 125°C per due ore.
- Porre i bicchieri in essiccatore, portarli a temperatura ambiente e pesarli.
- Portare a temperatura ambiente i ditali contenenti il campione.
- Introdurre il ditale nel sistema di estrazione.
- Estrarre con 40ml di etere di petrolio per 25min. in posizione di ebollizione e per altri 30min. in posizione di risciacquo.
- Completata l'estrazione chiudere le valvole del condensatore e recuperare il solvente.
- Essiccare in stufa i bicchieri contenenti l'estratto e le palline di vetro per 30min. circa a 125°C.
- Porre i bicchieri in essiccatore a temperatura ambiente e pesarli.
- Ripetere essiccazione e pesata fino a peso costante.

7.2.2 Metodo Folch

(Folch, *et al.*, 1956)

Questo metodo di estrazione è particolarmente indicato per qualsiasi tipo di indagine sulla componente lipidica in quanto permette l'estrazione dei lipidi totali finalizzata all'analisi qualitativa degli stessi e, nel contempo, può essere utilizzata per la determinazione quantitativa del grasso.

Reagenti

Cloroformio.

Metanolo.

KCl 0.7%.

Apparecchiature

Ultraturrax.

Imbuto separatore.

Preparazione della upper phase

- Miscelare in un imbuto separatore cloroformio/metanolo/acqua in rapporto 8:4:3 (v/v/v).
- Aspettare la separazione delle fasi.
- Raccogliere in due bottiglie di vetro la fase inferiore (lower phase) e la fase superiore (upper phase).

Procedimento:

- Pesare in una beuta da 500ml 10g di carne.
- Omogeneizzare per 3 minuti con una miscela di 200ml di cloroformio/metanolo (2:1 v/v).
- Filtrare l'omogeneizzato su carta da filtro Whatman 40 pretrattata con la miscela estraente.
- Lavare l'estratto con una soluzione acquosa di KCl allo 0.7% (4ml di soluzione ogni 20ml di solvente aggiunto). Questa soluzione salina permette la separazione in due fasi.
- Agitare e lasciare separare le fasi.
- Eliminare la fase superiore con una pipetta pasteur.
- Sciacquare l'interfaccia tre volte con la upper phase facendo attenzione alla fase inferiore (questo passaggio serve ad eliminare le impurità dall'interfaccia).
- Raccogliere la fase cloroformica (fase inferiore) in una beuta precedentemente tarata.
- Evaporare il solvente e pesare la beuta.

7.2.3 Metodo Folch modificato

Il metodo è una modificazione del metodo di Folch (Folch *et al.*, 1956) riportato da Christie (1978). Questa metodica è indicata per quelle indagini che prevedono lo studio della frazione totale dei lipidi, comprensiva cioè di quelli presenti nelle strutture di membrana, oltre ai lipidi di deposito. Nel contempo tale metodica può essere utilizzata per la determinazione quantitativa del grasso, quando non siano previste specifiche metodiche ufficiali.

Reagenti

Cloroformio.

Metanolo.

KCl (soluzione acquosa allo 0.88%).

Apparecchiature

Imbuto separatore.

Procedimento:

- Pesare 10g di carne in una beuta da 500ml con il collo largo.
- Aggiungere 100ml di metanolo, omogeneizzare per 1 minuto.
- Aggiungere 200ml di cloroformio ed omogeneizzare per altri 2 minuti.

- Filtrare su carta Whatman N°40 in un cilindro.
- Recuperare il residuo dal filtro e risospenderlo in 300ml di una soluzione cloroformio/metanolo (2:1 v/v).
- Omogeneizzare per altri 3 minuti e filtrare nuovamente.
- Lavare il residuo solido nel filtro con 200ml di cloroformio e successivamente con 100ml di metanolo.
- Aggiungere alle fasi organiche raccolte, una soluzione di KCl 0.88% pari a ¼ del volume filtrato (al fine di ottenere una migliore separazione delle fasi).
- Agitare la miscela e versarla nell'imbutto separatore.
- Agitare per 3 minuti e lasciar separare le fasi.
- Raccogliere nel cilindro da 1l la fase cloroformica e aggiungere a questa una soluzione di metanolo/acqua (1:1 v/v) pari a ¼ del volume del filtrato.
- Versare la miscela nell'imbutto separatore, agitare per 3 minuti.
- Dopo separazione delle fasi raccogliere la fase cloroformica in una beuta precedentemente tarata.
- Evaporare il solvente al rotavapor ad una temperatura di circa 30°C.
- Pesare la beuta per determinare la quantità dei lipidi estratti.

7.2.4 Metodo Hara Radin

Il metodo si propone come una valida alternativa al metodo di Folch per l'estrazione dei lipidi dai tessuti animali utilizzando solventi a bassa tossicità quali esano e isopropanolo.

L'utilizzo del cloroformio può infatti provocare l'insorgenza di tumori, mentre il metanolo può indurre danni al sistema visivo. L'esano, pur essendo una neurotossina, se utilizzato ad elevate concentrazioni, nel normale utilizzo in laboratorio è considerato relativamente non tossico (Hara and Radin, 1978).

Reagenti

n.esano.

Isopropanolo.

Solfato di sodio in soluzione acquosa (0.47 M).

Apparecchiature

Bilancia analitica.

Centrifuga refrigerata.

Omogeneizzatore ultraturrax.

Agitatore tipo vortex.

Stufa ventilata.

Procedimento:

- Pesare 10g di carne in una beuta da 500ml.
- Omogeneizzare per 3 minuti con una miscela di esano/isopropanolo (3:2 v/v).
- Filtrare in un becker (o in una beuta) da 500ml l'omogeneizzato su carta da filtro Whatman 40 (meglio gli imbuto buckner facendo il vuoto).
- Lavare per 3 volte con 40ml di esano/isopropanolo (3:2 v/v), risospesando il residuo ogni volta e lasciando il solvente per due minuti prima di applicare il vuoto (se si usano gli imbuto buckner).
- Rimuovere l'estratto non lipidico per miscelazione delle fasi organiche raccolte, per almeno 10 minuti, con 120 ml di una soluzione di solfato di sodio 0.47 M.
- Raccogliere la fase superiore (contenente i lipidi estratti) con una pipetta in vetro in una beuta da 500ml precedentemente tarata.
- Evaporare al rotavapor il solvente ad una temperatura di 37°C
- Pesare la beuta per determinare la quantità dei lipidi estratti.

7.3 Determinazione delle varie classi di composti presenti nell'estratto lipidico

7.3.1 Identificazione qualitativa delle diverse classi di composti che costituiscono gli estratti lipidici dei campioni di carne tramite cromatografia su strato sottile (TLC)

L'identificazione qualitativa delle classi lipidiche costituenti gli estratti ottenuti dai campioni di carne con i metodi precedentemente descritti è stata effettuata utilizzando la cromatografia su strato sottile (Nichols *et al.* 1963).

Reagenti

TLC lastre Sil G/UV₂₅₄ 20*20 250 µm.

Standard: C18:0, per gli acidi grassi liberi; 1,3 dilinoleina, per i digliceridi; trilinoleina, per i trigliceridi; sfingomieline per i fosfolipidi.

2, 7-diclorofluoresceina (100 mg disciolti in 100 ml di isopropanolo).

Fase mobile: n.esano/etere etilico/acido acetico (70:30:2, v/v/v).

Apparecchiature

Camera di sviluppo.

Lampada UV-VIS.

Preparazione delle soluzioni di lavoro

Preparazione delle soluzioni standard

Per ogni standard è stata preparata una soluzione contenente 20 mg di ciascun standard in 0.5 ml di CHCl₃. Per il riconoscimento degli acidi grassi liberi è stato utilizzato come standard rappresentativo della classe l'acido stearico (C18:0), per i digliceridi la 1,3-dilinoleina, per i trigliceridi la trilinoleina e per i fosfolipidi la sfingomieline.

Preparazione della soluzione contenente l'estratto lipidico da sviluppare

La soluzione in oggetto contiene 20 mg di lipide disciolti in 0,5 ml di CHCl₃.

Procedimento

Le lastre TLC utilizzate per la separazione (Sil G/UV₂₅₄ 20*20 250 µm) sono state precedentemente attivate in stufa a 100° C per 12 ore.

Nella camera di sviluppo, provvista di carta di saturazione, vengono aggiunti 102 ml di una miscela composta da n.esano/etere etilico/acido acetico (70:30:2, v/v/v). di fase mobile. La camera viene chiusa con il coperchio per 20 minuti per saturare l'ambiente di sviluppo.

Nella lastra TLC sono stati depositati con micro pipetta 20 μ l della soluzione contenente l'estratto lipidico nel lato destro, e 20 μ l di soluzione di ciascun standard nel lato sinistro (Figura 7.1).

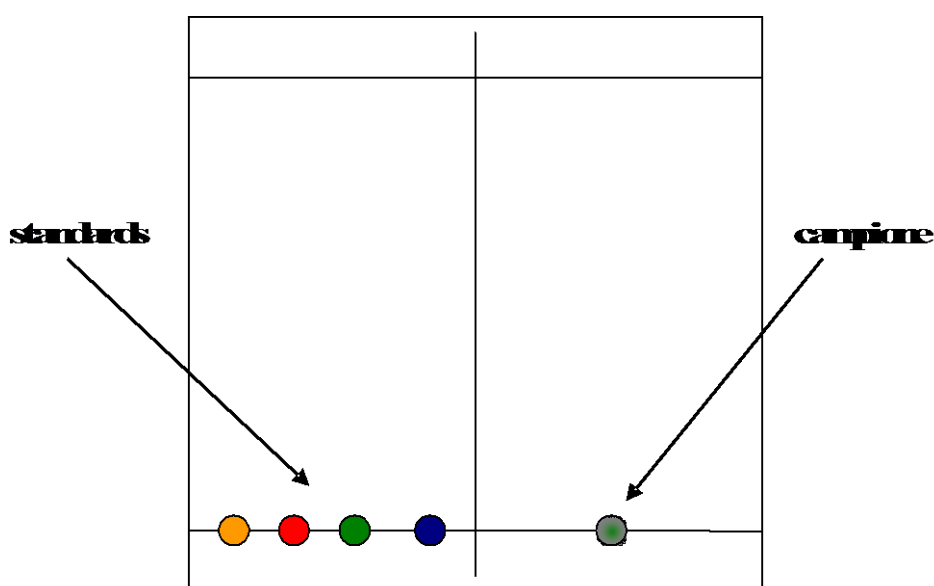


Figura 7.1 - Schema TLC

La lastra TLC, così preparata, è sviluppata per circa 40 minuti. Dopo aver rimosso la lastra dalla camera di sviluppo, si asciuga e si sviluppa spruzzandovi sopra con una soluzione di 2,7-diclorofluoresceina. La lastra è successivamente asciugata per 30 min sotto cappa e quindi osservata alla lampada UV a 254 nm.

Sotto la lampada UV le bande risultano visibili nell'ordine mostrato in Figura 7.2, l'attribuzione viene confermata tramite confronto degli RF con gli standard.

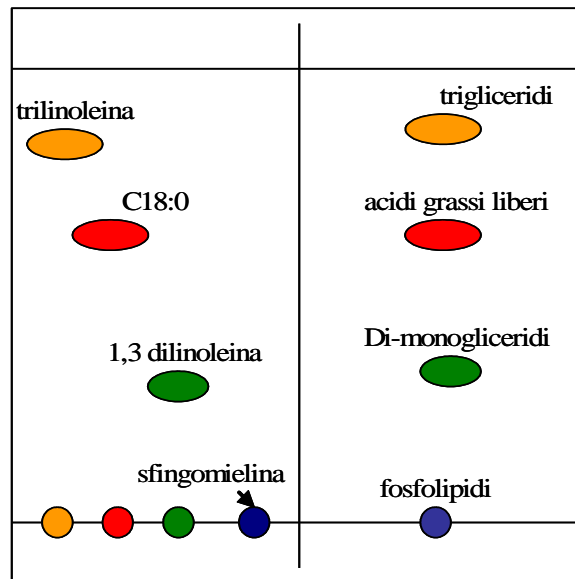


Figura 7.2 - Tipico TLC di un estratto lipidico (a sinistra) contro una miscela di standard (a destra).

7.4 Separazione quantitativa delle diverse classi di composti che costituiscono gli estratti lipidici dei campioni di carne mediante cromatografia su fase solida SPE

Il frazionamento nelle classi più rappresentative dei lipidi della carne è stato eseguito tramite estrazione in fase solida (SPE) modificando in parte la procedura descritta da Caboni *et al.*, (1996) e messa a punto nel laboratorio di chimica del DIRPA.

7.4.1 Separazione delle classi lipidiche in colonnine di silice da 1 g - metodo Caboni modificato

Reagenti

n.esano.

Cloroformio.

Metanolo.

Etere etilico.

Na₂SO₄ anidro.

Apparecchiature

Colonnine commerciali silice da 1g (Bond Elut SI, Varian).

Camera di eluizione sotto vuoto.

Pipette pasteur.

Tubi in vetro di raccolta (tubi Folch).

Rotavapor.

Procedimento

Una piccola quantità di Na₂SO₄ anidro viene depositato sulla colonnina in silice che viene successivamente attivata con 3 ml di esano. 50 mg di lipide disciolti in 0,5 ml di cloroformio vengono depositati sulla colonnina attivata. Dopo aver addizionato alla colonnina 20 ml di esano/etere etilico (15:1, v/v) si raccoglie l'eluato, contenente i trigliceridi in un tubo Folch tarato in precedenza. Successivamente viene eluita la frazione contenete i di e monogliceridi con 10 ml di una soluzione di esano/etere etilico (1:1, v/v) e raccolta in un altro tubo Folch tarato. Infine i

fosfolipidi vengono eluiti con 30 ml di metanolo e raccolti in un terzo tubo Folch. Le tre frazioni separate vengono successivamente evaporate al rotavapor a 37°C.

7.4.2 Separazione delle classi lipidiche in colonnine di amminopropile

- *metodo Pinkart et al. modificato*

Reagenti

n.esano.

Cloroformio.

Metanolo.

Etere etilico.

Sodio acetato 0.05M

Apparecchiature

Colonnine commerciali di amminopropile da 500 mg (Bond Elut SI, Varian).

Camera di eluizione sotto vuoto.

Pipette pasteur.

Tubi in vetro di raccolta (tubi Folch).

Rotavapor.

Procedimento

La colonnina viene attivata con 7.5 ml di esano. 20 mg di lipide disciolti in 0,15 ml di una miscela esano/cloroformio/metanolo (95:3:2 v/v/v) vengono depositati sulla colonnina attivata. Dopo aver addizionato alla colonnina 5 ml di cloroformio l'eluato contenente i lipidi neutri (NL) viene raccolto in un tubo Folch tarato. Gli acidi grassi liberi (FFA) vengono eluiti con 5ml di dietiletere/acido acetico (98:2 v/v) e raccolti in un altro tubo Folch. I lipidi polari (PL) sono eluiti in due differenti frazioni. La prima con 2.5ml di metanolo/cloroformio (6:1 v/v) e la seconda con 2.5ml di 0.05M sodioacetato in metanolo/cloroformio (6:1 v/v). Le due frazioni vengono miscelate ed analizzate insieme. Le tre frazioni separate vengono successivamente evaporate al rotavapor a 37°C.

7.5 Separazione e quantificazione degli AGT nelle classi lipidiche

La separazione, identificazione e quantificazione degli acidi grassi componenti le classi lipidiche (trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi) separate tramite SPE è stata effettuata tramite gascromatografia. L'analisi gascromatografica del profilo acidico prevede la conversione degli acidi grassi in esteri metilici (FAME). La reazione di transesterificazione in presenza di metanolo anidro può avvenire sia con catalisi basica che acida (Capitolo 6).

7.5.1 Ottimizzazione del metodo di transesterificazione delle classi lipidiche nella carne

7.5.1.1 Transesterificazione basica: metodo FIL-IDF 182 1999

La materia grassa estratta viene solubilizzata in normal esano (contenente gli standard interni) e trattata con una soluzione di KOH metanolica 2N in condizioni di vigorosa agitazione (con vortex) per 1 min a temperatura ambiente. Dopo un tempo prefissato di 5 minuti la reazione viene interrotta con l'aggiunta di $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e, dopo la separazione delle fasi, il surnatante, contenente gli esteri metilici degli acidi grassi, viene trasferito in un vial e quindi iniettato al gascromatografo.

Reagenti

n.esano.

Metanolo anidro.

KOH metanolica 2N.

$\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Soluzione degli standard interni.

Apparecchiature

Bilancia analitica.

Bagno maria.

Vortex.

Centrifuga.

Provette in vetro con tappo a vite in teflon.

Vials.

Pipette tarate a doppia tacca da 1 e da 5 ml.

Gascromatografo.

Preparazione delle soluzioni di lavoro

Soluzione degli standard interni

Si prepara una soluzione in esano contenente 1 mg/ml di ciascun standard interno. In particolare sono stati utilizzati i seguenti standard interni: MeC5:0, MeC9:0, MeC13:0, MeC19:0.

Reagente metilante

In un pallone da 100 ml pesare 11,2 g di KOH e portare a volume con MeOH.

Procedimento

Si pesano 50 mg di lipide estratto (annotare il peso) in una provetta in vetro pirex con tappo nero in teflon. Si aggiungono 5 ml di soluzione esanica contenente gli standard interni agitando fino a completa dissoluzione del lipide. Si aggiungono 0.2 ml di reagente metilante e si agita al vortex per 1 minuto circa a temperatura ambiente. Dopo aver lasciato riposare la soluzione di reazione per circa 5 minuti si aggiungono circa 0.5 g di $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e si centrifuga per 3 minuti a temperatura ambiente a 900 rpm. La fase esanica (surnatante) contenente i metilesteri (FAME) è trasferita in un vial e iniettata al gascromatografo (1 μl).

7.5.1.2 Transmetilazione acida: (Chin et al. 1992)

Reagenti

n.esano.

Metanolo anidro.

Cloruro di acetile.

Na_2SO_4 anidro.

Soluzione di acqua saturata in esano.

Soluzione degli standard interni.

Apparecchiature

Bilancia analitica.

Bagno maria.

Centrifuga.

Provette in vetro con tappo a vite in teflon.

Vials.

Pipette tarate a doppia tacca da 10 ml.

Gascromatografo.

Preparazione delle soluzioni di lavoro

Reagente metilante

80 ml di cloruro di acetile vengono aggiunti lentamente in una beuta da 2L contenente 800 ml di metanolo anidro. Poiché la reazione è esotermica la soluzione deve essere preparata raffreddando la beuta in bagno di ghiaccio.

Soluzione degli standard interni:

Si pesano 250 mg di ciascuno standard interno (MeC5:0, MeC9:0, MeC13:0 e MeC19:0) in 250 ml di reagente metilante (1 mg/ml).

Procedimento

Si aggiungono 5 ml di reagente metilante contenente gli standard interni alla frazione lipidica precedentemente separata. La reazione di transmetilazione avviene a 60°C per 1 ora agitando i tubi di reazione ad intervalli di 5 min. Dopo raffreddamento si aggiungono 2 ml di acqua saturata in esano e 5 ml di esano, si agita per 1 min e si recupera la fase esanica. Quest'ultima è lavata per 2 volte con 5 ml di acqua saturata in esano. Le fasi organiche recuperate vengono anidificate con 0,5 g di solfato di sodio anidro per 1 ora.

La fase esanica (surnatante) è trasferita in un vial e iniettata al gascromatografo (1 µl).

7.5.2 Separazione e quantificazione dei FAME

La separazione dei FAME ottenuti sia tramite catalisi basica (7.5.1.1) che acida (7.5.1.2) viene effettuata usando un GC VARIAN 3900 su una colonna SP 2560 (100 m, 0.25 mm id, 0.2 µm di fase fissa non bonded biscyanopropylpolisiloxane, SUPELCO).

E' stato usato He come gas di trasporto ad un flusso costante di 1ml/min.

La separazione avviene con la seguente programmata di temperatura: 45°C per 4 min, da 45°C a 175°C a 13°C /min, a 175°C per 27 min, da 175°C a 215°C a 4°C /min, a 215°C per 35 min.

Durata totale della corsa cromatografica: 86 min.

La temperatura dell'iniettore e del FID è per entrambi di 290°C.

L'iniezione avviene in modalità Split con rapporto di splittaggio 1:50.

Gli acidi grassi sono stati identificati per confronto dei tempi di ritenzione con quelli degli standard di riferimento e quantificati rispetto agli standard interni (MeC5:0 per MeC4:0-MeC6:0; MeC9:0 per MeC8:0-MeC10:0; MeC13:0 per MeC11:0-MeC17:0; MeC19:0 per MeC18:0-MeC22:6), utilizzando il software Star 6.0 Chromatography Workstation, Varian.

Il calcolo e l'espressione dei risultati sono stati effettuati in base alla seguente formula:

$$C_i = \frac{A_i * C_{is}}{A_{is} * P * F_{is}}$$

C_i = concentrazione dell'acido grasso incognito;

A_i = area dell'acido grasso incognito;

C_{is} = concentrazione dello standard interno;

P = peso dell'aliquota di lipide in g;

F_{is} = fattore di correzione.

Gli acidi grassi sono espressi come mg/g di lipide.

La quantificazione è fatta tenendo conto di una curva di calibrazione con standard interno a quattro punti.

7.5.2.1 Curva di calibrazione

Preparazione della soluzione madre di standard:

In un pallone da 25 ml si pesa una certa aliquota degli STD, esclusi gli STD interni, e si porta a volume con esano.

Gli STD utilizzati e la quantità pesata per ciascuno sono:

MeC4:0 (200mg), MeC6:0 (200mg), MeC7:0 (200mg), MeC8:0 (200mg), MeC10:0 (200mg), MeC11:0 (50mg), MeC12:0 (200mg), MeC14:0 (200mg), MeC4:1 9cis (50mg), MeC15:0 (200mg), MeC16:0 (200mg), MeC16:1 9cis (50mg), MeC17:0 (200mg), MeC18:0 (200mg), MeC18:1 9trans (200mg), MeC18:1 11trans (200mg), MeC18:1 9cis (200mg), MeC18:2 9cis 2cis (200mg), MeC18:2 9trans 12trans (50mg), MeC18:3 9cis 12cis 15cis (100mg), MeC18:3 6cis 9cis 12cis (50mg), MeC20:0 (100mg), MeC20:2 11cis 14cis (50mg), MeC20:4 5cis 8cis 11cis 14cis (50mg), MeC20:5 5cis 8cis 11cis 14cis 17cis (25mg), MeC22:5 7cis 10cis 13cis 16cis 19cis (25mg), MeC22:6 4cis 7cis 10cis 13cis 16cis 19cis (25mg), MeC21:0 (50mg), MeC22:0 (100mg), MeC18:2 9cis 11trans (25mg), MeC18:2 9trans 11trans (25mg), MeC18:2 9cis 11cis (25mg), MeC18:2 10trans 12cis (25mg).

Preparazione della soluzione contenente gli standard interni

Viene preparata una soluzione in esano contenente 2 mg/ml di ciascun STD interno. In particolare sono stati utilizzati i seguenti standard interni: MeC5:0, MeC9:0, MeC13:0, MeC19:0.

Preparazione delle 4 diluizioni con cui si costruisce la curva di calibrazione

Diluizione 4

Si prelevano 5 ml della soluzione madre e li si porta a volume in un pallone da 10 ml con la soluzione degli standard interni.

Diluizione 3

In un pallone da 20 ml si introducono 10 ml della soluzione madre, e li si porta a 20 ml con esano (Soluzione A). Dalla soluzione A si prelevano 5 ml e li si porta a volume in un pallone da 10 ml con la soluzione degli STD interni.

Diluizione 2

In un pallone da 20ml si introducono 10 ml della soluzione A e li si porta a volume 20 ml con esano (Soluzione B). Dalla soluzione B si prelevano 5 ml e li si porta a volume in un pallone da 10 ml con la soluzione degli STD interni.

Diluizione 1

In un pallone da 50 ml si introducono 10 ml della soluzione B e li si porta a volume con esano (Soluzione C). Dalla soluzione C vengono presi 5 ml e si portano a volume in un pallone da 10 ml con la soluzione degli STD interni.

Ciascuna delle quattro diluizioni è introdotta in triplo nel gascromatografo. In tal modo si costruisce così per ogni acido grasso una curva di calibrazione a quattro punti (Tabella 7.1). La quantificazione di ciascun acido grasso nel campione incognito viene quindi effettuata mediante la curva di calibrazione (es. Figura 7.3) e facendo uso della formula descritta nel paragrafo 7.5.2.

Nelle Figure 7.4 – 7.10 è mostrato inoltre un esempio di gascromatogramma.

Tabella 7.1 - Concentrazione degli standard nelle quattro diluizioni e fattore di correzione

Standard	Std interno	g/25ml Sostanza madre	mg/5ml Dil I	mg/5ml Dil II	mg/5ml Dil III	mg/5ml Dil IV	fattore correzione
MeC4:0	MeC5:0	0,205	1,025	5,125	10,25	20,500	0,923
MeC6:0	MeC5:0	0,2064	1,032	5,16	10,32	20,640	1,096
MeC7:0	MeC5:0	0,2136	1,068	5,34	10,68	21,360	1,065
MeC8:0	MeC9:0	0,2013	1,0065	5,0325	10,065	20,130	0,990
MeC10:0	MeC9:0	0,1898	0,949	4,745	9,49	18,980	1,025
MeC11:0	MeC9:0	0,0579	0,2895	1,4475	2,895	5,790	1,021
MeC12:0	MeC13:0	0,203	1,015	5,075	10,15	20,300	1,002
MeC14:0	MeC13:0	0,2063	1,0315	5,1575	10,315	20,630	1,024
MeC14:1 9c	MeC13:0	0,057	0,285	1,425	2,85	5,700	1,084
MeC15:0	MeC13:0	0,2002	1,001	5,005	10,01	20,020	1,109
MeC16:0	MeC13:0	0,2047	1,0235	5,1175	10,235	20,470	1,081
MeC16:1 9c	MeC13:0	0,0505	0,2525	1,2625	2,525	5,050	1,049
MeC17:0	MeC19:0	0,2041	1,0205	5,1025	10,205	20,410	1,091
MeC18:0	MeC19:0	0,2002	1,001	5,005	10,01	20,020	1,023
MeC18:1 9t	MeC19:0	0,2032	1,016	5,08	10,16	20,320	1,039
MeC18:1 10t	MeC19:0	1	1	1	1	1,000	1
MeC18:1 11t	MeC19:0	0,2016	1,008	5,04	10,08	20,160	0,894
MeC18:1 9c	MeC19:0	0,2056	1,028	5,14	10,28	20,560	1,023
MeC18:2 9t, 12t	MeC19:0	0,0077	0,0385	0,1925	0,385	0,770	1,005
MeC18:2 9c, 12c	MeC19:0	0,2036	1,018	5,09	10,18	20,360	0,932
MeC20:0	MeC19:0	0,1005	0,5025	2,5125	5,025	10,050	1,073
MeC18:3 9c, 12c, 15c	MeC19:0	0,1037	0,5185	2,5925	5,185	10,370	0,902
MeCLA 9c, 11t	MeC19:0	0,025	0,125	0,625	1,25	2,500	0,866
MeC21:0	MeC19:0	0,0508	0,254	1,27	2,54	5,080	1,230
MeCLA 10t, 12c	MeC19:0	0,025	0,125	0,625	1,25	2,500	0,722
MeCLA 11t, 13c	MeC19:0	1	1	1	1	1,000	1
MeCLA 9c, 11c	MeC19:0	0,025	0,125	0,625	1,25	2,500	1,015
MeCLA 9t, 11t	MeC19:0	0,025	0,125	0,625	1,25	2,500	1,015
MeC20:2 11c, 14c	MeC19:0	0,0016	0,008	0,04	0,08	0,160	0,965
MeC22:0	MeC19:0	0,1008	0,504	2,52	5,04	10,080	1,115
MeC20:4 5c, 8c, 11c 14c	MeC19:0	0,001	0,005	0,025	0,05	0,100	1,030
MeC23:0	MeC19:0	0,0501	0,2505	1,2525	2,505	5,010	1,196
MeC24:0	MeC19:0	0,0525	0,2625	1,3125	2,625	5,250	1,245
MeC20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c	MeC19:0	0,025	0,125	0,625	1,25	2,500	0,834
MeC26:0	MeC19:0	0,0307	0,1535	0,7675	1,535	3,070	1,209
MeC22:5 7c, 10c, 13c, 16c, 19c	MeC19:0	0,025	0,125	0,625	1,25	2,500	0,965
MeC22:6 4c, 7c, 10,c 13c, 16c, 19c	MeC19:0	0,0258	0,129	0,645	1,29	2,580	0,969

Print Date: 21 Jul 2008 12:26:33
 Calibration Curves Report - Page 1
 File: c:\star\metodi\kramer_basica_adele.mth
 Detector: 39XL GC, Address: 44, Channel ID: Front

C4:0
 Internal Standard Analysis
 Resp. Fact. RSD: 3.721%
 Curve Type: Linear
 Origin: Force
 Coeff. Det. (r^2): 0.998587
 $y = +9.2303e-001x$

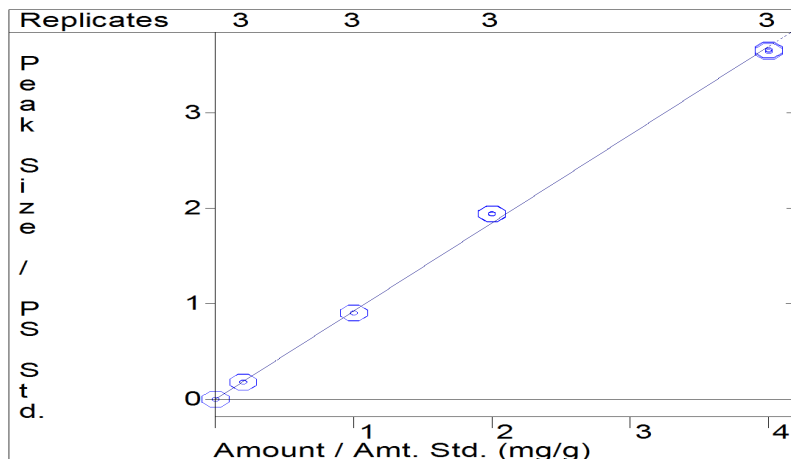


Figura 7.3 - Esempio di curva di calibrazione a quattro punti.

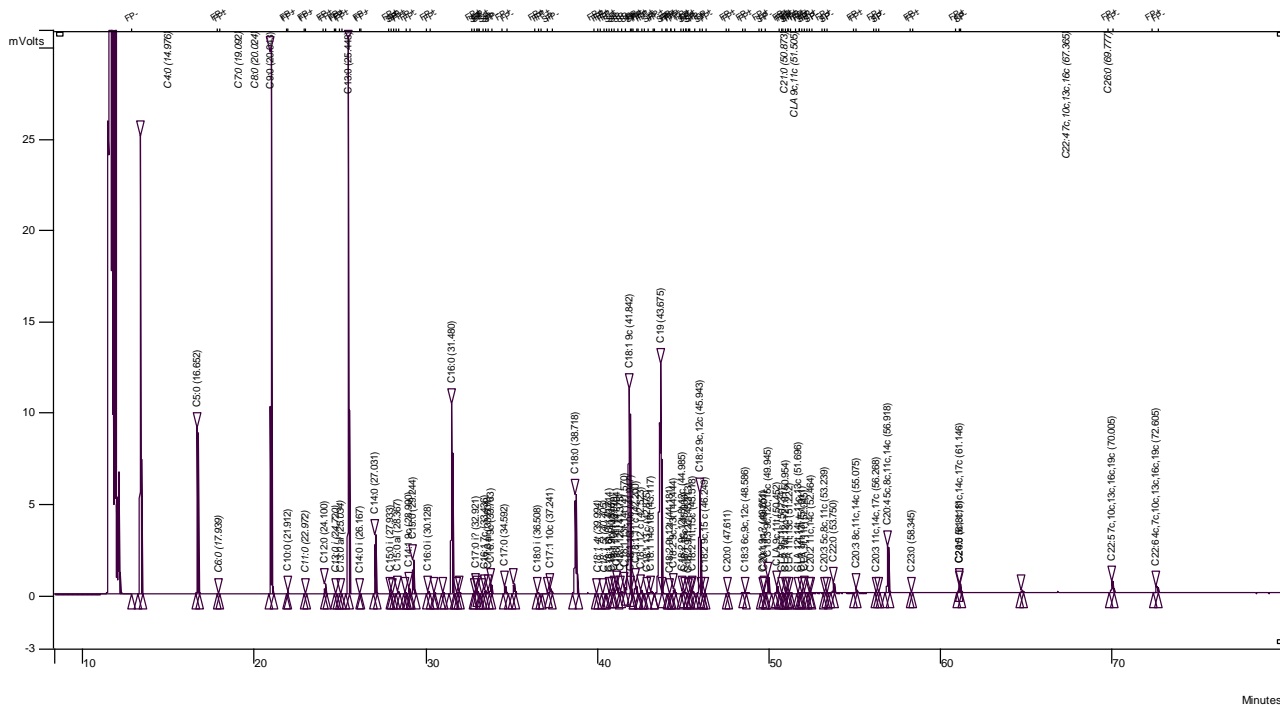


Figura 7.4 - Gas chromatogramma separazione degli esteri metilici determinati in un campione di carne.

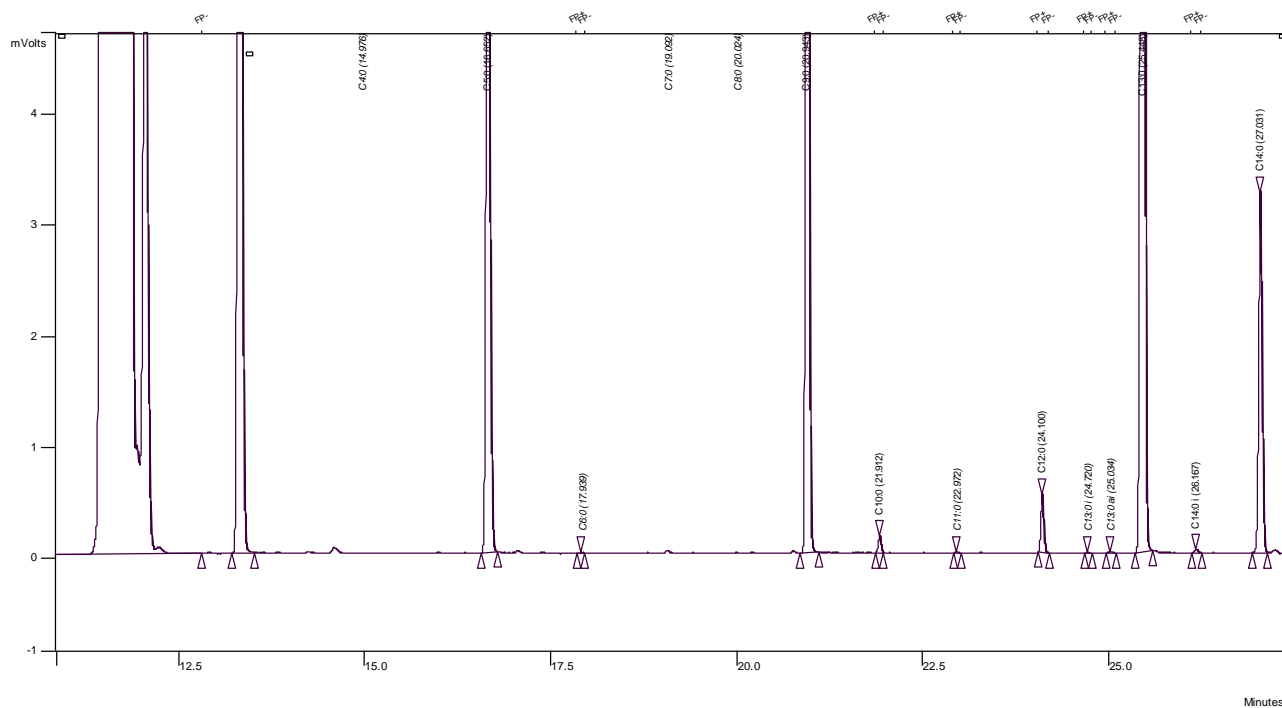


Figura 7.5 - Gascromatogramma espanso relativo alla separazione degli esteri metilici determinati in un campione di carne.

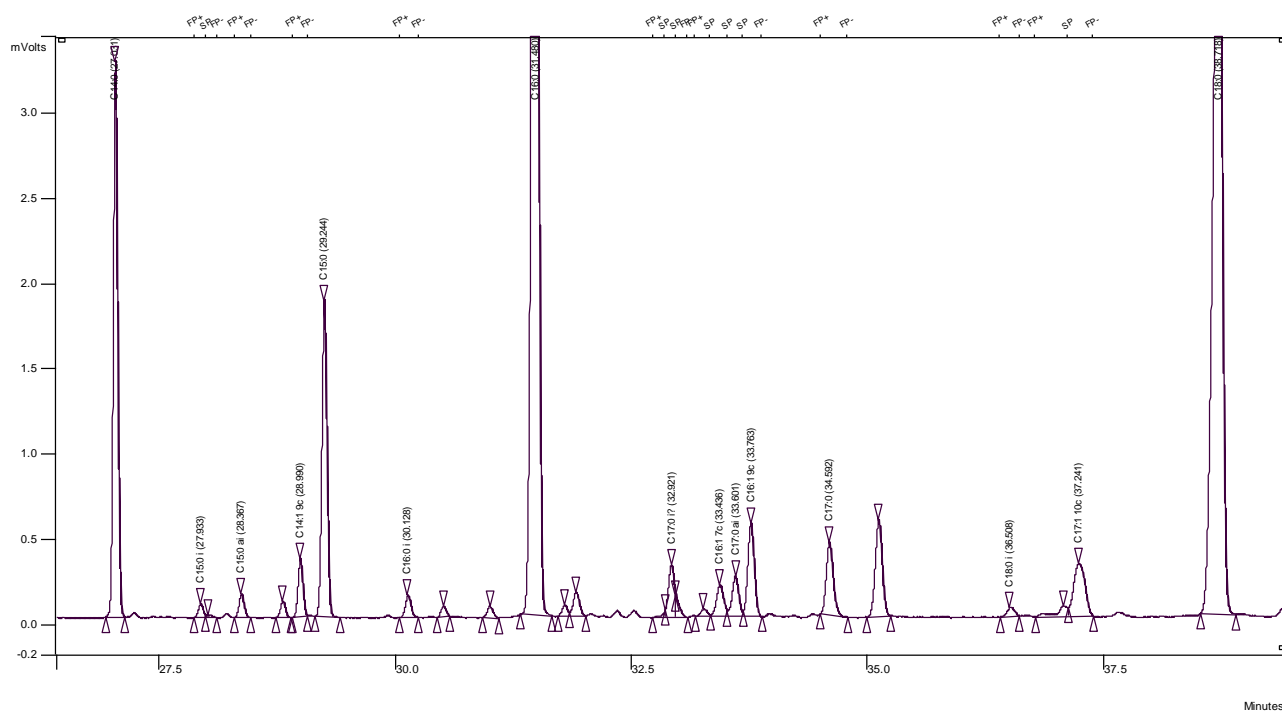


Figura 7.6 - Gascromatogramma espanso relativo alla separazione degli esteri metilici determinati in un campione di carne.

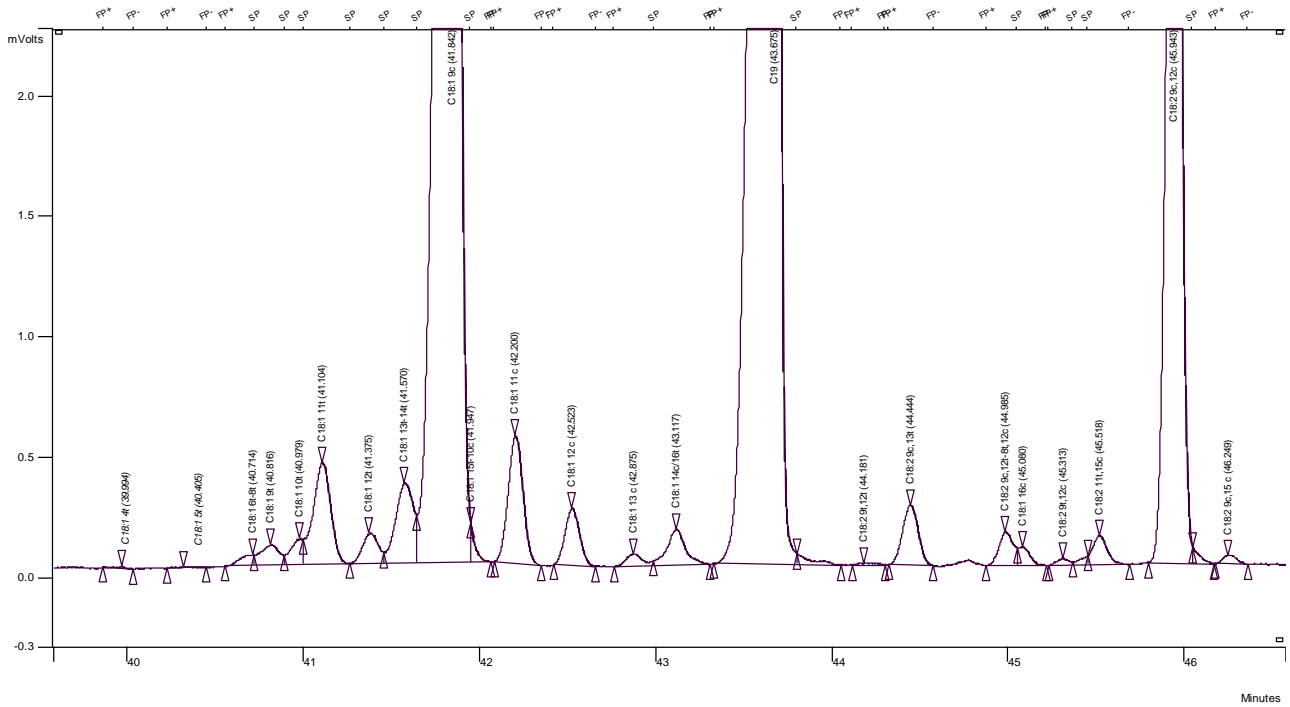


Figura 7.7 - Gascromatogramma espanso relativo alla separazione degli esteri metilici determinati in un campione di carne.

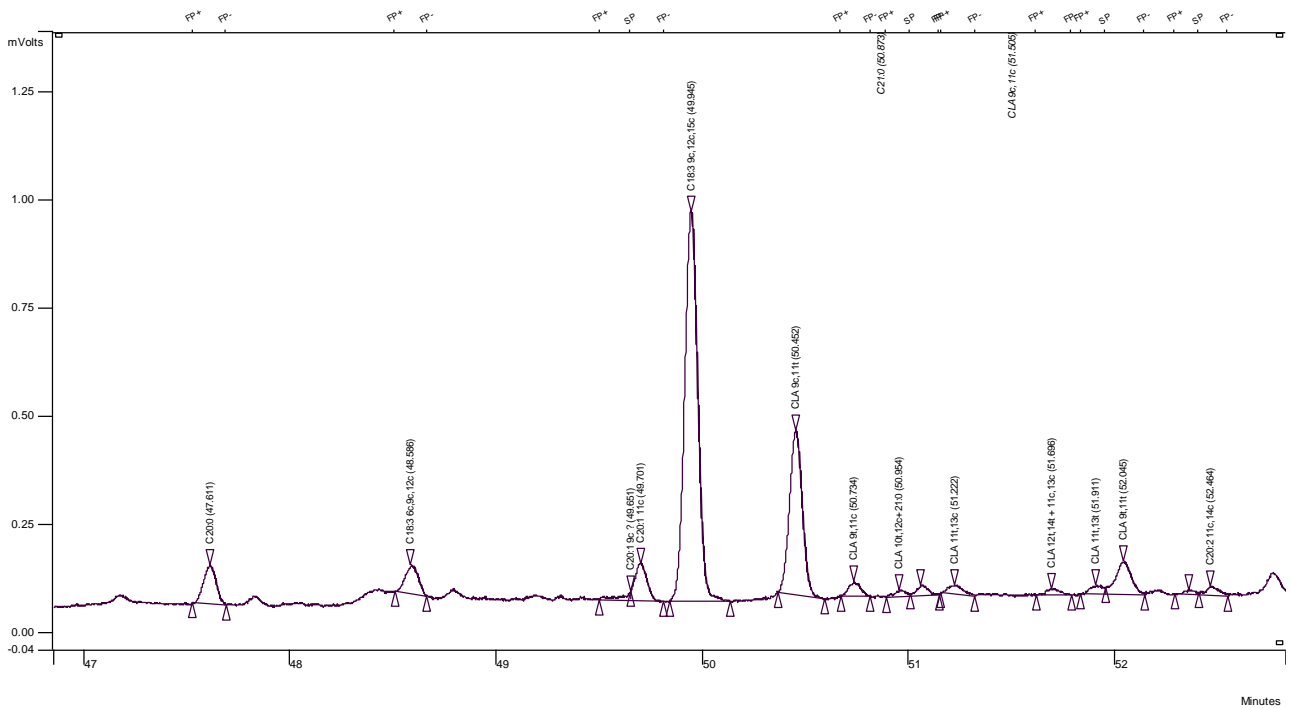


Figura 7.8 - Gascromatogramma espanso relativo alla separazione degli esteri metilici determinati in un campione di carne.

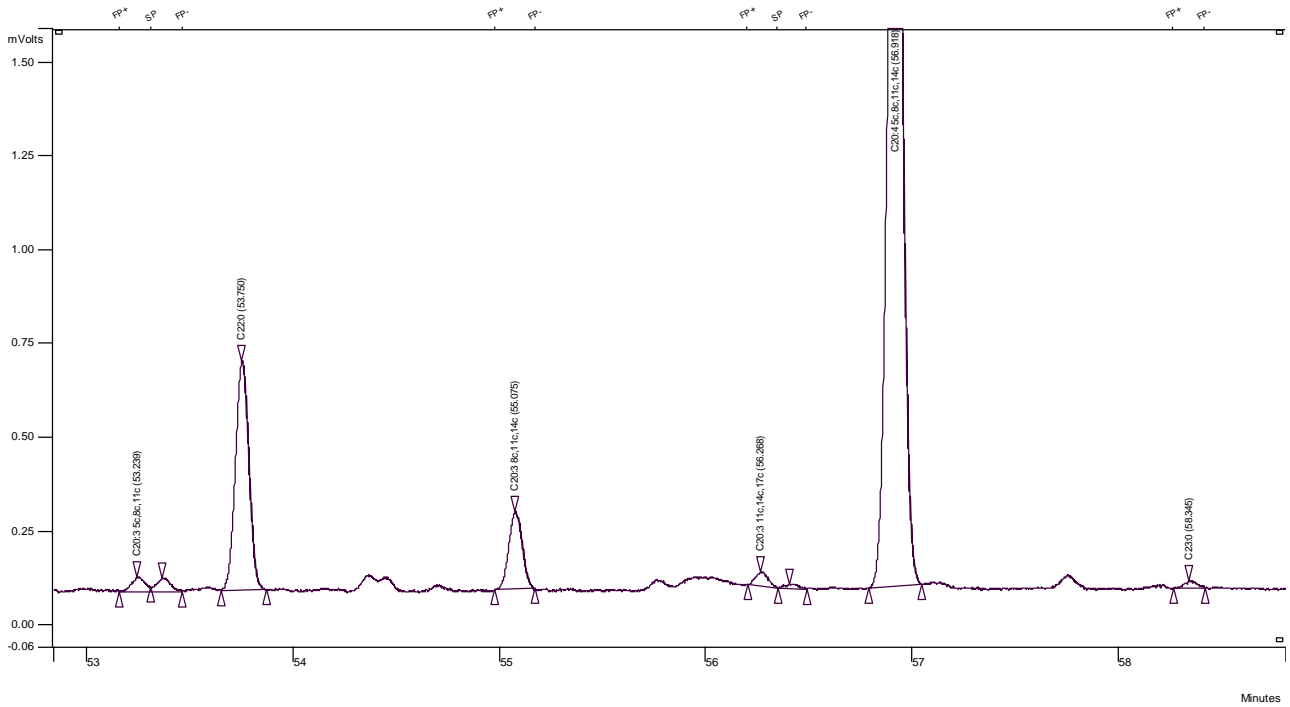


Figura 7.9 - Gascromatogramma espanso relativo alla separazione degli esteri metilici determinati in un campione di carne.

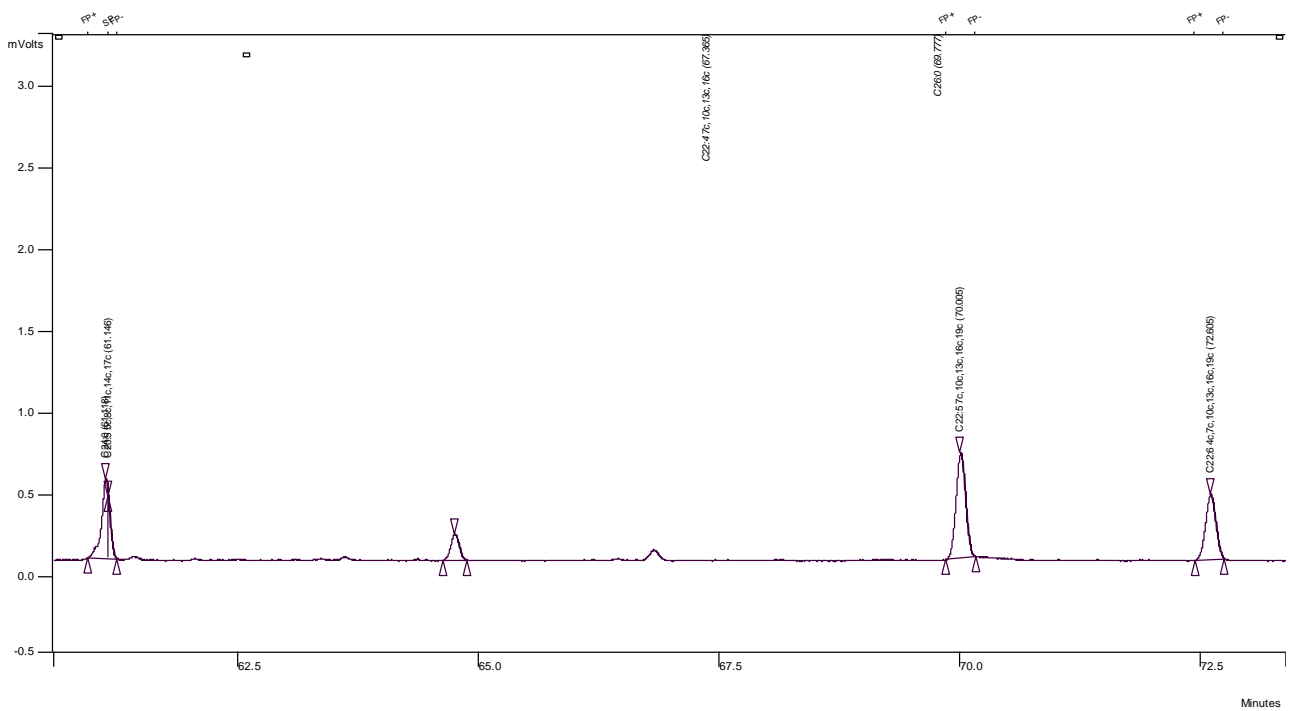


Figura 7.10 - Gascromatogramma espanso relativo alla separazione degli esteri metilici determinati in un campione di carne.

7.5.3 Separazione e quantificazione degli AGT nei trigliceridi

La transesterificazione dei trigliceridi è stata effettuata in ambiente acido come descritto nel paragrafo 7.5.1.2, la separazione e quantificazione è avvenuta nelle condizioni riportate nel paragrafo 7.5.2.

7.5.4 Separazione e quantificazione degli AGT nei mono e digliceridi

7.5.4.1 *Transesterificazione acida: (Chin et al. 1992)*

Reagenti

n.esano.

Metanolo anidro.

Cloruro di acetile

Na₂SO₄ anidro.

Soluzione di acqua saturata in esano.

Soluzione degli standard interni.

Apparecchiature

Bilancia analitica.

Bagno maria.

Centrifuga.

Provette in vetro con tappo a vite in teflon.

Vials.

Pipette tarate a doppia tacca da 10 ml.

Gasromatografo.

Preparazione delle soluzioni di lavoro

Reagente metilante

80 ml di cloruro di acetile vengono aggiunti lentamente in una beuta da 2L contenente 800 ml di metanolo anidro. Poiché la reazione è esotermica la soluzione deve essere preparata raffreddando la beuta in bagno di ghiaccio.

Soluzione degli standard interni:

Si pesano 25 mg di ciascuno standard interno (MeC5:0, MeC9:0, MeC13:0 e MeC19:0) in 250 ml di reagente metilante (0.1 mg/ml).

Procedimento

Alla frazione dei mono e digliceridi precedentemente separata si aggiungono 10 ml di reagente metilante contenente gli standard interni. La reazione di transesterificazione avviene a 60°C per 1 ora agitando i tubi di reazione ad intervalli di 5 min. Dopo raffreddamento si aggiungono 2 ml di acqua saturata in esano e 5 ml di esano, si agita per 1 min e si recupera la fase esanica. Quest'ultima è lavata per 2 volte con 5 ml di acqua saturata in esano. Le fasi organiche recuperate vengono anidrificate con 0,5 g di solfato di sodio anidro per 1 ora.

La fase esanica (surnatante) è trasferita in un vial e iniettata al gascromatografo (1 µl).

7.5.4.2 Separazione e quantificazione dei FAME

La separazione dei FAME è stata effettuata nelle stesse condizioni riportate nel paragrafo 7.5.2, eccetto che per il rapporto di splittaggio, che è stato ridotto a 1:20.

7.5.5 Separazione e quantificazione degli AGT nei fosfolipidi

7.5.5.1 Transesterificazione acida: (Chin et al. 1992)

La transesterificazione dei fosfolipidi è stata effettuata in ambiente acido come descritto nel paragrafo 7.5.1.2, la separazione e quantificazione è avvenuta nelle condizioni riportate nel paragrafo 7.5.2.

7.6 Separazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi

L'identificazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi componenti l'estratto lipidico separato tramite SPE è stata effettuata per cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC/ELSD).

7.6.1 Preparazione del campione

La frazione (separata tramite SPE) contenente i fosfolipidi viene portata a secco e il residuo (20 mg circa) viene ripreso con 2 ml di una soluzione di cloroformio/metanolo(2:1 v/v).

7.6.2 Identificazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi

L'identificazione e la quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi viene effettuata tramite un HPLC Agilent serie 1100 usando una colonna silica normal-phase Zorbax Rx-SIL (250 mm x 4.6mm I.D. , 5µm, Agilent-Tecnologies) e operando ad una temperatura di 23°C.

L'eluizione viene eseguita in gradiente di (A) cloroformio/metanolo/idrossido d'ammonio 30% (80:19.5:0.5 v/v/v) e (B) cloroformio/metanolo/idrossido d'ammonio 30%/acqua (60:34:0.5:5.5 v/v/v/v), con una velocità di flusso di 1 ml/min.. Il volume di iniezione è di 10µl, la durata totale della corsa è di 45 minuti più 5min. di riequilibrio per tornare alle condizioni iniziali.

La miglior separazione è stata ottenuta con il gradiente riportato in Tabella 7.2.

Tabella 7.2 - Gradiente di eluizione.

Tempo (min.)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	100	0
20	15	85
25	10	90
26	0	100
33	0	100
45	100	0

Il rilevatore è un SEDEX modello 75 ELSD (S.E.D.E.R.E., Alfortville Cedex France) la pressione del nebulizzatore è di 3.4 bar e la temperatura del tubo di 50°C.

I picchi sono stati identificati per confronto con i tempi di ritenzione dei relativi standards.

La concentrazione delle differenti classi di fosfolipidi è espressa in ppm.

La quantificazione è stata fatta tenendo conto di una curva di calibrazione con standard esterno a quattro punti.

7.6.3 Curva di calibrazione

Preparazione della soluzione standard delle diverse classi di fosfolipidi per la determinazione dei tempi di ritenzione (Avalli, Contarini,2005)

Si preparano le soluzioni standard mix rispettivamente da una soluzione madre contenente 8 mg/ml (8000 ppm) di L- α fosfatidilcolina (PC), 4mg/ml (4000ppm) di 3-sn fosfatidiletanolamina (PE); 1mg/ml (1000 ppm) di sn fosfatidilserina (PS); 1.4mg/ml (1400 ppm) di L- α fosfatidilinositolo (PI) e 1.6mg/ml (1600 ppm) di sfingomielina (SPH).

Preparazione delle diluizioni con cui si costruisce la curva di calibrazione

Soluzione madre (diluizione 1)

In un matraccio da 5ml si pesano: 35mg di L- α fosfatidilinositolo ((PI), 25mg di sn fosfatidilserina, (PS) e 40mg di sfingomielina (SPH) e si portano a volume con una soluzione di cloroformio/metanolo 2:1 (v/v).

In un secondo matraccio da 5 ml si pesano 40 mg di L- α fosfatidilcolina(PC), e 20 mg 3-sn fosfatidiletanolamina (PE), si aggiunge 1ml della soluzione preparata precedentemente e si porta il tutto a volume con cloroformio/metanolo 2:1v/v (dil.1).

Diluizione 2

Si prelevano 3ml di soluzione madre (diluizione 1) e si portano a 4ml con una soluzione di cloroformio/metanolo 2:1 (v/v).

Diluizione 3

Si preleva 1ml di soluzione madre (diluizione 1) e si portano a 2ml con una soluzione di cloroformio/metanolo 2:1 (v/v)

Diluizione 4

Si preleva 1ml di soluzione (diluizione 3) e si portano a 2ml con una soluzione di cloroformio/metanolo 2:1 (v/v).

Ciascuna delle quattro diluizioni è iniettata in triplo nell'HPLC. In tal modo si costruisce per ogni classe di fosfolipidi una curva di calibrazione a quattro punti (Tabella 7.3). La quantificazione di ciascuna classe nel campione incognito viene quindi effettuata mediante la curva di calibrazione (es. Figura 7.11). Nella Figura 7.12 viene mostrato un cromatogramma di un campione di carne.

Tabella 7.3 - Concentrazione degli standard nelle quattro diluizioni.

Standard	Diluizione 1 ppm	Diluizione 2 ppm	Diluizione 3 ppm	Diluizione 4 ppm
L- α fosfatidilinositolo (PI)	1424	1068	712	356
sn fosfatidilserina, (PS)	1032	774	516	258
sfingomieline (SPH)	1632	1224	816	408
L- α fosfatidilcolina(PC)	8200	6150	4100	2050
3-sn fosfatidiletanolamina (PE)	4760	3570	2380	1190

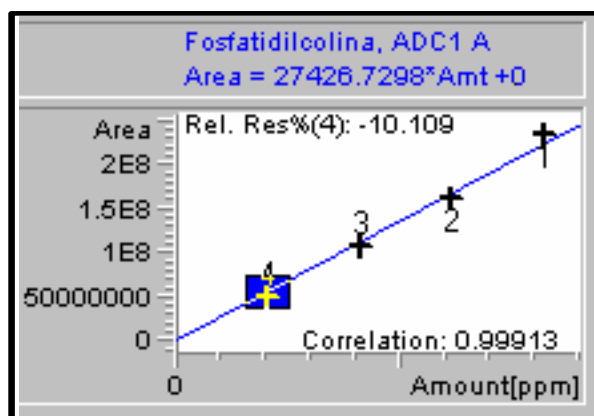


Figura 7.11 - Esempio di curva di calibrazione a quattro punti.

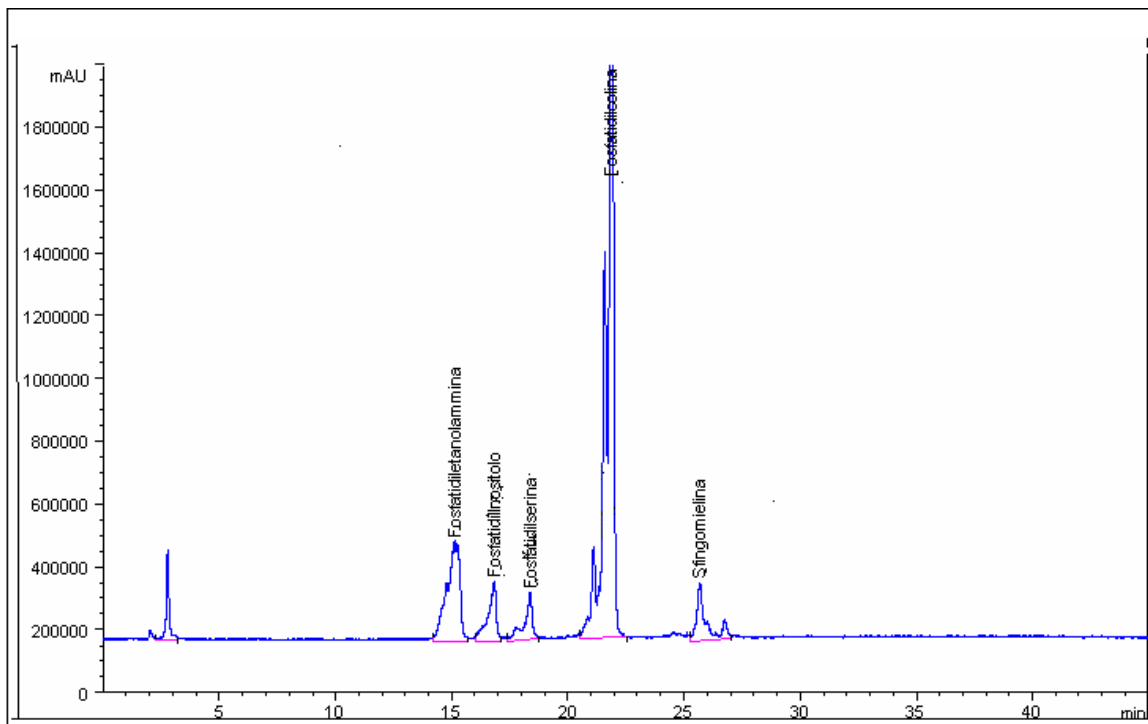


Figura 7.12 - Cromatogramma di PC, PI, PE, PS e SPH nella diluizione 2.

7.7 Analisi statistica

Il trattamento statistico dei dati è stato fatto utilizzando la procedura GLM (General Linear Model) ($\alpha=0.05$) di Minitab statistical package release 12 (Minitab Inc., USA). Nel modello d'analisi è stato considerato come fattore di variabilità il “metodo di estrazione”. Il confronto fra le medie è stato fatto utilizzando il test di Tukey.

7.8 Risultati e discussione

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di confrontare sulla carne d'agnello, l'applicabilità delle principali metodologie di estrazione della materia grassa: il metodo di riferimento e diversi metodi alternativi "a freddo" (Capitolo 6). Il confronto tra i metodi è stato effettuato in riferimento alla capacità quantitativa di estrazione, alla quantità ed alla composizione acidica delle varie classi lipidiche estratte nonché alla identificazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi nella frazione fosfolipidica estratta.

7.8.1 Valutazione della quantità totale di lipidi nella carne di agnello in funzione del metodo di estrazione

La caratterizzazione della frazione lipidica della carne comporta diversi passaggi chiave: l'estrazione della materia grassa totale, la separazione e quantificazione delle varie classi lipidiche, la loro derivatizzazione, l'identificazione e la quantificazione degli acidi grassi che le compongono.

Dall'esito del passaggio iniziale di estrazione dipenderà quindi la qualità dei risultati ottenuti in tutte le fasi successive. Il metodo analitico utilizzato deve quindi essere in grado di estrarre quantitativamente la frazione lipidica senza alterarne la composizione.

Il metodo analitico di estrazione dovrebbe inoltre possedere i seguenti requisiti:

- capacità di inibire l'azione di enzimi come lipasi e fosfolipasi, in modo da evitare fenomeni di degradazione lipolitica della materia grassa durante l'analisi;
- capacità di limitare il più possibile i fenomeni autossidativi e di isomerizzazione dei doppi legami durante l'estrazione (indotti generalmente dall'impiego di elevate temperature e da solventi non idonei);
- capacità di estrarre in modo aspecifico tutti i costituenti della frazione lipidica;
- capacità di separare i lipidi dai componenti a ridotta polarità (interferenti apolari) che potrebbero introdurre errori nelle successive determinazioni.

Esistono due differenti tipologie di metodi utilizzati per l'estrazione della materia grassa nella carne: il metodo di riferimento ed i metodi alternativi. Il metodo di riferimento è normalmente utilizzato per determinare in modo quantitativo il tenore in materia grassa, mentre i metodi alternativi vengono generalmente utilizzati per estrarre la materia grassa qualora questa debba essere successivamente frazionata e caratterizzata.

Il metodo di riferimento AOAC, 1990 si basa su un'estrazione in continuo con solvente (etere di petrolio). Il calore sviluppato durante la fase di evaporazione del solvente può tuttavia indurre

fenomeni di idrolisi ed ossidazione di alcune classi lipidiche, in particolare dei fosfolipidi e degli acidi grassi coniugati, alterando quindi la composizione della materia grassa estratta.

I metodi alternativi, alcuni di questi detti “a freddo” in quanto non prevedono nè l’utilizzo di elevate temperature nè di sostanze capaci di indurre reazioni esotermiche, sono normalmente utilizzati per estrarre la materia grassa quando questa debba essere successivamente frazionata e caratterizzata.

I lipidi semplici, spesso concentrati nei tessuti di deposito, sono estraibili abbastanza facilmente, mentre è più difficoltosa l'estrazione dei lipidi complessi, che sono componenti delle membrane cellulari e formano legami più o meno stabili con le proteine ed altri costituenti muscolari.

Per effettuare una estrazione complessiva si ricorre all'impiego di numerosi solventi, singolarmente o in miscela tra loro i quali, oltre a sciogliere i lipidi, devono essere in grado di scomporre i legami tra questi e la matrice tessutale. Tra i solventi più utilizzati troviamo la miscela esano/isopropanolo (3:2, v/v) utilizzata nel metodo descritto da Hara-Radin (1978) e la miscela cloroformio/metanolo (2:1, v/v) utilizzata nei metodi descritti da Folch *et al*, (1957) e Christie (1989). Nella miscela, il solvente più apolare funge da mezzo di estrazione mentre l'alcol provoca la dissociazione delle interazioni lipidi-proteine nella matrice alimentare.

Molto diffuso è l'impiego della miscela cloroformio/metanolo la quale, formando un sistema ternario con l'acqua presente nei tessuti, permette l'estrazione dei lipidi.

La miscela esano/isopropanolo presenta una tossicità alquanto ridotta rispetto alla miscela cloroformio/metanolo, ma non è stata testata su una vasta gamma di tessuti, inoltre non estrae quantitativamente i gangliosidi.

Normalmente il tessuto da sottoporre ad estrazione viene omogeneizzato in presenza di entrambi i solventi, ma si ottengono risultati più soddisfacenti effettuando prima l'estrazione con l'alcol (metanolo o isopropanolo) e aggiungendo il secondo solvente organico (cloroformio o esano) successivamente.

Per i campioni più difficoltosi può essere richiesta più di una estrazione e per i tessuti liofilizzati bisogna procedere necessariamente alla reidratazione prima dell'estrazione. Inoltre i lipidi estratti dai tessuti contengono apprezzabili quantità di contaminanti quali, zuccheri, amminoacidi, urea e sali. Questi contaminanti devono essere allontanati dal campione prima che i lipidi vengano analizzati. Molti analisti usano una semplice procedura di lavaggio con una soluzione salina pari a un quarto del volume estratto. E' molto importante, al fine di evitare perdite selettive di lipidi, rispettare le proporzioni tra i solventi utilizzati nell'estrazione e la soluzione salina usata nella fase di lavaggio.

Nel presente lavoro sono quindi stati confrontati i seguenti metodi:

- ❖ metodo di riferimento
 - AOAC,1990 (n 960.39, Foster *et al.*, 1992) (7.2.1.1);
- ❖ Metodi alternativi:
 - Metodo Folch (7.2.1.2);
 - Metodo Folch modificato (7.2.1.3);
 - Metodo Hara Radin (7.2.1.4).

In letteratura al momento esiste un solo lavoro pubblicato su Food Chemistry (Perez-Palacios *et.al.*, 2008) riguardante il confronto fra diversi metodi di estrazione dei lipidi dalla carne e dai prodotti carnei, con particolare riferimento all'effetto del metodo di estrazione sul contenuto ponderale in grasso. In tale lavoro gli autori hanno confrontato 6 differenti metodi di estrazione: due metodi di riferimento (Soxhlet e Soxhlet in continuo, con e senza idrolisi acida) e due metodi "alternativi" (Folch *et al.* 1957 e Bligh & Dyer, 1959) su tipi di carne e prodotti carnei differenti in contenuto di grasso e caratteristiche fisico-chimiche. In questo studio il parametro preso in considerazione è stato il contenuto ponderale lipidico dei substrati analizzati, i risultati emersi hanno evidenziato che il metodo "alternativo" descritto da Folch *et al.*, (1957) è adatto all'estrazione dei lipidi in tutti i tipi di carne e prodotti carnei oggetto del suddetto studio. Questo risultato è stato correlato dagli autori alle caratteristiche ed al contenuto di grasso dei prodotti analizzati o addirittura alla quantità di campione pesata.

Nel presente lavoro di tesi, come detto in precedenza, partendo dallo stesso lotto omogeneo di carne di agnello sono state effettuate delle estrazioni in triplo utilizzando sia il metodo di riferimento (AOAC, 1990) sia i tre metodi alternativi (Folch, Folch modificato e Hara-Radin). In Tabella 7.4 sono riportati i risultati ottenuti relativamente al contenuto ponderale del grasso estratto in triplo in tre giornate consecutive.

Tabella 7.4 - Valori di grasso determinati nella carne d'agnello (espressi in g/100g) di prodotto (media \pm ds), e determinati con il metodo di riferimento e con i tre metodi alternativi.

	AOAC,1990	Hara-Radin	Folch modicato	Folch	Effetto
Grasso	1,73 ^c \pm 0,12	2,17 ^b \pm 0,10	2,52 ^a \pm 0,20	2,40 ^a \pm 0,15	***

Analisi della varianza:*** P< 0,001; ** P< 0,01; * P<0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard. Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione.

In tabella 7.4 è riportato inoltre il risultato dell'analisi della varianza relativa all'effetto del metodo di estrazione sulla sua capacità estrattiva. I risultati ottenuti hanno evidenziato che, nonostante si parta dallo stesso campione di carne, il risultato relativo al contenuto ponderale in grasso è variato significativamente a seconda del metodo utilizzato per effettuare l'estrazione. In particolare i valori relativi al contenuto di grasso (g/100g prodotto) ottenuti analizzando la carne con il metodo Folch (Folch *et al.*, 1957) ed il metodo Folch modificato (Christie, 1989) sono risultati essere molto simili tra loro e significativamente più alti rispetto al contenuto di grasso ottenuto con gli altri due metodi. Valori intermedi sono stati ottenuti con il metodo di Hara Radin, mentre valori significativamente inferiori ($P < 0,001$) sono stati ottenuti utilizzando il metodo di riferimento (AOAC, 1990). La minore capacità estrattiva di tale metodo è probabilmente da attribuire alla complessità della struttura muscolare del campione. Le fibre muscolari del tessuto connettivo e di altri tessuti inclusi i nervi e i tessuti linfatici e vascolari non vengono mai completamente distrutte nel corso della macinatura durante la fase di campionatura. Per questo motivo i legami molto forti tra grasso e proteine non vengono distrutti e l'estrazione dei lipidi, soprattutto di quelli legati alle membrane cellulari diventa molto più difficile. Con il metodo AOAC, 1990 si estrae il grasso libero; volendo estrarre il grasso totale si può ricorrere al metodo SBR, descritto dal Comitato Nordico di Analisi degli Alimenti (Boccard *et al.*, 1981), secondo il quale il campione viene previamente idrolizzato con acido cloridrico 3N e quindi si procede all'estrazione con etere di petrolio.

Il metodo di riferimento comunque non può essere impiegato per la determinazione delle caratteristiche qualitative dei lipidi estratti, in quanto la minore capacità estrattiva potrebbe comportare anche una estrazione selettiva rispetto ad alcuni componenti lipidici piuttosto che ad altri.

I tre metodi alternativi prevedono, a differenza del metodo di riferimento, un lavaggio dell'estratto organico con una soluzione salina (NaSO_4 il metodo Hara-Radin e KCl gli altri due metodi). Questa operazione facilita l'eliminazione di contaminanti non lipidici polari presenti nell'estratto.

7.8.2 Separazione TLC delle classi lipidiche in funzione della natura del metodo di estrazione nella carne d'agnello

La cromatografia su strato sottile (TLC) è una tecnica di cromatografia liquida piana di ripartizione solido-liquido semplice e veloce, che permette l'analisi di più campioni contemporaneamente, particolarmente adatta per valutazioni di tipo qualitativo o semi-quantitativo.

Come tutte le cromatografie, essa si basa sulla differente ripartizione di diverse sostanze tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con esse.

Nella Figura 7.13 è riportata la separazione in classi degli estratti lipidici relativi a campioni omogenei dello stesso lotto di carne d'agnello, ottenuti utilizzando i tre metodi alternativi presi in considerazione nella presente tesi. Sul lato destro di ogni lastra TLC è stato depositato il grasso estratto con i tre metodi alternativi (Folch, Folch modificato e Hara-Radin), sul lato sinistro sono stati depositati invece gli standards di riferimento delle principali classi componenti l'estratto lipidico (trigliceridi, digliceridi, fosfolipidi e acidi grassi liberi). Per il riconoscimento degli acidi grassi liberi è stato utilizzato come standard rappresentativo della classe l'acido stearico (C18:0), per i digliceridi la 1,3-dilinoleina, per i trigliceridi la trilinoleina e per i fosfolipidi la sfingomielinea.

Le condizioni di lavoro utilizzate (paragrafo 7.3.1) hanno consentito di separare le varie classi, costituenti gli estratti lipidici, in funzione del loro Rf. Nell'ordine, Rf (0,53) trigliceridi > Rf (0,28) acidi grassi liberi > Rf (0,15) digliceridi > Rf (0) fosfolipidi. In particolare l'Rf dei fosfolipidi è pressochè pari a zero (Figura 7.13).

Le dimensioni delle macchie cromatografiche variano nell'ordine: trigliceridi > digliceridi > fosfolipidi > acidi grassi liberi. In particolare, la banda relativa ai digliceridi spesso appare non omogenea, ma un involuppo di più bande tra loro parzialmente sovrapposte. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la frazione dei digliceridi, oltre ad essere di per sé eterogenea (1,2-digliceridi, 1,3- digliceridi e 2,3-digliceridi), coeluisce con quella dei monogliceridi.

La tecnica cromatografica TLC ha permesso di evidenziare come, indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato, nel campione sono presenti tutte e quattro le classi lipidiche (trigliceridi, acidi grassi liberi, mono e di gliceridi e fosfolipidi

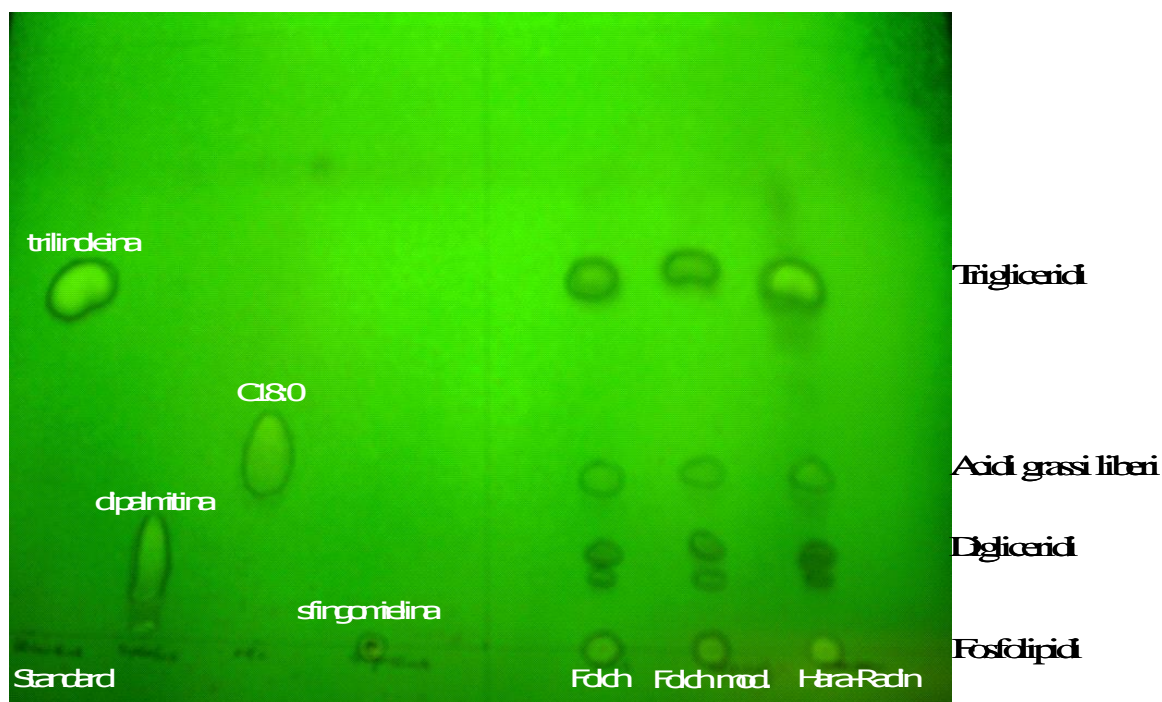


Figura 7.13 - TLC del grasso estratto, da campioni omogenei dello stesso lotto di carne d'agnello, con i tre metodi "alternativi".

7.8.3 Separazione quantitativa SPE delle classi lipidiche

La caratterizzazione quantitativa delle classi lipidiche (neutra: trigliceridi, digliceridi, monogliceridi e polare: fosfolipidi) viene eseguita tramite tecniche cromatografiche strumentali. Tuttavia, l'analisi diretta tramite metodi HPLC o GC di frazioni lipidiche tal quali è molto spesso impraticabile a causa dell'elevato numero di composti e della loro bassa concentrazione.

E' quindi necessario anteporre all'analisi cromatografica strumentale, delle fasi volte a separare, concentrare gli analiti ed a liberarli dalle impurezze che maggiormente potrebbero influenzare la separazione cromatografica. La fase di preconcentrazione degli analiti in genere viene eseguita con l'utilizzo della SPE. Questo è l'acronimo di Solid Phase Extraction, la "fase solida" è in genere costituita da una fase stazionaria cromatografica, spesso dotata di pori e diametro particellare leggermente diverse da quelle impiegate in HPLC, contenuta in piccole colonnine solitamente di capacità pari a 0.5 – 1g. In funzione della natura degli analiti da preconcentrare, della natura e della dimensione della colonna SPE e delle condizioni operative adottate, si riesce a "bloccare" nella fase solida il gruppo di analiti di interesse, mentre gli altri costituenti, meno trattenuti, vengono eluiti con idonea fase mobile. La natura fondamentale "cromatografica"

dell'interazione tra fase stazionaria delle colonnine SPE e fase mobile può talvolta essere vantaggiosamente sfruttata per tentare una separazione in classi funzionali di complesse miscele di analiti. E' questo il caso dei lipidi presenti nella carne e nei suoi derivati che, in linea di principio, possono essere opportunamente separati in trigliceridi, digliceridi e monogliceridi, e fosfolipidi tramite un'ideale scelta dell'accoppiata fase stazionaria - fase mobile.

Nel presente lavoro di tesi, il metodo di separazione per classi funzionali attraverso SPE è stato ottimizzato facendo uno screening preliminare della fase stazionaria ed una opportuna scelta della fase (o delle fasi) eluente e della durata degli step di eluizione con ciascuna di esse. Successivamente il metodo è stato applicato per la separazione e la quantificazione delle classi lipidiche costituenti gli estratti ottenuti dallo stesso lotto omogeneo di carne d'agnello utilizzando i tre metodi alternativi (Folch, Folch modificato e Hara-Radin).

7.8.3.1 Ottimizzazione della procedura di separazione delle classi lipidiche mediante separazione cromatografica su fase solida (SPE)

In questa fase del lavoro sono state confrontate le performance di due diverse colonnine commerciali SPE per la separazione delle classi presenti nell'estratto lipidico della carne d'agnello. La scelta delle colonnine è stata fatta sulla base di un precedente lavoro di tesi, portato avanti al DiRPA, riguardante la caratterizzazione delle frazioni lipidiche del latte ovino e su uno studio di Ruiz *et al.*, (2004) inerente il miglioramento del metodo di estrazione SPE per l'analisi delle frazioni lipidiche nella carne di maiale.

Nel lavoro di tesi sopra citato le più alte percentuali di recupero delle classi lipidiche presenti nel latte ovino, sono state ottenute, con colonnine in silice da 1g di fase stazionaria, facendo riferimento al metodo descritto da Caboni *et al.*, 1996, di cui nella fase sperimentale del lavoro di tesi, sono state modificate alcune condizioni di eluizione come descritto nel paragrafo 7.4.1 della sezione materiali e metodi. Nello studio di Ruiz *et al.*, (2004) sono state utilizzate invece colonnine in amminopropile da 100mg e 500mg. In questo lavoro si voleva verificare il metodo migliore di separazione dei lipidi polari, estratti da carne di maiale, confrontando due metodi, il metodo messo a punto da Kaluzny (Kaluzny *et al.*, 1985) e il metodo messo a punto da Pinkart *et al.*, (1998) ma con delle modifiche apportate dagli autori (Ruiz *et al.* (2004)). Il metodo descritto da Kaluzny è il metodo più utilizzato in bibliografia per la separazione delle differenti classi lipidiche, della carne. Tuttavia questo metodo così come provato da Pinkart *et al.*, (1998), non permette la totale separazione dei fosfolipidi, infatti circa il 50% di essi coeluisce nella frazione dei lipidi neutri. Alcuni autori hanno proposto, per migliorare la separazione delle differenti classi lipidiche delle modifiche al metodo di Kaluzny.

Nel presente lavoro di tesi, inizialmente sono stati effettuati, dei test esplorativi in triplo utilizzando queste due tipologie di colonnine SPE in modo da verificare con quale delle due si ottenesse una migliore efficienza separativa e di recupero. Sono state eseguiti due test.

Nel primo test sono state utilizzate colonnine commerciali SPE in amminopropile da 500mg (Bond Elut, Varian) per separare le frazioni lipidiche contenute nei lipidi estratti da un campione di carne di agnello. In questa prova sono state utilizzate le condizioni di lavoro così come proposte dall'articolo di Ruiz *et al.* (2004, metodo Pinkart modificato). In particolare sono stati depositati in colonnina 20 mg di estratto lipidico disciolti in 0,15 ml di una miscela esano/cloroformio/metanolo (95:3:2 v/v/v).

In Tabella 7.5 sono mostrate le condizioni di eluizione e i risultati ottenuti relativamente alle percentuali di recupero delle frazioni separate.

Tabella 7.5 - Separazione di una quantità nota di estratto lipidico (20,2mg), mediante colonnine in amminopropile da 500mg.

Colonnine in amminopropile da 500m g: I° prova (metodo Pinkart modificato)			
	I° frazione	II° frazione	III° e IV° frazione
miscela eluente	5ml cloroformio	5ml Et. Etilico/Ac. acetico (98:2 v/v)	2,5ml MeOH/CHCl ₃ (6:1 v/v) 2.5ml CH ₃ OONa(0.05M) in MeOH/CHCl ₃ (6:1 v/v)
% di recupero sul totale dei lipidi depositati	8,3mg (41,09%)	2,8mg (13,86%)	12,2mg (60,40%)

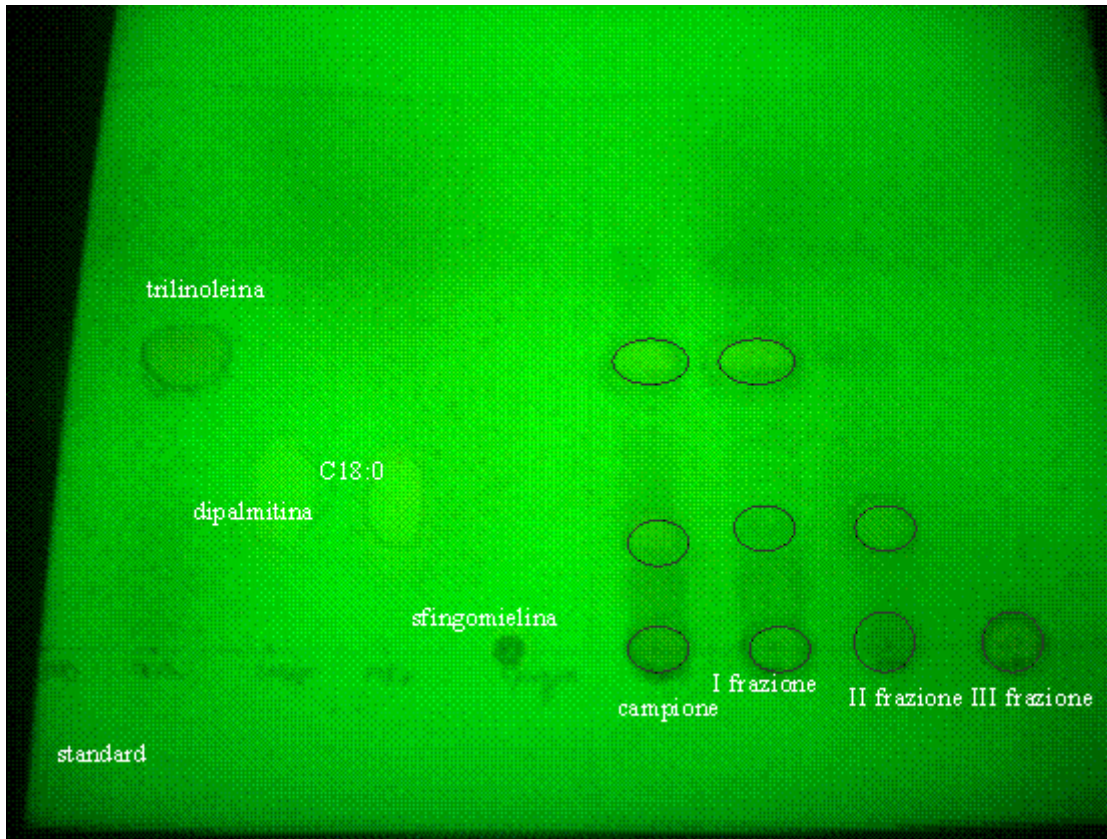


Figura 7.14 - TLC relativa alla prima prova di separazione SPE di cui alla tabella 7.5.

Le frazioni separate sono state sottoposte ad analisi TLC. Come mostrato in Figura 7.14, all'analisi TLC, le tre classi lipidiche non sono risultate ben separate, infatti nella prima frazione si è osservata una macchia relativa ai digliceridi e in tutte e tre le frazioni sono presenti i fosfolipidi. I dati relativi alla percentuale di recupero, rispetto alla quantità di lipide depositato in colonna, risultano inoltre essere sovrastimati. (Tabella 7.5).

Visto il risultato ottenuto nella prova è stata effettuata una verifica tenendo separate le frazioni terza e quarta, con lo scopo di capire il motivo della sovrastima del recupero evidenziato nella prima prova. In Tabella 7.6 sono riportate le condizioni utilizzate per la seconda prova con le relative percentuali di recupero. Anche in questo caso la % di recupero è superiore al 100%. Questo risultato probabilmente è dovuto alla presenza nella quarta frazione di acetato di sodio utilizzato nella soluzione eluente e visibile come precipitato bianco.

Tabella 7.6 - Separazione di una quantità nota di estratto lipidico (22,8mg), mediante colonnine in amminopropile da 500mg.

Colonnine in amminopropile da 500m g: II° prova (metodo Pinkart modificato)

	I° frazione	II° frazione	III° frazione	IV° frazione
miscela eluente	5ml CHCl ₃	5ml Et. Etilico/Ac. acetico (98:2 v/v)	2,5ml MeOH/CHCl ₃ (6:1 v/v)	2,5ml CH ₃ OONa (0.05M) in MeOH/CHCl ₃
% di recupero sul totale dei lipidi depositati	13,3mg (58,33%)	3,1mg (13,60%)	3,2mg (14,03%)	8,6mg (37,72%)

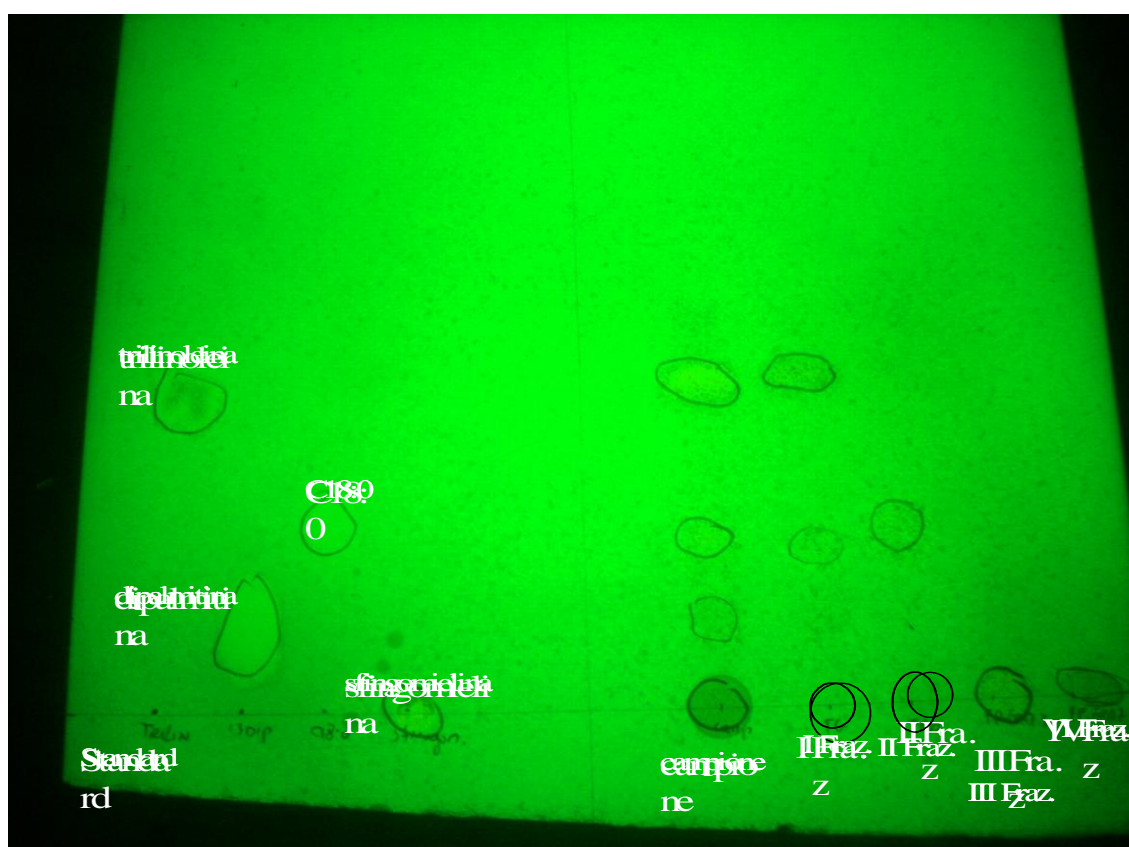


Figura 7.15 - TLC relativa alla seconda prova di separazione SPE di cui alla Tabella 7.6.

Inoltre dalla TLC (Figura 7.15) relativa alla seconda prova è stato possibile osservare come in tutte e quattro le frazioni siano presenti i fosfolipidi anche se nelle prime tre frazioni le macchie sono poco intense.

Nel secondo test, volto alla ottimizzazione della scelta delle colonnine da utilizzare, sono state utilizzate colonnine commerciali SPE in silice costituite da 1g di fase stazionaria (Bond Elut,

Varian). Nelle colonnine in silice il gruppo funzionale della fase stazionaria coinvolto nell'interazione con gli analiti polari è principalmente il gruppo idrossilico sulla superficie delle particelle di Silice. Le condizioni operative sono quelle descritte nel lavoro di Caboni *et al.*, (1996) e modificate da noi, in un precedente lavoro di tesi sul latte ovino, e riportate nel capitolo 7 paragrafo 7.4.1 della presente tesi.

Anche in questo caso sono stati depositati 30 mg di lipide estratto da un campione di carne di agnello, previamente disciolti in 0,5ml di cloroformio. In Tabella 7.7 sono mostrate le condizioni di eluizione e i risultati relativi alla prova. In Figura 7.16 è mostrata la TLC delle frazioni eluite.

Le condizioni operative descritte in Tabella 7.7 hanno permesso di ottenere una buona separazione delle diverse classi lipidiche. Le condizioni di eluizione utilizzate hanno permesso di separare i trigliceridi nella prima frazione, i digliceridi, monogliceridi e acidi grassi liberi nella seconda frazione ed infine i fosfolipidi nella terza frazione. L'estratto lipidico analizzato risulta essere costituito in media dal 33% di trigliceridi, 14% di gliceridi, monogliceridi e acidi grassi liberi, e per il 35% da fosfolipidi.

Tabella 7.7 - Separazione di una quantità nota di estratto lipidico da carne d'agnello (29.9 mg), mediante colonnine in silice da 1g.

Colonnine in Silice da 1 g: (metodo Caboni modificato)			
	I° frazione	II° frazione	III° frazione
miscela eluente	20 ml Esano/ Et. Etilico (15:1 v/v)	10 ml Esano/ Et. Etilico (1:1 v/v)	30 ml MeOH
% di recupero sul totale dei lipidi depositati	11,50 mg (32,6%)	5,30 mg (14,1%)	12,70 mg (35,1%)

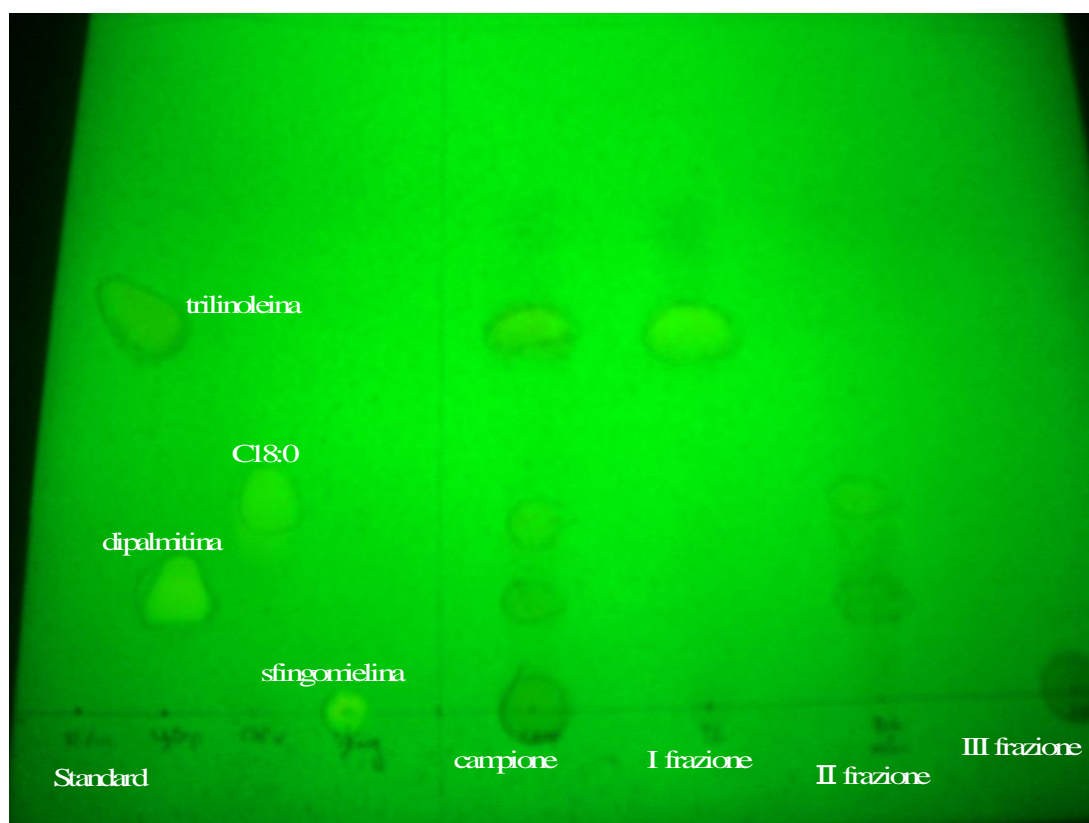


Figura 7.16 - TLC relativa alla prova di separazione SPE di cui alla Tabella 7.7.

Visti i buoni risultati ottenuti con le condizioni di separazione SPE utilizzate in questo secondo test e descritte, nei particolari, nel paragrafo 7.4.1 (sezione materiali e metodi), per separare le classi lipidiche degli estratti, ottenuti da campioni omogenei dello stesso lotto di carne d'agnello con i tre metodi alternativi (Folch, Folch modificato e Hara Radin), si è optato per l'applicazione delle suddette condizioni.

7.8.3.2 Separazione SPE e quantificazione delle classi lipidiche presenti nella carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione

Gli estratti lipidici, ottenuti estraendo la materia grassa da campioni omogenei dello stesso lotto di carne di agnello, con ciascun metodo in esame (Folch, Folch modificato e Hara Radin), sono stati sottoposti in quadruplo alla separazione SPE (vedi paragrafo 7.4.1, della sezione Materiali e Metodi). Per ciascuna replica, 50 mg (pesati esattamente) di estratto lipidico sono stati depositati in colonna e le frazioni separate sono state monitorate mediante TLC (Figure 7.17-7.19).

Le condizioni di lavoro utilizzate hanno permesso di separare i trigliceridi nella prima frazione, i digliceridi, i monogliceridi e gli acidi grassi liberi nella seconda frazione ed infine i fosfolipidi nella terza frazione.

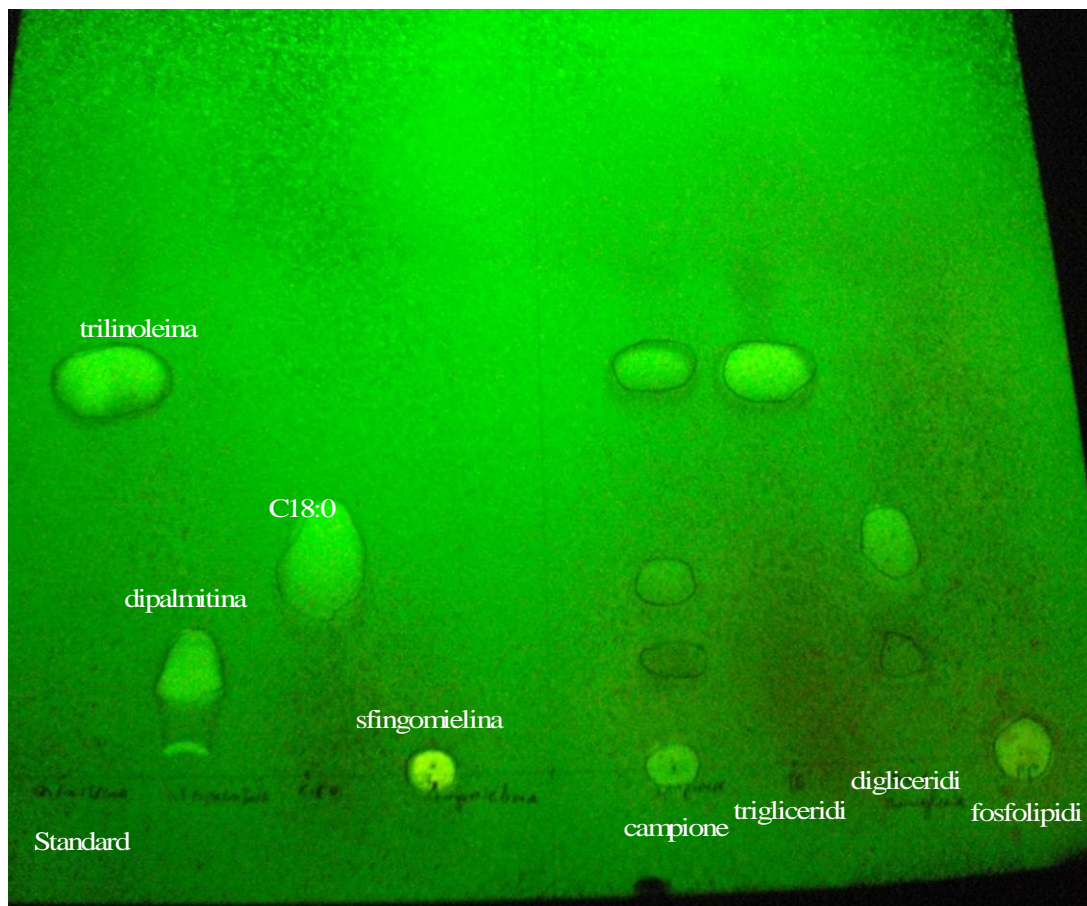


Figura 7.17 - TLC relativa alle prove di separazione SPE delle classi lipidiche di un campione di carne d'agnello estratto con il metodo Folch.

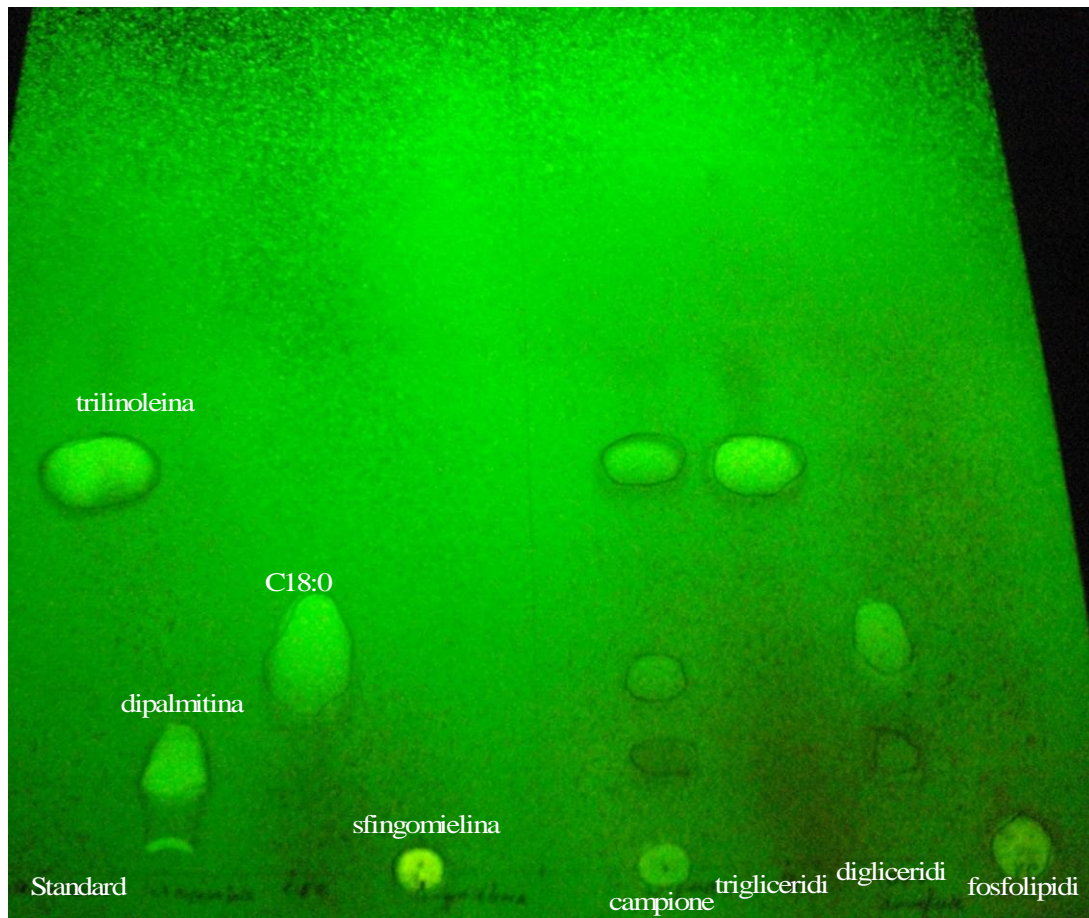


Figura 7.18 - TLC relativa alle prove di separazione SPE delle classi lipidiche di un campione di carne d'agnello estratto con il metodo Folch modificato.

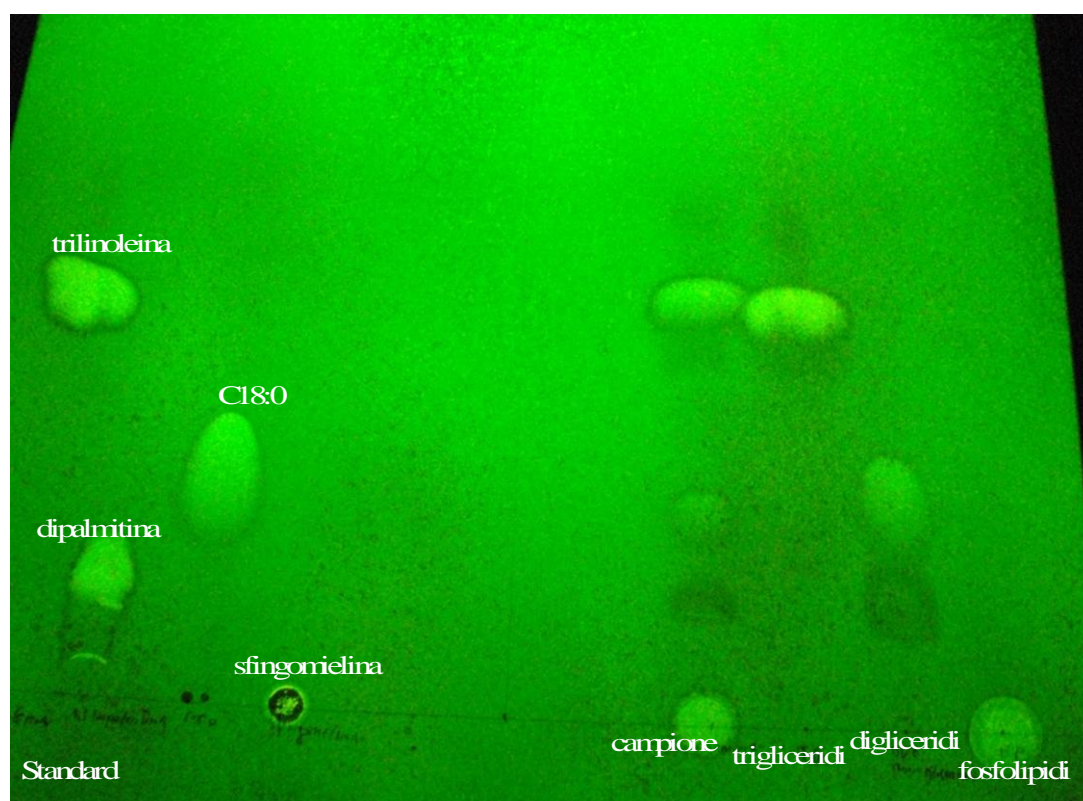


Figura 7.19 - TLC relativa alle prove di separazione SPE delle classi lipidiche di un campione di carne d'agnello estratto con il metodo Hara Radin.

Nella Tabella 7.8 sono riportati i risultati, delle quattro ripetizioni mediate, relativi alla separazione e quantificazione delle classi lipidiche (trigliceridi, mono digliceridi e FFA, e fosfolipidi). Nella stessa tabella è riportato l'effetto del metodo di estrazione utilizzato sulla quantificazione delle classi lipidiche separate tramite SPE.

In linea di principio si può dire che la natura del metodo utilizzato, per l'estrazione della frazione lipidica dalla carne d'agnello, ha influenzato significativamente il contenuto di trigliceridi e di digliceridi presenti nell'estratto e quantificati tramite separazione degli stessi per SPE .

Il metodo di estrazione Hara-Radin (sistema estraente esano/isopropanolo) ha consentito di ottenere una frazione lipidica (Tabella 7.8) caratterizzata da un contenuto significativamente più alto in trigliceridi e digliceridi rispetto agli altri metodi ($P < 0.001$). La minore polarità della miscela esano/isopropanolo del metodo Hara Radin, rispetto a quella della miscela cloroformio/metanolo degli altri due metodi, potrebbe avere favorito l'ottenimento di un estratto più ricco in lipidi meno polari (trigliceridi e mono-digliceridi).

Il metodo di estrazione utilizzato pare invece non essere significativamente determinante nella separazione e successiva quantificazione dei fosfolipidi. Anche se il metodo di Folch e Folch modificato mostrano entrambi una certa tendenza, non significativa, ad estrarre una maggiore percentuale di fosfolipidi rispetto al metodo Hara Radin. La maggiore polarità della miscela estraente cloroformio/metanolo (Folch e Folch modificato) rispetto alla miscela esano/isopropanolo (Hara Radin) potrebbe spiegare, in questo caso, l'ottenimento di un estratto più ricco in lipidi polari (fosfolipidi).

Il metodo di estrazione Hara-Radin ha permesso di ottenere, inoltre, un estratto significativamente più ricco in componenti lipidici totali (trigliceridi, mono- digliceridi e fosfolipidi) (96,03%, $P < 0.001$, Tabella 7.8) rispetto agli estratti ottenuti con gli altri due metodi. Questi risultati confermano precedenti studi in cui l'estrazione di componenti lipidici, da matrici animali e vegetali, era stata ottimizzata con la miscela estraente esano/isopropanolo, ottenendo, rispetto ad altre tecniche di estrazione quali ad esempio il metodo di Folch, ed il metodo Folch modificato, estratti lipidici caratterizzati da una ridotta quantità di contaminanti non lipidici e di materiale proteo-lipidico denaturato (Hara and Radin, 1978; Wolff *et al.*, 1989).

Tabella 7.8 - Separazione SPE su colonnine in silice, e quantificazione delle classi di lipidi componenti la carne d'agnello, in funzione del metodo di estrazione (media \pm ds).

	Folch	Folch modificato	Hara Radin	Effetto
Lipide depositato in colonna (mg)	50,87 \pm 0,35	51,70 \pm 0,36	51,07 \pm 0,76	ns
Trigliceridi (mg)	17,53 ^b \pm 1,17	17,57 ^b \pm 1,25	22,93 ^a \pm 0,65	**
Trigliceridi (%)	34,47 ^b \pm 2,29	33,96 ^b \pm 2,19	44,91 ^a \pm 1,26	**
Mono digliceridi e FFA (mg)	8,80 ^b \pm 0,26	8,30 ^b \pm 0,56	10,03 ^a \pm 0,23	**
Mono digliceridi e FFA (%)	17,30 ^b \pm 0,61	16,05 ^b \pm 1,10	19,65 ^a \pm 0,58	**
Fosfolipidi (mg)	18,40 \pm 1,11	17,87 \pm 0,38	16,07 \pm 1,33	ns
Fosfolipidi (%)	36,17 \pm 2,05	34,55 \pm 0,49	31,47 \pm 2,73	ns
Totale frazioni (mg)	44,73 ^b \pm 1,98	43,73 ^b \pm 1,54	49,03 ^a \pm 0,47	*
% di recupero sul totale del lipide depositato	87,94 ^b \pm 3,75	84,21 ^b \pm 2,79	96,03 ^a \pm 1,73	**

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard.

7.8.4 Valutazione quali-quantitativa del profilo acido dei lipidi della carne di agnello

7.8.4.1 Ottimizzazione del metodo di transmetilazione dei lipidi totali nella carne d'agnello

L'analisi del profilo acido di un estratto lipidico prevede la conversione degli acidi grassi in derivati maggiormente volatili, principalmente in esteri metilici (FAME). La reazione di transmetilazione avviene in presenza di metanolo anidro e di un catalizzatore.

Come già discusso nel capitolo 6, in presenza di un catalizzatore basico la reazione di transmetilazione avviene in tempi minori rispetto a quelli necessari in ambiente acido, e ciò consente di lavorare a temperatura ambiente. In tali condizioni di reazione si evitano sia i problemi legati all'isomerizzazione dei doppi legami nella trans-esterificazione degli acidi grassi coniugati (CLA), sia quelli legati alle perdite per la significativa volatilità degli acidi grassi a corta catena. I catalizzatori basici più comunemente utilizzati sono NaOCH_3 , KOH e NaOH . Lo svantaggio principale della catalisi basica è legato al fatto che gli acidi grassi liberi non vengono metilati, e ciò potrebbe falsare i risultati analitici per quei prodotti il cui contenuto di acidi grassi liberi non sia trascurabile. Un ulteriore svantaggio della transmetilazione in ambiente basico è dovuto al fatto che alcuni costituenti dei fosfolipidi quali gli N-acillipidi (es: sfingomieline) non vengono completamente transesterificati (Christie, 1990; FIL-IDF 182:1999).

La transmetilazione in ambiente acido avviene invece in presenza di un largo eccesso di metanolo anidro, un catalizzatore acido ed elevate temperature. I catalizzatori più utilizzati sono: HCl , CH_3COCl , H_2SO_4 e BF_3 .

La catalisi acida consente di transesterificare completamente sia gli acidi grassi legati che quelli in forma libera, inoltre permette la completa transesterificazione delle sfingomieline. Lo svantaggio di alcuni catalizzatori acidi (quali ad esempio l' HCl e H_2SO_4) è che, operando a temperature elevate (80-100°C) e per tempi di reazione prolungati, possono provocare reazioni di isomerizzazione dei sistemi coniugati con aumento di isomeri *trans-trans*, migrazioni dei doppi legami e formazione di metossi e idrossi artefatti, modificando conseguentemente il contenuto originario in acidi grassi del campione di partenza (Kramer *et al.* 1997).

Con lo scopo di poter scegliere il metodo migliore per la transmetilazione degli estratti lipidici ottenuti con i tre metodi alternativi (Hara Radin, Folch e Folch modificato) e delle rispettive frazioni lipidiche separate per SPE, nel presente lavoro di tesi è stato effettuato un preliminare confronto quantitativo e qualitativo del profilo acido ottenuto transmetilando sia in ambiente basico che in ambiente acido alcuni estratti lipidici ottenuti da carne d'agnello.

I risultati del confronto sono riportati nelle Tabelle 7.9a e 7.9b. Nelle stesse tabelle è riportata anche la significatività statistica dell'effetto ascrivibile alla tipologia di transmetilazione.

Come mostrato nelle Tabelle 7.9 a e 7.9 b, la transmetilazione in ambiente acido ha consentito di ottenere un recupero significativamente maggiore in termini quantitativi rispetto a quanto ottenuto in ambiente basico per quasi tutti gli acidi grassi identificati.

Tabella 7.9 a - Comparazione dei risultati ottenuti per transmetilazione in ambiente acido e in ambiente basico di campioni di carne d'agnello (media \pm ds).

FAME (mg/g di grasso)	metilazione basica	metilazione acida	Effetto
C7:0	0,347 \pm 0,26	1,053 \pm 0,87	*
C10:0	1,580 \pm 0,71	2,354 \pm 0,83	*
Corta catena	1,927 \pm 0,78	3,407 \pm 1,32	*
C12:0	3,770 \pm 0,78	5,019 \pm 0,66	**
C14:0 i	0,326 \pm 0,08	0,439 \pm 0,06	**
C14:0	33,667 \pm 3,65	38,322 \pm 3,76	*
C15:0 i	1,001 \pm 0,15	1,183 \pm 0,13	*
C15:0 ai	1,798 \pm 0,23	2,159 \pm 0,16	**
C14:1 9c	0,961 \pm 0,14	4,485 \pm 0,39	***
C15:0	3,766 \pm 0,43	10,772 \pm 1,64	***
C16:0 i	1,405 \pm 0,17	1,699 \pm 0,16	**
C16:0	117,405 \pm 9,21	130,606 \pm 8,65	**
C17:0 i?	3,097 \pm 0,38	3,799 \pm 0,37	**
C16:1 7c	1,792 \pm 0,23	3,004 \pm 0,34	***
C17:0 ai	3,433 \pm 0,35	4,065 \pm 0,37	**
C16:1 9c	7,509 \pm 0,85	10,612 \pm 0,87	***
C17:0	5,550 \pm 0,43	6,377 \pm 0,35	***
C17:1 10c	2,368 \pm 0,16	5,138 \pm 0,61	***
Media catena	187,846 \pm 16,68	227,677 \pm 17,22	***
C18:0 i	0,547 \pm 0,05	0,629 \pm 0,04	**
C18:0	72,858 \pm 2,67	78,782 \pm 2,68	***
C18:1 6t-8t	0,830 \pm 0,23	1,039 \pm 0,10	*
C18:1 9t	1,517 \pm 0,19	1,876 \pm 0,14	***
C18:1 10t	1,725 \pm 0,42	1,819 \pm 0,24	ns
C18:1 11t	16,539 \pm 1,39	19,873 \pm 1,38	***
C18:1 12t	1,932 \pm 0,25	2,293 \pm 0,12	**
C18:1 13t-14t	4,364 \pm 0,89	4,493 \pm 0,52	ns
C18:1 9c	158,585 \pm 13,25	197,015 \pm 12,51	***
C18:1 15t-10c	1,599 \pm 0,38	2,113 \pm 0,79	ns
C18:1 11 c	6,037 \pm 0,24	7,135 \pm 0,21	***
C18:1 12 c	1,522 \pm 0,21	1,705 \pm 0,09	*
C18:1 13 c	0,750 \pm 0,27	0,850 \pm 0,12	ns
C18:1 14c/16t	2,164 \pm 0,27	2,303 \pm 0,21	ns
C18:2 9 13c/t	2,658 \pm 0,26	3,836 \pm 0,30	***
C18:2 9c,12t / 8t,12c	1,091 \pm 0,12	1,650 \pm 0,15	***
C18:1 16c	0,653 \pm 0,10	0,803 \pm 0,13	*
C18:2 9t,12c	0,222 \pm 0,06	0,320 \pm 0,06	**
C18:2 11t,15c	1,521 \pm 0,23	2,084 \pm 0,18	***
C18:2 9c,12c	37,068 \pm 2,99	45,079 \pm 3,13	***
C18:2 9c,15c	0,257 \pm 0,06	0,261 \pm 0,10	ns
C20:0	0,809 \pm 0,13	0,861 \pm 0,08	ns
C18:3 6c,9c,12c	0,277 \pm 0,07	0,424 \pm 0,07	***
C20:1 11c	0,538 \pm 0,05	0,677 \pm 0,04	***
C18:3 9c,12c,15c	8,218 \pm 1,06	10,487 \pm 1,31	**

Tabella 7.9 b - Comparazione dei risultati ottenuti per transmetilazione in ambiente acido e in ambiente basico di campioni di carne d'agnello (media \pm ds).

FAME (mg/g di grasso)	metilazione basica	metilazione acida	Effetto
CLA 9c,11t	12,257 \pm 2,25	12,076 \pm 2,68	ns
CLA 9t,11c	0,276 \pm 0,08	0,296 \pm 0,04	ns
CLA 11t,13c	0,502 \pm 0,12	0,588 \pm 0,07	ns
CLA 11t,13t	0,176 \pm 0,04	0,199 \pm 0,06	ns
CLA 9t,11t	0,277 \pm 0,04	1,096 \pm 0,25	***
C20:2 11c,14c	0,266 \pm 0,07	0,304 \pm 0,07	ns
C22:0	3,477 \pm 0,47	3,778 \pm 0,53	ns
C20:3 8c,11c,14c	1,362 \pm 0,19	1,546 \pm 0,21	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	12,181 \pm 2,20	14,622 \pm 2,80	ns
C23:0	1,111 \pm 0,24	0,161 \pm 0,06	***
C24:0	2,686 \pm 0,69	3,418 \pm 0,93	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	1,927 \pm 0,44	2,187 \pm 0,40	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	7,013 \pm 1,47	8,906 \pm 1,87	*
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	4,409 \pm 1,22	6,060 \pm 1,65	*
Lunga catena	372,197 \pm 29,32	443,642 \pm 19,37	**
FAME totali	561,970 \pm 44,77	674,727 \pm 45,61	***
SFA	258,633 \pm 19,08	295,474 \pm 19,37	**
MUFA	211,383 \pm 18,36	267,231 \pm 16,54	***
PUFA	91,955 \pm 11,56	112,021 \pm 13,70	**
UFA	303,338 \pm 27,15	379,252 \pm 27,26	***
$\Sigma\omega3$	23,344 \pm 4,06	29,986 \pm 5,16	**
$\Sigma\omega6$	52,465 \pm 5,41	62,095 \pm 5,97	**

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega6$ = somma acidi grassi omega 6.

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione. *** P< 0,0001; ** P< 0,001; * P<0,05; NS, non significativo. s = stima della deviazione standard

Sulla base dei risultati ottenuti, sembrerebbe che in generale, dal punto di vista quantitativo, il metodo migliore per l'analisi del profilo acidico del grasso estratto dalla carne sia quello di effettuare la derivatizzazione in FAME della componente lipidica totale, previa transmetilazione condotta in ambiente acido. Bisogna evidenziare il fatto, comunque, che con la metilazione acida si ha un isomerizzazione dei legami cis, infatti i risultati riportati in tabella indicano un aumento significativo, in particolare, dell'isomero CLA 9t, 11t nel grasso metilato in ambiente acido.

Pertanto il confronto del profilo acidico degli estratti lipidici della carne d'agnello, ottenuti con i tre metodi alternativi, verrà effettuato previa derivatizzazione, in ambiente acido, degli acidi grassi componenti nei corrispondenti esteri metilici (Paragrafo successivo).

7.8.4.2 Valutazione del profilo acidico dei lipidi estratti da carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione

Per ogni estratto lipidico, ottenuto con i tre metodi alternativi (Hara Radin, Folch e Folch modificato) a partire da campioni omogenei dello stesso lotto di carne di agnello, è stata derivatizzata in triplo una aliquota pari a 50 mg di lipide. Nelle Tabelle 7.10a e 7.10b è riportato il profilo acidico del grasso estratto con i tre metodi alternativi. Nelle stesse tabelle è riportata anche la significatività statistica dell'effetto attribuibile alla natura del metodo d'estrazione utilizzato.

La natura del metodo di estrazione utilizzato ha influenzato significativamente il profilo acidico della carne d'agnello analizzata. In particolare il metodo Hara-Radin, che utilizza una miscela estraente costituita da esano/isopropanolo, ha permesso di ottenere, a parità di quantità di estratto lipidico transesterificato, un profilo caratterizzato da un contenuto significativamente superiore in FAME rispetto all'estratto ottenuto con i metodi Folch e Folch modificato. Il contenuto di FAME totali, espresso in mg/g di lipide, è risultato essere nell'ordine: 728, 660, 635 (Tabella 7.10 b) rispettivamente per il metodo Hara Radin, Folch e Folch modificato. Come già precedentemente discusso, e come osservato anche da altri autori, l'estrazione, da matrici animali e vegetali, di componenti lipidici con la miscela esano/isopropanolo consente di ottenere, infatti, estratti lipidici caratterizzati da una ridotta quantità di contaminanti non lipidici e di materiale proteo-lipidico denaturato (Wolff *et al.* 1989). Riguardo agli acidi grassi individuali, costituenti il profilo, in generale il metodo di estrazione utilizzato ha avuto una influenza maggiore sugli acidi grassi saturi a corta, e media catena che risultano essere significativamente superiori nell'estratto ottenuto con il metodo Hara Radin rispetto agli estratti ottenuti con gli altri due metodi. La minore polarità della miscela esano/isopropanolo del metodo Hara Radin, rispetto a quella della miscela cloroformio/metanolo degli altri due metodi, potrebbe avere favorito l'ottenimento di un estratto più ricco in lipidi meno polari (trigliceridi e mono-digliceridi) notoriamente più ricchi in acidi grassi saturi.

Tabella 7.10 a – Profilo acidico del grasso estratto da campioni omogenei dello stesso lotto di carne d'agnello in funzione del metodo d'estrazione (media \pm ds)

FAME (mg/g di grasso)	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
C7:0	2,065 ^a \pm 0,80	0,726 ^b \pm 0,15	0,369 ^b \pm 0,00	*
C10:0	3,010 \pm 1,32	1,984 \pm 0,13	2,068 \pm 0,19	ns
Corta catena	5,075 ^a \pm 0,77	2,710 ^b \pm 0,25	2,437 ^b \pm 0,19	**
C12:0	5,800 ^a \pm 0,57	4,675 ^b \pm 0,23	4,581 ^b \pm 0,09	*
C14:0 i	0,492 \pm 0,04	0,424 \pm 0,06	0,401 \pm 0,02	ns
C14:0	43,148 ^a \pm 0,82	36,006 ^b \pm 1,81	35,811 ^b \pm 0,12	***
C15:0 i	1,343 ^a \pm 0,06	1,103 ^b \pm 0,05	1,104 ^b \pm 0,06	**
C15:0 ai	2,349 ^a \pm 0,04	2,021 ^b \pm 0,11	2,106 ^b \pm 0,09	**
C14:1 9c	4,968 ^a \pm 0,18	4,215 ^b \pm 0,19	4,272 ^b \pm 0,16	**
C15:0	11,552 \pm 1,09	11,558 \pm 0,31	9,205 \pm 1,99	ns
C16:0 i	1,882 ^a \pm 0,08	1,627 ^b \pm 0,09	1,587 ^b \pm 0,07	**
C16:0	141,569 ^a \pm 0,57	125,093 ^b \pm 5,10	125,155 ^b \pm 1,57	**
C17:0 i?	4,229 ^a \pm 0,18	3,712 ^b \pm 0,06	3,457 ^b \pm 0,25	**
C16:1 7c	3,424 ^a \pm 0,10	2,910 ^b \pm 0,08	2,677 ^c \pm 0,06	***
C17:0 ai	4,538 ^a \pm 0,03	3,891 ^b \pm 0,16	3,765 ^b \pm 0,11	***
C16:1 9c	11,688 ^a \pm 0,42	10,255 ^b \pm 0,29	9,892 ^b \pm 0,24	**
C17:0	6,807 ^a \pm 0,12	6,105 ^b \pm 0,21	6,218 ^b \pm 0,11	**
C17:1 10c	5,739 ^a \pm 0,24	5,229 ^a \pm 0,21	4,444 ^b \pm 0,35	**
Media catena	249,529 ^a \pm 0,94	218,826 ^b \pm 8,85	214,676 ^b \pm 4,36	**
C18:0 i	0,651 \pm 0,04	0,609 \pm 0,06	0,627 \pm 0,02	ns
C18:0	81,210 \pm 2,62	77,445 \pm 2,82	77,692 \pm 0,79	ns
C18:1 6t-8t	1,090 \pm 0,18	1,014 \pm 0,04	1,015 \pm 0,06	ns
C18:1 9t	1,966 \pm 0,15	1,940 \pm 0,04	1,723 \pm 0,08	ns
C18:1 10t	1,981 \pm 0,16	1,651 \pm 0,22	1,826 \pm 0,28	ns
C18:1 11t	21,582 ^a \pm 0,52	19,372 ^b \pm 0,64	18,664 ^b \pm 0,21	**
C18:1 12t	2,378 \pm 0,15	2,194 \pm 0,10	2,306 \pm 0,03	ns
C18:1 13t-14t	5,021 ^a \pm 0,21	4,550 ^a \pm 0,24	3,907 ^b \pm 0,17	**
C18:1 9c	212,701 ^a \pm 1,62	191,293 ^b \pm 6,29	187,050 ^b \pm 4,06	**
C18:1 15t-10c	1,620 ^b \pm 0,10	1,607 ^b \pm 0,23	3,113 ^a \pm 0,40	**
C18:1 11 c	7,097 \pm 0,34	7,134 \pm 0,15	7,173 \pm 0,19	ns
C18:1 12 c	1,722 \pm 0,08	1,761 \pm 0,09	1,632 \pm 0,06	ns
C18:1 13 c	0,954 \pm 0,10	0,852 \pm 0,06	0,744 \pm 0,11	ns
C18:1 14c/16t	2,473 \pm 0,24	2,316 \pm 0,11	2,119 \pm 0,14	ns
C18:2 9 13c/t	4,187 ^a \pm 0,16	3,711 ^b \pm 0,18	3,611 ^b \pm 0,08	**
C18:2 9c,12t / 8t,12c	1,780 ^a \pm 0,05	1,698 ^a \pm 0,08	1,471 ^b \pm 0,04	**
C18:1 16c	0,909 \pm 0,02	0,734 \pm 0,05	0,765 \pm 0,19	ns
C18:2 9t,12c	0,327 \pm 0,04	0,283 \pm 0,03	0,351 \pm 0,09	ns
C18:2 11t,15c	2,314 ^a \pm 0,01	2,003 ^b \pm 0,02	1,936 ^b \pm 0,09	***
C18:2 9c,12c	46,480 \pm 2,49	46,104 \pm 0,05	42,654 \pm 4,44	ns
C18:2 9c,15c	0,135 ^b \pm 0,01	0,352 ^a \pm 0,03	0,294 ^a \pm 0,02	***
C20:0	0,922 \pm 0,09	0,865 \pm 0,09	0,795 \pm 0,01	ns
C18:3 6c,9c,12c	0,444 \pm 0,08	0,454 \pm 0,04	0,374 \pm 0,06	ns
C20:1 11c	0,680 \pm 0,05	0,673 \pm 0,02	0,677 \pm 0,06	ns
C18:3 9c,12c,15c	11,426 \pm 0,55	10,695 \pm 0,31	9,340 \pm 1,77	ns

Tabella 7.10 b – Profilo acidico del grasso estratto da campioni omogenei dello stesso lotto di carne d'agnello in funzione del metodo d'estrazione (media \pm ds).

FAME (mg/g di grasso)	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
CLA 9c,11t	14,687 ^a \pm 0,47	12,377 ^{ab} \pm 0,31	9,165 ^b \pm 2,30	**
CLA 9t,11c	0,296 \pm 0,08	0,298 \pm 0,03	0,293 \pm 0,02	ns
CLA 11t,13c	0,577 \pm 0,08	0,526 \pm 0,02	0,661 \pm 0,04	ns
CLA 11t,13t	0,240 \pm 0,05	0,193 \pm 0,06	0,164 \pm 0,06	ns
CLA 9t,11t	0,927 ^b \pm 0,03	0,928 ^b \pm 0,04	1,433 ^a \pm 0,02	***
C20:2 11c,14c	0,365 ^a \pm 0,01	0,308 ^{ab} \pm 0,02	0,238 ^b \pm 0,07	*
C22:0	3,734 \pm 0,24	4,073 \pm 0,20	3,527 \pm 0,90	ns
C20:3 8c,11c,14c	1,557 \pm 0,18	1,643 \pm 0,02	1,439 \pm 0,34	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	16,011 \pm 0,99	15,591 \pm 0,79	12,263 \pm 4,14	ns
C23:0	0,231 ^a \pm 0,01	0,139 ^b \pm 0,01	0,112 ^b \pm 0,01	***
C24:0	4,068 \pm 0,42	3,716 \pm 0,46	2,468 \pm 0,96	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	2,320 \pm 0,19	2,179 \pm 0,14	2,063 \pm 0,73	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	10,072 \pm 0,64	8,925 \pm 0,69	7,722 \pm 2,99	ns
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	7,254 \pm 0,44	6,344 \pm 0,59	4,582 \pm 2,19	ns
Lunga catena	474,388 ^a \pm 5,16	438,550 ^{ab} \pm 7,89	417,988 ^b \pm 25,97	*
FAME Totali	728,992 ^a \pm 5,61	660,086 ^b \pm 17,00	635,101 ^b \pm 30,11	**
SFA	319,600 ^a \pm 4,59	285,773 ^b \pm 10,69	281,049 ^b \pm 6,23	**
MUFA	287,993 ^a \pm 2,15	259,702 ^b \pm 8,42	253,999 ^b \pm 5,00	**
PUFA	121,399 \pm 4,86	114,612 \pm 2,16	100,053 \pm 19,12	ns
UFA	409,392 ^a \pm 2,71	374,313 ^{ab} \pm 6,34	354,052 ^a \pm 23,95	**
$\Sigma\omega 3$	33,521 \pm 1,35	30,499 \pm 1,57	25,937 \pm 7,64	ns
$\Sigma\omega 6$	65,042 \pm 3,33	64,130 \pm 0,77	57,113 \pm 8,63	ns

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega 3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega 6$ = somma acidi grassi omega 6.

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione. *** P < 0,0001; ** P < 0,001; * P < 0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard

7.8.5 Valutazione quali-quantitativa del profilo acidico dei gliceridi e dei fosfolipidi della carne d'agnello

Sulla base dei risultati ottenuti precedentemente, sembrerebbe che il metodo migliore per la derivatizzazione in FAME delle differenti classi lipidiche (trigliceridi, digliceridi, acidi grassi liberi e fosfolipidi) sia la catalisi in ambiente acido (paragrafo 7.8.4.1).

Pertanto la caratterizzazione gascromatografica del profilo acidico delle classi lipidiche, precedentemente separate tramite SPE, è stata effettuata previa derivatizzazione, degli acidi grassi componenti, in esteri metilici in ambiente acido.

7.8.5.1 Valutazione del profilo acido dei trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi della carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione.

Nelle Tabelle 7.11a – 7.13b è riportato il profilo acido, espresso in % sul totale dei FAME, delle classi lipidiche (trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi) estratte, da campioni omogenei dello stesso lotto di carne d'agnello, con i tre metodi alternativi (Folch, Folch modificato e Hara-Radin) e separate, in classi, mediante SPE. Nelle stesse tabelle è riportata anche la significatività statistica dell'effetto ascrivibile alla natura del metodo d'estrazione utilizzato.

In generale il metodo di estrazione utilizzato non ha avuto alcun effetto significativo, all'interno di ciascuna classe lipidica, sulla ripartizione percentuale dei singoli acidi grassi. I diversi metodi di estrazione, pur avendo una differente resa quantitativa di estrazione sia della frazione lipidica totale sia delle classi lipidiche, estraggono in ogni caso quote rappresentative delle differenti classi lipidiche.

Nei grafici riportati nelle Figure 7.20 – 7.24 è mostrata la distribuzione percentuale, nelle differenti classi lipidiche estratte con il metodo Hara-Radin (1978), di alcuni dei FAME più rappresentativi: C14:0, C16:0, C18:0, C16:1 9c, C18:1 9c, C18:1 11t, C18:2 9c 12c, C18:3 9c 12c 15c, CLA 9c 11t, C20:4 5c, 8c, 11c, 14c (acido arachidonico), C20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c (EPA), C22:5 7c, 10c, 13c, 16c, 19c (DPA), C22:6 4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c (DHA) nonché della somma degli acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi MUFA e polinsaturi (PUFA).

La distribuzione percentuale dei suddetti acidi grassi nella classe lipidica più apolare, quella dei trigliceridi, segue il seguente ordine di distribuzione SFA > MUFA > PUFA ed in particolare C16:0 > C18:0 > C14:0 per gli SFA, C18:1 9c > C18:1 11t > C16:1 9c per i MUFA, CLA 9c, 11t > C18:2 9c, 12c > C18:3 9c, 12c, 15c per i PUFA.

Nei digliceridi e nei fosfolipidi è stata osservata invece una certa tendenza all'accumulo di alcuni acidi grassi a lunga catena e con uno o più siti di insaturazione. Nei digliceridi l'ordine è il seguente: MUFA > SFA > PUFA ed in particolare C18:1 9c > C18:1 11t > C16:1 9c per i MUFA, C16:0 > C18:0 > C14:0 per gli SFA e C18:2 9c 12c > CLA 9c 11t ≥ C18:3 9c 12c 15c per il PUFA

Per quanto concerne i fosfolipidi la distribuzione ha seguito il seguente ordine PUFA > MUFA > SFA ed in particolare : C18:2 9c 12c > C18:3 9c 12c 15c > CLA 9c 11t, e C20:4 5c, 8c, 11c, 14c > C22:5 7c, 10c, 13c, 16c, 19c > C22:6 4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c > C20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c per i PUFA, C18:1 9c > C18:1 11c > C18:1 11t per i MUFA e C18:0 > C16:0 > C14:0 per gli SFA

Indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato, la frazione dei trigliceridi è caratterizzata dalla più alta % di acidi grassi saturi rispetto alle altre due frazioni analizzate (figura 7.20) ed in particolare rispetto a quella dei fosfolipidi. Infatti come osservato in numerosi studi

(Enser *et al.*, 1996, Raes *et al.*, 2004), la frazione neutra (trigliceridi e di gliceridi) è costituita prevalentemente da acidi grassi saturi e monoinsaturi.

I PUFA a lunga catena (C20-22) formati, nel muscolo e nel tessuto adiposo dei ruminanti, a partire dai due precursori acido linoleico e acido linolenico, per azione degli enzimi $\Delta 5$ e $\Delta 6$ desaturasi ed elongasi, si trovano quasi esclusivamente incorporati nella frazione dei fosfolipidi. L'elevata concentrazione degli acidi grassi insaturi a lunga catena nei fosfolipidi della carne, che è stata rimarcata da diversi autori (Enser *et al.*, 2004, Wood *et al.*, 2005), pare sia, una conseguenza del differente ed importante ruolo strutturale svolto dai fosfolipidi rispetto alle classi neutre (trigliceridi e digliceridi). La particolare composizione acidica dei fosfolipidi conferisce questi agli stessi importanti attività biologiche, infatti è nota l'abilità di queste sostanze nel ridurre i livelli plasmatici di colesterolo (Eckhardt *et al.* 2002), migliorare le funzioni cerebrali (Pepeu *et al.* 1996). Essi hanno inoltre proprietà antiossidanti (Saito and Ishihara, 1997), batteriostatiche (Sprong *et al.* 2002) e anticancerogene, queste ultime attribuite in particolare alla porzione sfingolipidica (Vesper *et al.* 1999).

Tabella 7.11 a - Profilo acidico dei trigliceridi separati dalla carne d'agnello, espresso in % rispetto al totale dei FAME (media \pm ds), in funzione della natura del metodo di estrazione.

Trigliceridi Metodo di estrazione	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
C7:0	0,55 ^a \pm 0,29	0,15 ^{ab} \pm 0,06	0,08 ^b \pm 0,01	*
corta catena	0,55 ^a \pm 0,29	0,15 ^{ab} \pm 0,06	0,08 ^b \pm 0,01	*
C12:0	1,00 \pm 0,04	0,95 \pm 0,01	0,98 \pm 0,02	ns
C14:0	8,88 \pm 0,05	9,02 \pm 0,11	9,01 \pm 0,09	ns
C15:0 ai	0,45 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,45 \pm 0,02	ns
C14:1 9c	0,26 \pm 0,01	0,23 \pm 0,00	0,14 \pm 0,07	ns
C15:0	0,91 \pm 0,04	0,90 \pm 0,01	0,91 \pm 0,03	ns
C16:0 i	0,33 \pm 0,00	0,31 \pm 0,04	0,30 \pm 0,02	ns
C16:0	26,60 \pm 0,43	27,11 \pm 0,45	27,33 \pm 0,22	ns
C17:0 i?	0,63 \pm 0,02	0,67 \pm 0,03	0,63 \pm 0,04	ns
C16:1 7c	0,41 \pm 0,03	0,39 \pm 0,02	0,37 \pm 0,01	ns
C17:0 ai	0,78 ^b \pm 0,00	0,79 ^a \pm 0,01	0,75 ^b \pm 0,02	**
C16:1 9c	1,84 ^a \pm 0,01	1,82 ^a \pm 0,04	1,75 ^b \pm 0,01	*
C17:0	1,16 \pm 0,01	1,18 \pm 0,06	1,18 \pm 0,03	ns
C17:1 10c	0,47 \pm 0,02	0,46 \pm 0,04	0,44 \pm 0,02	ns
media catena	43,71 \pm 0,35	44,29 \pm 0,64	44,25 \pm 0,16	ns
C18:0	11,97 \pm 0,16	12,28 \pm 0,10	12,43 \pm 0,29	ns
C18:1 6t-8t	0,17 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,21 \pm 0,03	ns
C18:1 9t	0,31 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,35 \pm 0,01	ns
C18:1 10t	0,37 \pm 0,05	0,39 \pm 0,04	0,41 \pm 0,04	ns
C18:1 11t	3,59 \pm 0,10	3,71 \pm 0,10	3,69 \pm 0,01	ns
C18:1 12t	0,38 \pm 0,02	0,38 \pm 0,04	0,44 \pm 0,01	ns
C18:1 13t-14t	0,78 \pm 0,01	0,80 \pm 0,05	0,84 \pm 0,01	ns
C18:1 9c	29,21 \pm 0,33	29,25 \pm 0,32	29,06 \pm 0,24	ns
C18:1 15t-10c	0,38 \pm 0,03	0,31 \pm 0,11	0,62 \pm 0,19	ns
C18:1 11 c	0,63 \pm 0,01	0,63 \pm 0,05	0,64 \pm 0,02	ns
C18:1 12 c	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00	0,13 \pm 0,02	ns
C18:1 13 c	0,13 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01	ns
C18:1 14c/16t	0,45 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,45 \pm 0,02	ns
C18:2 9 13c/t	0,54 \pm 0,03	0,53 \pm 0,02	0,52 \pm 0,01	ns
C18:2 9c,12t / 8t,12c	0,23 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02	ns
C18:1 16c	0,13 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	ns
C18:2 9t,12c	0,03 ^b \pm 0,01	0,05 ^a \pm 0,00	0,04 ^{ab} \pm 0,00	*
C18:2 11t,15c	0,34 \pm 0,01	0,32 \pm 0,05	0,36 \pm 0,04	ns
C18:2 9c,12c	1,84 \pm 0,07	1,79 \pm 0,05	1,75 \pm 0,06	ns
C20:0	0,15 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	ns
C20:1 11c	0,06 ^{ab} \pm 0,00	0,05 ^b \pm 0,01	0,08 ^a \pm 0,02	*
C18:3 9c,12c,15c	0,66 ^a \pm 0,01	0,58 ^{ab} \pm 0,01	0,53 ^b \pm 0,06	*

Tabella 7.11 b - Profilo acidico dei trigliceridi separati dalla carne d'agnello, espresso in mg % rispetto al totale dei FAME (media \pm ds), in funzione della natura del metodo di estrazione.

Trigliceridi	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	effetto
Metodo di estrazione				
CLA 9c,11t	1,86 ^a \pm 0,07	1,90 ^a \pm 0,13	1,52 ^b \pm 0,16	*
CLA 10t,12c+c21:0	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00	ns
CLA 11t,13c	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,13 \pm 0,05	ns
CLA 11t,13t	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	ns
CLA 9t,11t	0,22 \pm 0,03	0,16 \pm 0,02	0,16 \pm 0,03	*
C20:2 11c,14c	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	ns
C20:3 5c,8c,11c	0,13 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02	ns
C22:0	0,07 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	0,11 \pm 0,03	0,07 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01	ns
C23:0	0,36 \pm 0,56	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	0,04 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,03 \pm 0,00	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	0,18 \pm 0,03	0,16 \pm 0,02	0,13 \pm 0,07	ns
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	0,08 \pm 0,04	0,06 \pm 0,03	0,09 \pm 0,05	ns
lunga catena	55,74 \pm 0,14	55,56 \pm 0,67	55,67 \pm 0,17	ns
SFA	53,83 \pm 0,51	54,06 \pm 0,54	54,31 \pm 0,07	ns
MUFA	39,68 \pm 0,32	39,73 \pm 0,53	39,90 \pm 0,48	ns
PUFA	6,49 \pm 0,20	6,21 \pm 0,17	5,79 \pm 0,55	ns
UFA	46,17 \pm 0,51	45,94 \pm 0,54	45,69 \pm 0,07	ns
$\Sigma\omega 3$	1,30 \pm 0,05	1,18 \pm 0,05	1,14 \pm 0,21	ns
$\Sigma\omega 6$	2,31 \pm 0,12	2,23 \pm 0,10	2,18 \pm 0,08	ns

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega 3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega 6$ = somma acidi grassi omega 6.

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione. *** P < 0,0001; ** P < 0,001; * P < 0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard

Tabella 7.12 a - Profilo acidico dei Digliceridi separati dalla carne d'agnello, espresso in % rispetto al totale dei FAME (media \pm ds), in funzione della natura del metodo di estrazione.

Digliceridi Metodo di estrazione	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
C7:0	0,36 ^{ab} \pm 0,01	0,37 ^a \pm 0,03	0,29 ^b \pm 0,05	*
corta catena	0,36 ^{ab} \pm 0,01	0,37 ^a \pm 0,03	0,29 ^b \pm 0,05	*
C12:0	1,15 \pm 0,04	1,18 \pm 0,01	1,16 \pm 0,07	ns
C14:0	5,08 \pm 0,15	5,27 \pm 0,15	5,15 \pm 0,37	ns
C15:0 ai	0,41 \pm 0,03	0,45 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02	ns
C14:1 9c	0,47 \pm 0,04	0,51 \pm 0,07	0,47 \pm 0,12	ns
C15:0	0,38 \pm 0,18	0,20 \pm 0,27	0,38 \pm 0,23	ns
C16:0 i	0,30 ^a \pm 0,02	0,31 ^a \pm 0,01	0,24 ^b \pm 0,03	*
C16:0	13,38 \pm 1,00	13,89 \pm 0,28	13,60 \pm 1,40	ns
C17:0 i?	0,50 ^b \pm 0,03	0,49 ^b \pm 0,04	0,66 ^a \pm 0,05	**
C16:1 7c	1,02 \pm 0,07	0,95 \pm 0,01	0,96 \pm 0,04	ns
C17:0 ai	0,64 \pm 0,01	0,61 \pm 0,00	0,62 \pm 0,02	ns
C16:1 9c	2,89 \pm 0,15	2,83 \pm 0,03	2,76 \pm 0,09	ns
C17:0	0,45 \pm 0,36	0,64 \pm 0,04	0,63 \pm 0,01	ns
C17:1 10c	0,72 \pm 0,00	0,71 \pm 0,02	0,72 \pm 0,04	ns
media catena	27,39 \pm 1,17	28,03 \pm 0,69	27,80 \pm 1,70	ns
C18:0	6,64 \pm 0,71	6,68 \pm 0,17	6,80 \pm 0,61	ns
C18:1 6t-8t	0,25 \pm 0,04	0,21 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	ns
C18:1 9t	0,34 ^b \pm 0,01	0,39 ^a \pm 0,01	0,37 ^{ab} \pm 0,02	*
C18:1 10t	0,29 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02	ns
C18:1 11t	3,28 \pm 0,08	3,31 \pm 0,08	3,30 \pm 0,03	ns
C18:1 12t	0,38 \pm 0,01	0,37 \pm 0,03	0,41 \pm 0,03	ns
C18:1 13t-14t	0,83 \pm 0,05	0,77 \pm 0,03	0,82 \pm 0,01	ns
C18:1 9c	38,15 \pm 0,81	38,23 \pm 0,49	37,44 \pm 0,67	ns
C18:1 15t-10c	0,38 \pm 0,09	0,40 \pm 0,11	0,82 \pm 0,30	ns
C18:1 11 c	1,09 \pm 0,03	1,02 \pm 0,05	1,10 \pm 0,04	ns
C18:1 12 c	0,23 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	ns
C18:1 13 c	0,20 ^a \pm 0,01	0,20 ^a \pm 0,02	0,13 ^b \pm 0,00	***
C18:1 14c/16t	0,24 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02	0,22 \pm 0,03	ns
C18:2 9 13c/t	1,03 ^a \pm 0,05	0,99 ^{ab} \pm 0,01	0,92 ^b \pm 0,03	*
C18:2 9c,12t / 8t,12c	0,41 ^a \pm 0,01	0,42 ^a \pm 0,01	0,37 ^b \pm 0,02	*
C18:1 16c	0,18 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	ns
C18:2 9t,12c	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	ns
C18:2 11t,15c	0,43 \pm 0,01	0,44 \pm 0,03	0,42 \pm 0,01	ns
C18:2 9c,12c	7,47 \pm 0,35	7,26 \pm 0,30	7,88 \pm 0,41	ns
C20:0	0,07 ^{ab} \pm 0,00	0,08 ^a \pm 0,01	0,05 ^b \pm 0,01	*
C20:1 11c	0,11 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	ns
C18:3 9c,12c,15c	2,15 \pm 0,08	1,99 \pm 0,18	1,99 \pm 0,33	ns

Tabella 7.12 b - Profilo acidico dei Digliceridi separati dalla carne d'agnello, espresso in % rispetto al totale dei FAME (media \pm ds), in funzione della natura del metodo di estrazione.

Digliceridi				
Metodo di estrazione	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
CLA 9c,11t	2,34 \pm 0,21	2,13 \pm 0,11	1,81 \pm 0,43	ns
CLA 10t,12c+c21:0	0,08 ^a \pm 0,00	0,08 ^a \pm 0,01	0,05 ^b \pm 0,01	**
CLA 11t,13c	0,10 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,11 \pm 0,04	ns
CLA 11t,13t	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	ns
CLA 9t,11t	0,34 \pm 0,03	0,36 \pm 0,05	0,32 \pm 0,03	ns
C20:2 11c,14c	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,03	ns
C20:3 5c,8c,11c	0,18 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	0,13 \pm 0,06	ns
C22:0	0,33 \pm 0,02	0,31 \pm 0,03	0,34 \pm 0,07	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	2,36 \pm 0,16	2,15 \pm 0,28	2,20 \pm 0,61	ns
C23:0	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,03	0,03 \pm 0,02	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	0,49 \pm 0,10	0,43 \pm 0,06	0,39 \pm 0,16	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	1,51 \pm 0,16	1,25 \pm 0,26	1,17 \pm 0,38	ns
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	0,19 \pm 0,01	0,58 \pm 0,68	1,13 \pm 0,53	ns
Lunga catena	72,25 \pm 1,16	71,60 \pm 0,72	71,91 \pm 1,74	ns
SFA	29,73 \pm 2,00	30,53 \pm 0,91	30,38 \pm 2,19	ns
MUFA	51,04 \pm 1,14	50,94 \pm 0,75	50,58 \pm 0,94	ns
PUFA	19,22 \pm 1,01	18,53 \pm 1,63	19,04 \pm 2,90	ns
UFA	70,27 \pm 2,00	69,47 \pm 0,91	69,62 \pm 2,19	ns
$\Sigma\omega3$	4,78 \pm 0,35	4,68 \pm 0,94	5,09 \pm 1,38	ns
$\Sigma\omega6$	10,43 \pm 0,50	10,04 \pm 0,63	10,63 \pm 1,06	ns

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega6$ = somma acidi grassi omega 6.

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione. *** P < 0,0001; ** P < 0,001; * P < 0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard

Tabella 7.13 a - Profilo acidico dei Fosfolipidi separati dalla carne d'agnello, espresso in % rispetto al totale dei FAME (media \pm ds), in funzione della natura del metodo di estrazione.

Fosfolipidi				
Metodo di estrazione	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
C7:0	0,19 \pm 0,16	0,28 \pm 0,19	0,11 \pm 0,02	ns
Corta catena	0,19 \pm 0,16	0,28 \pm 0,19	0,11 \pm 0,02	ns
C12:0	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,11 \pm 0,06	ns
C14:0	0,49 \pm 0,07	0,53 \pm 0,14	0,90 \pm 0,25	ns
C15:0 ai	0,08 ^{ab} \pm 0,01	0,06 ^b \pm 0,02	0,11 ^a \pm 0,00	**
C14:1 9c	0,21 \pm 0,02	0,22 \pm 0,01	0,30 \pm 0,08	ns
C15:0	5,40 \pm 0,15	4,36 \pm 0,62	3,45 \pm 1,40	ns
C16:0 i	0,11 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	ns
C16:0	10,91 \pm 0,18	11,90 \pm 0,61	13,19 \pm 1,79	ns
C17:0 i?	0,43 ^b \pm 0,02	0,42 ^b \pm 0,02	0,52 ^a \pm 0,05	*
C16:1 7c	0,22 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,20 \pm 0,04	ns
C17:0 ai	0,28 \pm 0,00	0,28 \pm 0,01	0,34 \pm 0,04	ns
C16:1 9c	0,40 \pm 0,02	0,39 \pm 0,00	0,50 \pm 0,08	ns
C17:0	0,53 \pm 0,02	0,62 \pm 0,04	0,67 \pm 0,10	ns
C17:1 10c	1,32 \pm 0,08	1,11 \pm 0,11	0,98 \pm 0,20	ns
Media catena	20,46 \pm 0,08	20,29 \pm 0,96	21,40 \pm 1,05	ns
C18:0	12,55 ^b \pm 0,12	14,89 ^a \pm 0,32	15,87 ^a \pm 1,56	*
C18:1 6t-8t	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,00	ns
C18:1 9t	0,12 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	0,16 \pm 0,05	ns
C18:1 10t	0,12 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	ns
C18:1 11t	1,39 \pm 0,03	1,47 \pm 0,06	1,58 \pm 0,16	ns
C18:1 12t	0,15 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	ns
C18:1 13t-14t	0,47 \pm 0,02	0,50 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	ns
C18:1 9c	24,40 \pm 0,50	24,30 \pm 0,67	26,52 \pm 1,60	ns
C18:1 15t-10c	0,44 \pm 0,18	0,40 \pm 0,23	0,51 \pm 0,13	ns
C18:1 11 c	1,80 \pm 0,12	1,85 \pm 0,04	1,86 \pm 0,11	ns
C18:1 12 c	0,47 \pm 0,02	0,50 \pm 0,01	0,48 \pm 0,06	ns
C18:1 13 c	0,09 \pm 0,04	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	ns
C18:1 14c/16t	0,22 \pm 0,05	0,20 \pm 0,00	0,16 \pm 0,06	ns
C18:2 9 13c/t	0,37 \pm 0,05	0,33 \pm 0,02	0,30 \pm 0,06	ns
C18:2 9c,12t / 8t,12c	0,15 \pm 0,01	0,19 \pm 0,04	0,21 \pm 0,02	ns
C18:1 16c	0,08 ^b \pm 0,01	0,08 ^b \pm 0,02	0,13 ^a \pm 0,01	**
C18:2 9t,12c	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	ns
C18:2 11t,15c	0,15 \pm 0,05	0,14 \pm 0,04	0,16 \pm 0,03	ns
C18:2 9c,12c	15,12 \pm 0,42	15,20 \pm 0,24	14,37 \pm 0,59	ns
C20:0	0,13 \pm 0,00	0,16 \pm 0,02	0,15 \pm 0,04	ns
C20:1 11c	0,14 \pm 0,01	0,14 \pm 0,04	0,17 \pm 0,01	ns
C18:3 9c,12c,15c	2,97 \pm 0,13	2,98 \pm 0,17	2,59 \pm 0,36	ns

Tabella 7.13 b - Profilo acidico dei Fosfolipidi separati dalla carne d'agnello, espresso in % rispetto al totale dei FAME (media \pm ds), in funzione della natura del metodo di estrazione.

Fosfolipidi				
Metodo di estrazione	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
CLA 9c,11t	1,23 \pm 0,02	1,15 \pm 0,13	0,90 \pm 0,19	ns
CLA 10t,12c+c21:0	0,07 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	ns
CLA 11t,13c	0,10 \pm 0,04	0,13 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02	ns
CLA 11t,13t	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	ns
CLA 9t,11t	0,22 \pm 0,01	0,24 \pm 0,06	0,38 \pm 0,24	ns
C20:2 11c,14c	0,10 \pm 0,05	0,07 \pm 0,06	0,12 \pm 0,02	ns
C20:3 5c,8c,11c	0,09 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,03	ns
C22:0	1,48 \pm 0,02	1,65 \pm 0,10	1,38 \pm 0,25	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	6,76 \pm 0,07	5,87 \pm 0,49	4,71 \pm 1,46	ns
C23:0	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,09 \pm 0,03	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	1,20 ^a \pm 0,08	0,92 ^a \pm 0,02	0,54 ^b \pm 0,21	**
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	4,03 ^a \pm 0,07	3,28 ^{ab} \pm 0,28	2,39 ^b \pm 0,89	*
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	2,49 \pm 0,16	1,93 \pm 0,23	1,46 \pm 0,76	ns
Lunga catena	79,35 \pm 0,17	79,42 \pm 0,82	78,49 \pm 1,07	ns
SFA	32,72 ^b \pm 0,06	35,42 ^{ab} \pm 0,68	37,01 ^a \pm 2,11	*
MUFA	32,13 \pm 0,56	31,90 \pm 0,65	34,41 \pm 2,11	ns
PUFA	35,15 ^a \pm 0,61	32,67 ^{ab} \pm 1,31	28,58 ^b \pm 4,11	*
UFA	67,28 ^a \pm 0,06	64,58 ^{ab} \pm 0,68	62,99 ^b \pm 2,11	*
$\Sigma\omega 3$	10,68 ^a \pm 0,26	9,11 ^{ab} \pm 0,69	6,98 ^b \pm 2,16	*
$\Sigma\omega 6$	22,27 \pm 0,41	21,43 \pm 0,59	19,53 \pm 2,05	ns

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega 3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega 6$ = somma acidi grassi omega 6.

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione. *** P < 0,0001; ** P < 0,001; * P < 0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard

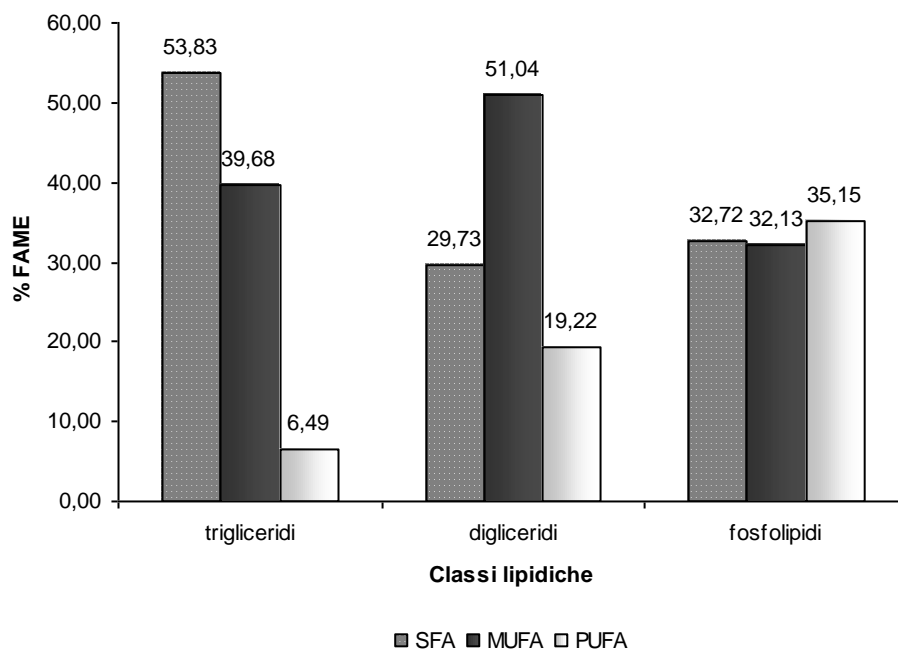


Figura 7.20 - Distribuzione percentuale degli acidi grassi saturi, monoinsaturi e poliinsaturi nei trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi estratti dalla carne d'agnello estratti con il metodo di Hara Radin.

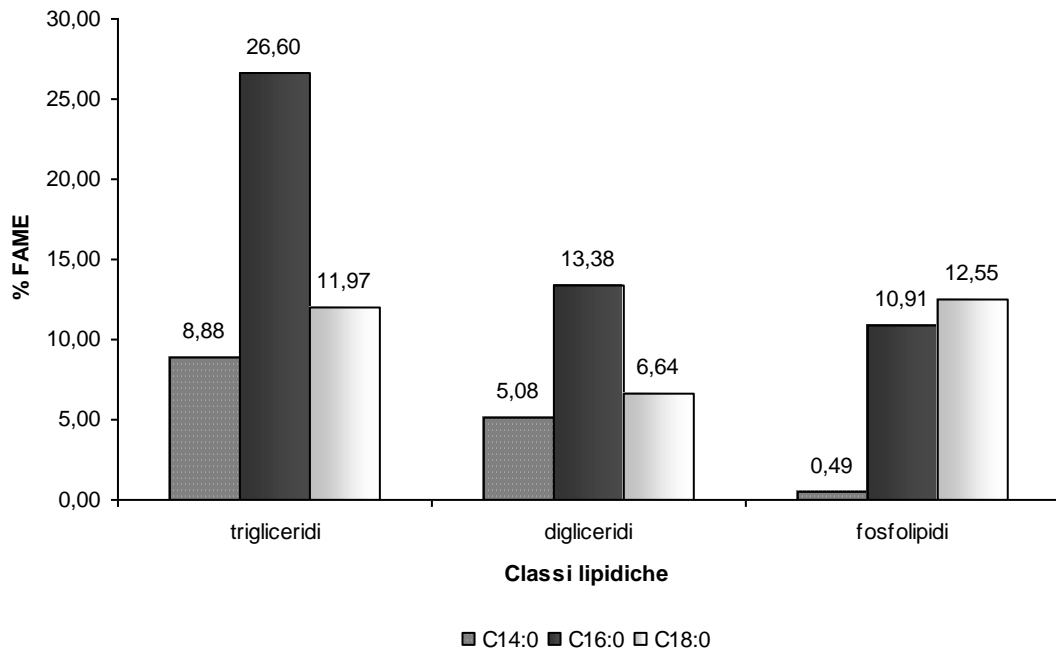


Figura 7.21 - Distribuzione percentuale degli acidi grassi saturi maggiormente rappresentativi nei trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi estratti dalla carne d'agnello con il metodo Hara Radin.

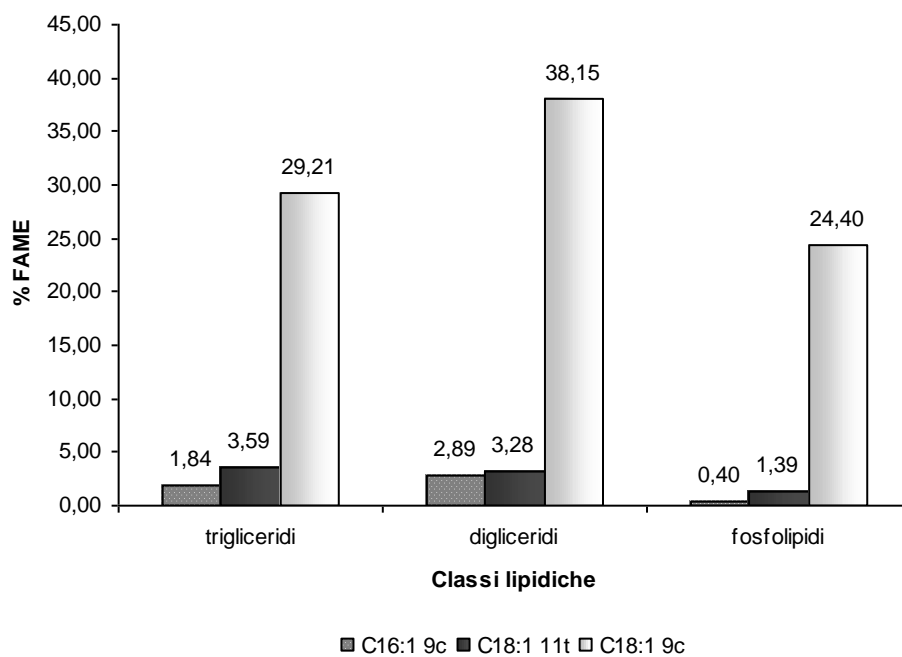


Figura 7.22 - Distribuzione percentuale degli acidi grassi monoinsaturi maggiormente rappresentativi nei trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi estratti dalla carne d'agnello con il metodo di Hara Radin.

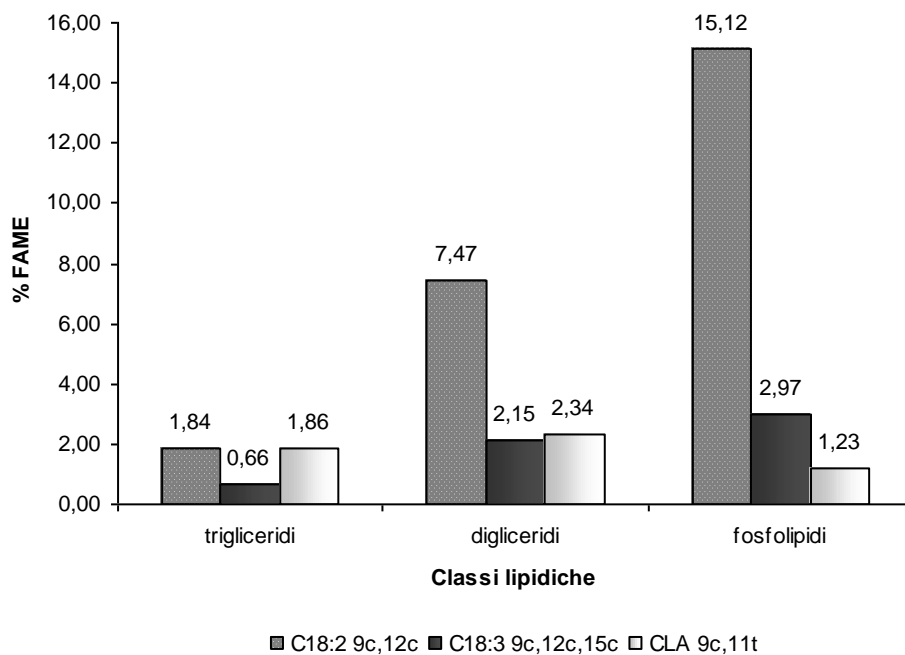


Figura 7.23 - Distribuzione percentuale di alcuni acidi grassi C18 poliinsaturi e del CLA 9c, 11t nei trigliceridi, digliceridi e fosfolipidi estratti dalla carne d'agnello con il metodo di Hara Radin.

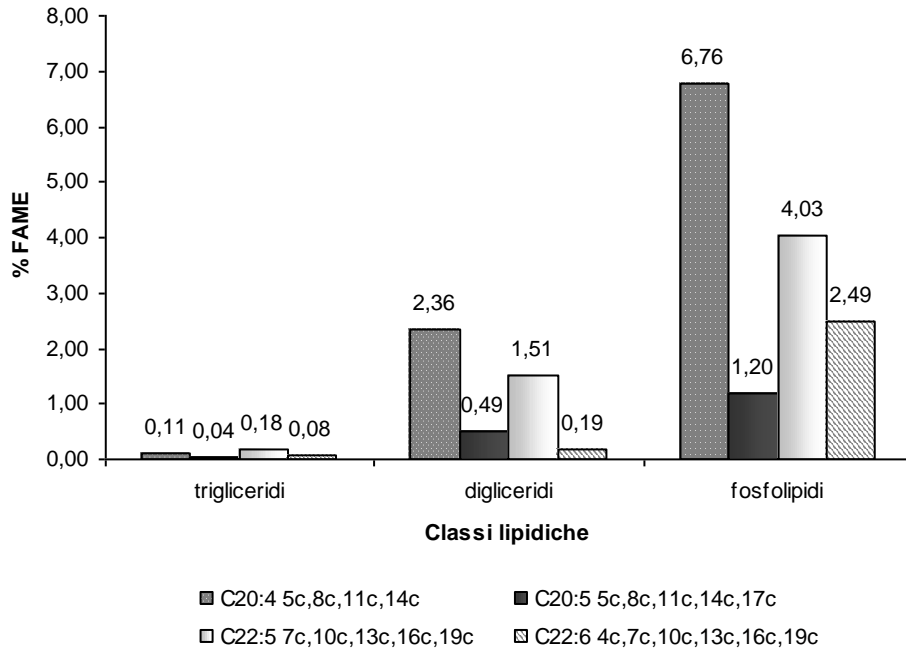


Figura 7.24 - Distribuzione percentuale di alcuni acidi grassi polinsaturi nei trigliceridi digliceridi e fosfolipidi estratti dalla carne d'agnello con il metodo di Hara Radin.

7.8.6 Valutazione quali-quantitativa delle differenti classi di fosfolipidi della carne d'agnello

La quantità e la qualità della frazione polare di un alimento influisce su alcune proprietà tecnologiche (punto di ebollizione e reologia), sulle caratteristiche emulsionanti, sulla stabilità ossidativa e sulla shelf life del prodotto finito, nonché sulle sue proprietà sensoriali e sulla sua qualità nutrizionale. I fosfolipidi avendo una maggior quantità di PUFA rispetto ai lipidi neutri, come osservato precedentemente, sono più suscettibili ai processi ossidativi che possono determinare la comparsa di off-flavour e difetti tecnologici sia nel prodotto fresco che nei prodotti stagionati. Horstein *et al.* (1961), hanno osservato che esponendo all'atmosfera i fosfolipidi, estratti dalla carne di maiale e di manzo si sviluppa aroma di rancido più velocemente rispetto a quello sviluppato dai lipidi neutri. Questa elevata facilità dei fosfolipidi all'ossidazione è attribuibile proprio alla elevata concentrazione di acidi grassi polinsaturi che viene inglobata nella loro struttura.

In molte città è stato stimato che circa il 5-8% dei lipidi totali introdotti con l'alimentazione sono fosfolipidi. Attualmente la vendita dei fosfolipidi nel mondo è in aumento in quanto vengono

utilizzati nella produzione di alimenti, a fini cosmetici/farmacologici, e come prodotti chimici (insetticidi). E' stato inoltre osservato che i PL possono esercitare effetti terapeutici su alcuni disordini neurologici e sulla cirrosi epatica (Yanagita, 2003).

L'analisi dei fosfolipidi si basa, di solito, sulla determinazione degli acidi grassi componenti per gascromatografia dopo purificazione della frazione lipidica totale e sulla determinazione delle classi di fosfolipidi per HPLC.

Nel presente lavoro di tesi, per l'identificazione e quantificazione delle differenti classi di fosfolipidi componenti l'estratto lipidico separato tramite SPE, è stata utilizzata la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). L'apparato cromatografico (HPLC) è stato accoppiato con un detector evaporativo a diffusione di luce laser (ELSD). Come già detto nel capitolo 6 questo tipo di detector ha un buon livello di sensibilità ed è compatibile con tutti i gradienti di eluizione.

7.8.6.1 Valutazione delle classi di fosfolipidi separati dai lipidi estratti da carne d'agnello in funzione del metodo di estrazione

Nella Tabella 7.14 sono riportati i dati relativi alla composizione percentuale delle differenti classi fosfolipidiche presenti negli estratti ottenuti da campioni omogenei dello stesso lotto di carne di agnello e separati tramite SPE. In particolare in tabella sono stati riportati i risultati relativi alla media di tre determinazioni per ciascun estratto. In tabella è riportato anche il risultato dell'analisi statistica volta a valutare l'effetto "metodo di estrazione".

Il contenuto delle differenti classi fosfolipidiche quantificate è variato nell'ordine: PC>PE>PI>SPH>PS, indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato.

Come è possibile osservare dai dati riportati in tabella il metodo di estrazione ha invece influenzato significativamente il contenuto di ciascuna classe fosfolipidica ad eccezione della classe della fosfatidilserina. In particolare, pur partendo dallo stesso lotto omogeneo di carne, il metodo Hara-radin ha permesso di ottenere una frazione fosfolipidica caratterizzata da un contenuto percentuale più elevato in fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositolo ed un minore contenuto in fosfatidilcolina e sfingomieline rispetto agli altri due metodi di estrazione Folch e Folch modificato. Questa differente capacità di estrazione dei tre metodi è probabilmente attribuibile alla loro differente polarità. La miscela esano/isopropanolo (metodo Hara Radin) meno polare, infatti, della miscela cloroformio/metanolo (metodo Folch e Folch modificato) ha consentito di estrarre una quantità superiore di fosfolipidi meno polari (PE e PI) rispetto ai fosfolipidi più polari (PC e SPH) estratti invece con una maggiore efficienza dagli altri due metodi. Attualmente in letteratura non ci sono lavori riguardanti la composizione delle classi di fosfolipidi in carne d'agnello ma solo su altri tipi di carne ed in particolare carne di manzo (Melton *et al.*,

1992, Caboni *et al.*, 1994), carne di maiale (borselli *et al.*, 2008) e carne d'anatra (Wang *et al.* 2009). In tutti questi tipi di carne le classi di fosfolipidi maggiormente presenti sono la fosfatidiletanolamina e la fosfatidilcolina.

Nelle Figure 7.25-7.27 sono riportati i cromatogrammi delle classi di fosfolipidi determinati nella frazione lipidica della carne d'agnello estratta con i tre metodi alternativi.

Tabella 7.14 – Composizione percentuale delle classi fosfolipidiche, separate dalla frazione lipidica estratta da campioni omogenei dello stesso lotto di carne d'agnello, (media \pm ds), in funzione della natura del metodo di estrazione.

metodo di estrazione	Hara-Radin	Folch	Folch modificato	Effetto
PE	30,52 ^a \pm 1,37	13,89 ^b \pm 7,99	10,93 ^b \pm 6,13	*
PI	15,49 ^a \pm 0,71	8,93 ^b \pm 1,84	8,94 ^b \pm 3,71	*
PS	1,02 \pm 0,07	2,04 \pm 0,84	2,13 \pm 0,44	ns
PC	51,00 ^b \pm 2,14	70,72 ^a \pm 9,71	73,02 ^a \pm 9,04	*
SPH	1,98 ^b \pm 0,24	4,42 ^a \pm 0,91	4,97 ^a \pm 1,28	*

PE = fosfatidiletanolamina; PI = fosfatidilinositolo; PS = fosfatidilserina; PC = fosfatidilcolina; SPH = sfingomieline

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al metodo di estrazione. *** P < 0,0001; ** P < 0,001; * P < 0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard

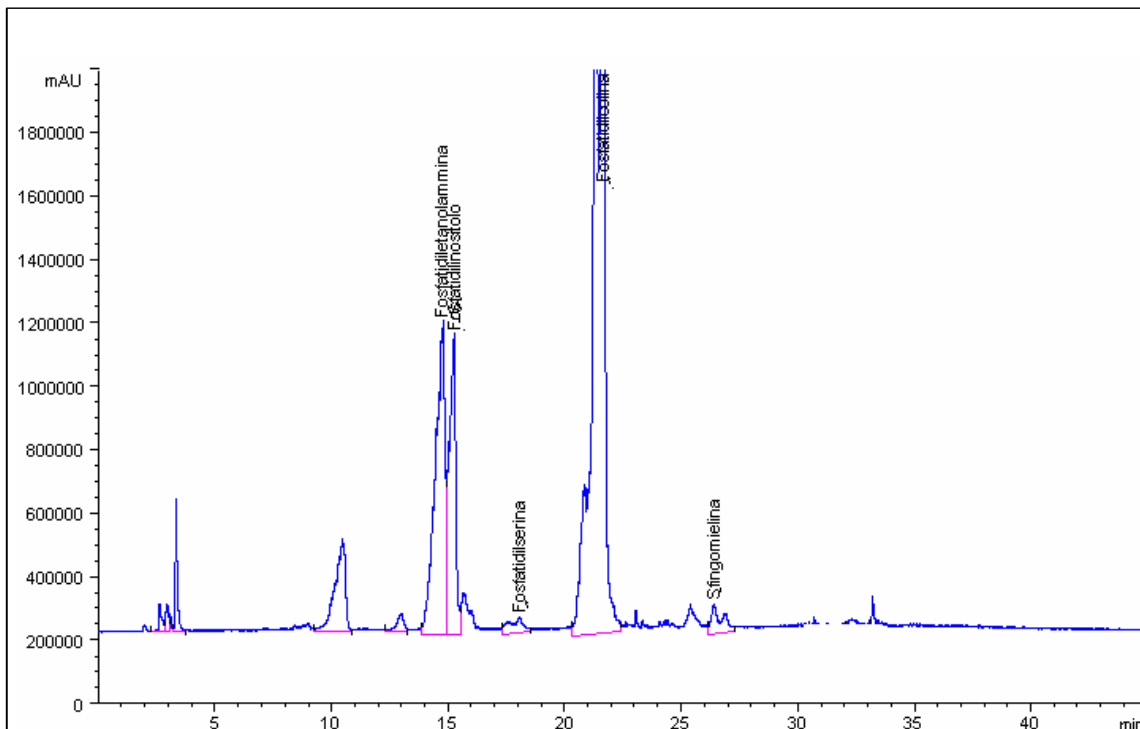


Figura 7.25 - Cromatogramma dei fosfolipidi presenti nella frazione lipidica della carne d'agnello estratta con il metodo Hara-Radin.

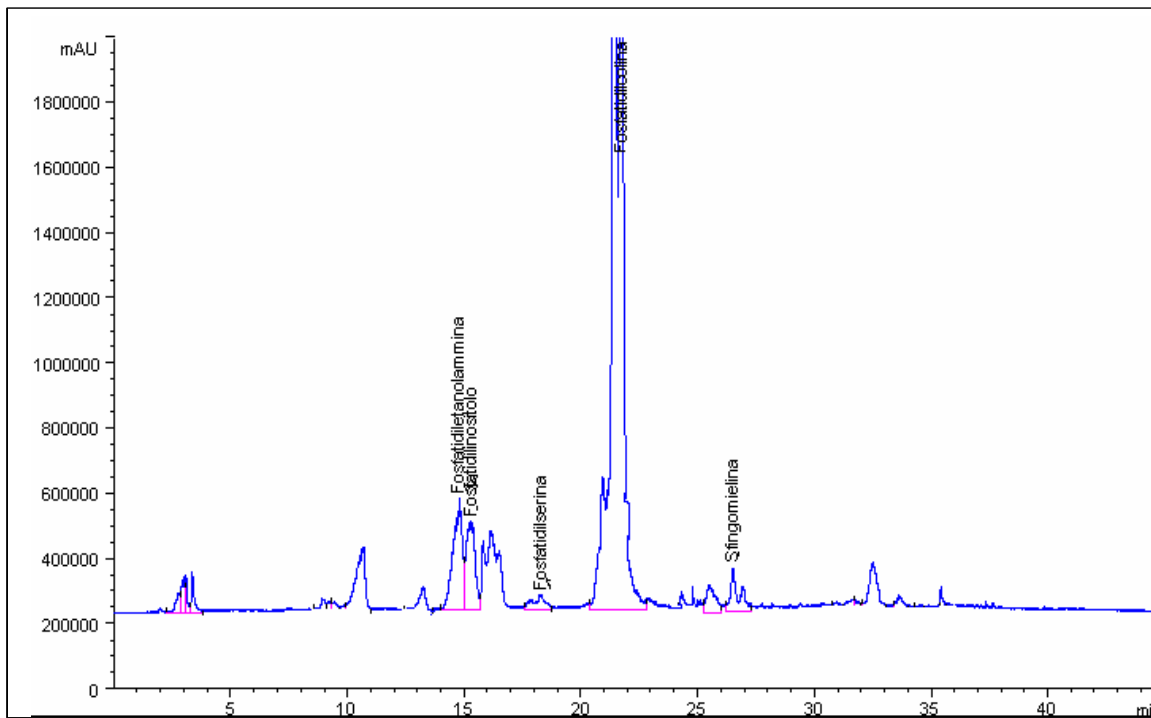


Figura 7.26 - Cromatogramma dei fosfolipidi presenti nella frazione lipidica della carne d'agnello estratta con il metodo Folch.

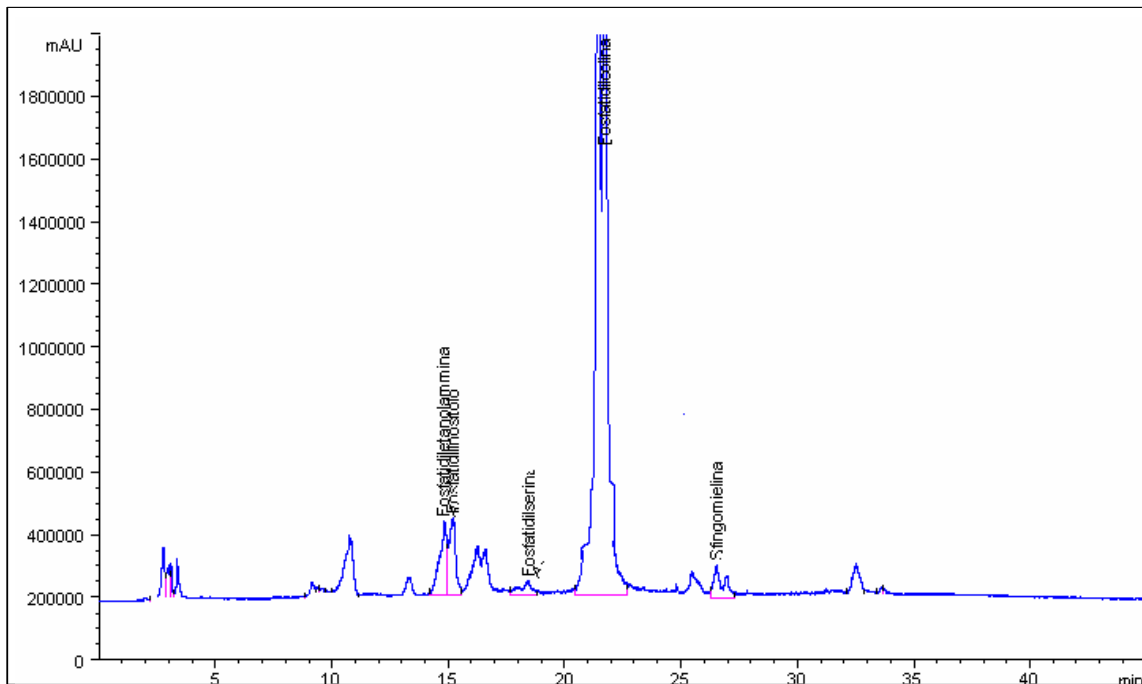


Figura 7.27 - Cromatogramma dei fosfolipidi presenti nella frazione lipidica della carne d'agnello estratta con il metodo Folch modificato.

7.9 Conclusioni

L'obiettivo del primo contributo sperimentale del presente lavoro di tesi è stato quello di testare sulla carne d'agnello, alcune tra le principali metodologie di estrazione della materia grassa: il cosiddetto metodo di riferimento e diversi metodi alternativi. I termini della comparazione erano rivolti soprattutto a valutare la capacità di estrazione dei lipidi totali, la quantità e la composizione acidica delle varie classi lipidiche estratte, nonché la determinazione delle differenti classi di fosfolipidi. Le procedure di estrazione sono state applicate ad aliquote omogenee dello stesso lotto di carne d'agnello.

L'estrema complessità della problematica affrontata è stata pienamente confermata dai dati sperimentali ottenuti. Essi hanno confermato che non esiste, in generale un metodo di estrazione "migliore" degli altri, ma tutti hanno punti di forza che li rendono indispensabili in certi casi, e punti di debolezza che ne precludono del tutto l'adozione ove gli obiettivi finali siano altri.

Ad esempio, l'efficienza di estrazione della frazione lipidica totale varia fortemente a seconda del metodo utilizzato in funzione di parametri operativi di primaria importanza, quali l'impiego di certi solventi, lo sviluppo di calore, l'adozione di particolari metodologie operative. In particolare, le maggiori rese in frazione lipidica vengono garantite dai metodi Folch e Folch modificato.

Rispetto al metodo di riferimento, il metodo di Folch e Folch modificato offrono il vantaggio di essere sicuramente più veloci, d'altra parte, però, prevedono l'utilizzo di quantità elevate di solventi organici con il conseguente problema legato al loro smaltimento. Il metodo Hara-Radin, pur avendo un potere estraente leggermente inferiore rispetto al metodo Folch e Folch modificato, ha comunque il vantaggio di utilizzare sia una minore quantità di solvente sia una miscela di estrazione (esano/isopropanolo) meno tossica rispetto alla miscela estraente costituita da cloroformio/metanolo.

E' stata inoltre messa a punto una metodologia qualitativa (TLC) e quantitativa (SPE) per la separazione cromatografica dei lipidi in classi neutre (trigliceridi, digliceridi, monogliceridi) e polari (fosfolipidi). Indipendentemente dal metodo utilizzato, la tecnica cromatografica TLC ha evidenziato la medesima capacità di estrazione di tutti e tre i metodi utilizzati.

Per quanto riguarda invece la separazione cromatografica su fase solida SPE, questa ha permesso di evidenziare che la frazione lipidica estratta con il metodo Hara-Radin contiene una percentuale significativamente più alta in trigliceridi e mono e digliceridi rispetto agli altri due metodi. I due metodi Folch e Folch modificato hanno invece permesso di ottenere un estratto lipidico caratterizzato da un contenuto in fosfolipidi tendenzialmente più elevato rispetto al metodo Hara-Radin. Questa differente capacità estrattiva è imputabile alla differente polarità della miscela estraente utilizzata. Il metodo Hara Radin, che prevede l'utilizzo della miscela esano/isopropanolo,

meno polare della miscela cloroformio/metanolo (Folch e Folch modificato), consente di estrarre una quantità maggiore di lipidi apolari (trigliceridi e di gliceridi) rispetto ai più polari fosfolipidi.

Il metodo Hara-Radin consente inoltre di ottenere un estratto significativamente più ricco in componenti lipidici, e meno contaminato dalla presenza di impurezze o di composti liposolubili. E' noto infatti in letteratura che l'adozione di una miscela quale esano/isopropanolo permette di ottenere estratti lipidici caratterizzati da una ridotta quantità di contaminanti non lipidici e di materiale proteo-lipidico denaturato (Hara and Radin, 1978; Wolff *et al.*, 1989) .

Inoltre presumibilmente, i lavaggi della fase organica con una soluzione acquosa di Na₂SO₄, previsti dal metodo Hara Radin, potrebbero aver favorito l'eliminazione di alcune sostanze organiche polari, quali steroli, fitosteroli, alcoli e pigmenti, nella fase acquosa polare e quindi conseguentemente il recupero di un estratto organico più ricco in componenti lipidici.

A differenza di quanto successo nella separazione cromatografica SPE, non è stato riscontrato in generale un effetto ascrivibile alla natura del metodo di estrazione utilizzato sulla composizione acidica dei trigliceridi ,digliceridi, e fosfolipidi.

Per quanto concerne la composizione % delle differenti classi di fosfolipidi, presenti negli estratti da carne è stato riscontrato una maggiore percentuale di PE e PI ed un minor contenuto in PC e SPH nei campioni estratti con il metodo Hara-Radin, rispetto agli altri due metodi (Folch e Folch modificato), conseguentemente alla differente polarità della miscela estraente dei tre metodi considerati.

Relativamente alla composizione lipidica dei fosfolipidi estratti e indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato, nei fosfolipidi è stata osservata una certa tendenza all'accumulo di alcuni acidi grassi a lunga catena e con uno o più siti di insaturazione, in particolare il C18:2 9c 12c, C18:3 9c 12c 15c , C20:4 5c, 8c, 11c, 14c, C20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c, C22:5 7c, 10c, 13c, 16c, 19c, C22:6 4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c. L'elevata concentrazione di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena nei fosfolipidi nella carne è stata rimarcata anche da altri Autori e pare sia una conseguenza del differente ed importante ruolo strutturale svolto dai fosfolipidi rispetto alle classi neutre (trigliceridi e digliceridi). La particolare composizione acidica dei fosfolipidi conferisce inoltre agli stessi importanti attività biologiche è nota, infatti, l'abilità di queste sostanze nel ridurre i livelli plasmatici di colesterolo (Eckhardt *et al.* 2002), migliorare le funzioni cerebrali (Pepeu *et al.* 1996). Essi hanno inoltre proprietà antiossidanti (Saito and Ishihara, 1997), batteriostatiche (Sprong *et al.* 2002) e anticancerogene, queste ultime attribuite in particolare alla porzione sfingolipidica (Vesper *et al.* 1999).

Capitolo 8

II° Contributo sperimentale

8.1 Introduzione

In Sardegna la carne di agnello da latte, di razza Sarda è un prodotto tipico e tradizionale, che ha ottenuto l'identificazione IGP nel 2001, come "Agnello di Sardegna" (Reg. CE n. 138/01). Analogamente a quanto accade in altri paesi del bacino del Mediterraneo, gli agnelli di razza sarda, sono allevati al pascolo a seguito delle loro madri e, spesso, vengono macellati ad un peso ridotto (peso della carcassa a freddo di 7 Kg, come da disciplinare) e a circa un mese di età, dopo aver consumato esclusivamente latte di pecora di razza Sarda. L'agnello da latte è un prodotto tipico della zootecnia sarda consumato in particolare nel periodo natalizio e pasquale, e circa 1.7 milioni di agnelli vengono macellati ogni anno (Carcangiu & Vacca, 2005).

Attualmente, per le aziende ovine in Sardegna, l' "Agnello di Sardegna" IGP è una produzione, seppur importante secondaria rispetto alla produzione di latte. La sempre minore remuneratività del prezzo del latte, negli ultimi anni, ha indotto il settore a valorizzare maggiormente la carne d'agnello. In quest'ottica si sta cercando di attuare una diversificazione della sua produzione. Per questo motivo, accanto alla tradizionale produzione dell'agnello da latte, si sta cercando di incrementare la produzione sia dell'agnello leggero (peso carcassa a freddo 7-10 kg, Disciplinare di produzione I.G.P. "Agnello di Sardegna"), sia dell'agnello da taglio (peso carcassa a freddo 10-13 kg, Disciplinare di produzione I.G.P. "Agnello di Sardegna"). In entrambi i casi, il disciplinare ammette che gli animali provengano sia da pecore di razza Sarda in purezza che dall'incrocio, di prima generazione (F1), con razze da carne: Ile de France e Berrichon du Cher o altre razze da carne altamente specializzate e sperimentate. Poiché la valorizzazione di un prodotto alimentare non può prescindere dalla sua caratterizzazione in particolare riguardo alle proprietà nutrizionali e nutraceutiche, negli ultimi anni è aumentata in tal senso l'attenzione dei ricercatori relativamente alla carne dell' "Agnello di Sardegna" (Vacca *et al.*, 2008, Spada *et al.*, 2009).

Gli obiettivi del secondo contributo sperimentale del presente lavoro di tesi sono stati:

1) valutare l'effetto della razza su alcune caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli leggeri di razza Sarda (gruppo Sarda) e incrocio (F1) razza Sarda x Ile de France (gruppo Francese).

2) valutare l'effetto dell'alimentazione su alcune caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli da taglio incrocio (F1) razza Sarda x Ile de France.

8.2 Disciplinare di produzione “Agnello di Sardegna IGP”

L'agnello di Sardegna è l'unico prodotto alimentare isolano che gode dell' Indicazione Geografica Protetta IGP (Reg. CE N° 138/01) e tutto il territorio della regione e' idoneo ad ottenere un prodotto con caratteristiche qualitative rispondenti al disciplinare di produzione. Secondo tale disciplinare gli agnelli devono essere allevati in un ambiente del tutto naturale, caratterizzato da ampi spazi esposti a forte insolazione, ai venti ed al clima della Sardegna, che risponde perfettamente alle esigenze tipiche della specie; l'allevamento avviene prevalentemente allo stato brado; solo nel periodo invernale e nel corso della notte gli agnelli vengono ricoverati in idonee strutture dotate di condizioni adeguate per quanto concerne il ricambio di aria, l'illuminazione, la pavimentazione, gli interventi sanitari ed i controlli.

L'agnello non deve essere soggetto a forzature alimentari, a stress ambientali e/o a sofisticazioni ormonali; deve essere nutrito esclusivamente con latte materno (nel tipo "da latte") e con l'integrazione al pascolo di alimenti naturali ed essenze spontanee peculiari dell'habitat caratteristico dell'isola di Sardegna.

Sono previste tre diverse tipologie di prodotto che differiscono per le tecniche di allevamento e per le caratteristiche al consumo:

- ✓ Agnello "da latte" (sino ai 7 kg): nato ed allevato in Sardegna, proveniente da pecore di razza sarda allevate in purezza, alimentato con solo latte materno (allattamento naturale), macellato a norma di legge;
- ✓ Agnello "leggero" (7-10 kg): Nato ed allevato in Sardegna, proveniente da pecore di razza sarda o mediante incroci di prima generazione con razze da carne – Ile De France e Berrichon Du Cher, o altre razze da carne altamente specializzate e sperimentate, alimentato con latte materno integrato con alimenti naturali (foraggi e cereali) freschi e/o essiccati; macellato a norma di legge;
- ✓ Agnello "da taglio" (10-13 kg): nato ed allevato in Sardegna, proveniente da pecore di razza sarda o mediante incroci di prima generazione con razze da carne – Ile De France e Berrichon Du Cher, o altre razze da carne altamente specializzate e sperimentate,

alimentato con alimenti naturali (foraggi e cereali) freschi e/o essiccati; macellato a norma di legge.

Descrizione del prodotto

Le tre tipologie di agnello sopra citate, per aver diritto alla Indicazione Geografica Protetta (I.G.P.), devono rispondere alle seguenti caratteristiche:

a) Agnello di Sardegna “da latte” (sino ai 7 Kg.):

1. peso carcassa a freddo, senza pelle e con testa e corata;
2. colore della carne: rosa chiaro (il rilievo va fatto sui muscoli interni della parete addominale); consistenza delle masse muscolari: solida (assenza di sierosità);
3. colore del grasso: bianco;
4. copertura adiposa: moderatamente coperta la superficie esterna della carcassa, coperti, ma non eccessivamente, i reni;
5. consistenza del grasso: solido (il rilievo va fatto sulla massa adiposa che sovrasta l'attacco della coda, ed a temperatura ambiente);

b) Agnello "leggero" (7-10 kg):

1. peso carcassa a freddo, senza pelle con testa e corata;
2. colore della carne: rosa chiaro o rosa;
3. consistenza delle masse muscolari: solida (assenza di sierosità);
4. colore del grasso: bianco;
5. copertura adiposa: moderatamente coperta la superficie esterna della carcassa; coperti, ma non eccessivamente, i reni;
6. consistenza del grasso: solido; (il rilievo va fatto sulla massa adiposa che sovrasta l'attacco della coda, ed a temperatura ambiente di 18 -20 gradi C).

c) Agnello “da taglio” (10 - 13 kg):

1. peso carcassa a freddo, senza pelle e con testa e corata;
2. colore della carne: rosa chiaro o rosa;
3. consistenza delle masse muscolari: solida (assenza di sierosità);
4. colore del grasso: bianco o bianco paglierino;
5. copertura adiposa: moderatamente coperta la superficie esterna della carcassa; coperti, ma non eccessivamente, i reni;
6. consistenza del grasso: solido (il rilievo va fatto sulla massa adiposa che sovrasta l'attacco della coda, ed a temperatura ambiente di 18 -20 gradi C).

La macellazione deve avvenire entro 24 ore dal conferimento al mattatoio, mediante recisione netta della vena giugulare, si procede poi allo spellamento e contemporanea recisione delle zampe anteriori e posteriori. Successivamente la carcassa dovrà essere liberata dell'apparato intestinale ivi compresa l'asportazione della cistifellea dal fegato il quale deve restare integro all'interno della carcassa unitamente alla coratella.

Nella fase successiva la carcassa dovrà essere condizionata secondo le tradizionali procedure con il peritoneo aderente alla carcassa.

L'agnello designato dall'Indicazione Geografica Protetta "Agnello di Sardegna", può essere immesso al consumo intero e/o porzionato secondo i seguenti tagli:

- intero;
- mezzena: ricavata mediante il taglio sagittale della carcassa in parti simmetriche;
- quarto anteriore e posteriore;
- testa e coratella;

per l'Agnello leggero e l'Agnello da taglio sono previsti inoltre :

- culotta,:comprendente le due cosce intere compresa la "sella" (destra e sinistra);
- sella inglese: composta dalla parte superiore dorsale, comprendente le due ultime coste e le pareti addominali;
- carré:comprendente parte dorsale superiore – anteriore;
- groppa:comprende i due mezzi roast-beef;
- casco: comprende le spalle, le costole basse, il collo e le costole alte della parte anteriore;
- farfalla: comprende le due spalle unite al collo;
- cosciotto: comprende la gamba, la coscia, la regione ileosacrale e la parte posteriore dei lombi;
- cosciotto accorciato:comprende le membra posteriori della regione ileosacrale e la parte posteriore di lombi.

E altri tagli quali: sella, filetto, carrè coperto, carrè scoperto spalla, colletto, cotoletta alte.

Nel disciplinare di produzione sono, inoltre, indicate le caratteristiche che il consumatore deve cercare e ritrovare nel prodotto certificato con riferimento a particolari qualità organolettiche e nutrizionali.

8.3 Materiali e Metodi

La prova è stata condotta presso l'azienda sperimentale di Bonassai del Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali (DiRPA).

8.3.1 Conduzione e alimentazione delle pecore durante la prova sperimentale

Cinquantatrè pecore di razza Sarda sono state avviate alla monta nel mese di giugno, ventidue sono state incrociate con un ariete di razza Ile de France e le rimanenti trentuno pecore con un ariete di razza Sarda. Durante la gravidanza, le pecore sono state gestite come gruppo unico sia prima che dopo il parto, pascolavano per 7 ore al giorno su un pascolo misto di leguminose e graminacee, ricevendo un'integrazione di fieno di loglio e concentrato commerciale rispettivamente pari a 0.3 kg/capo/giorno e 0.4 kg/capo/giorno fino al parto. I parti si sono verificati tra l'8 novembre e il 7 dicembre. Dopo il parto le pecore sono state alimentate con fieno di medica (0.5 kg/capo/giorno) e concentrato commerciale (0.5 kg/capo/giorno) e pascolavano per 6 ore al giorno su prati misti di graminacee e leguminose con una disponibilità media di 1,4t SS/ha.

In Tabella 8.1 è riportata la composizione in acidi grassi del pascolo e dell'integrazione data agli animali durante tutta la prova.

Le pecore hanno allattato gli agnelli fino al raggiungimento di un peso vivo ottimale di macellazione/svezzamento (10-14 kg). Durante tutto il periodo della prova, il latte materno è stato campionato settimanalmente e sottoposto presso il laboratorio di chimica del DIRPA alle seguenti analisi:

- Grasso, proteine, lattosio, urea e cellule somatiche (MILKOSCAN);
- Determinazione degli acidi grassi totali (AGT)
 - Estrazione della frazione lipidica (Murphy *et al.*, 1990);
 - Transmetilazione in ambiente basico (FIL-IDF 182 1999), (capitolo 7 paragrafo 7.5.1.1);
 - Separazione e quantificazione degli AGT (capitolo 7 paragrafo 7.5.2).

Tabella 8.1 – Composizione acidica del pascolo, del fieno e del concentrato commerciale.

Fame (%)	Pascolo			Integrazione	
	crisantemo	loglio	medica polimorfa	Fieno	Concentrato commerciale
C16:0	17,35	10,96	22,01	40,97	22,19
C18:0	3,25	0,97	4,43	11,03	3,53
C18:1 9c	2,78	1,19	3,28	8,31	23,69
C18:2 9c, 12c	19,56	11,57	14,27	16,47	46,51
C18:3 9c, 12c, 15c	57,06	75,30	56,01	23,22	4,08

8.3.2 Parte sperimentale – obiettivo 1. Effetto della razza sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli leggeri di razza Sarda (gruppo Sarda) e incrocio (F1) razza Sarda x Ile de France (gruppo Francese)

Per la produzione degli agnelli leggeri, subito dopo la nascita, gli animali sono stati suddivisi in due gruppi costituiti da 7 capi ciascuno rispettivamente di agnelli di razza Sarda (gruppo Sarda) e agnelli incrociati F1 (razza Sarda x Ile de France, gruppo Francese). Tutti gli agnelli erano omogenei per età, peso vivo, sesso e gemellarità.

Gli agnelli dei due gruppi, che seguivano le madri al pascolo, venivano alimentati esclusivamente con latte materno. Al raggiungimento del peso vivo di circa 14-20 Kg (corrispondente al peso a freddo della carcassa di 7-10 kg), così come previsto dal disciplinare di produzione dell'agnello leggero, (I.G.P., Agnello di Sardegna), gli agnelli dei due gruppi sono stati macellati. Da ciascuna carcassa, a 24h dalla macellazione è stato prelevato il muscolo *Longissimus dorsi* (Figura 8.1), confezionato in buste singole debitamente etichettate e trasportato, in condizioni di refrigerazione, presso il laboratorio di chimica del DIRPA. I campioni di muscolo sono stati, quindi, macinati fino a completa omogeneizzazione e suddivisi in aliquote di circa 50g ciascuna. Ogni aliquota è stata confezionata sotto vuoto e congelata a circa -20°C. Al momento dell'analisi i campioni venivano scongelati e, nell'arco della stessa giornata, si procedeva alla determinazione dei seguenti parametri chimico fisici e nutrizionali:

- Sostanza secca e ceneri (metodo AOAC1990: 945.46);
- Estratto etereo (metodo Hara-Radin), (capitolo 7 paragrafo 7.2.1.4);
- Proteine (metodo Kjeldahl , AOAC,1990, n.981,10);
- Determinazione degli acidi grassi totali (AGT):

- *Estrazione della frazione lipidica* (metodo Hara-Radin) (capitolo 7 paragrafo 7.2.1.4);
- *Transesterificazione in ambiente acido* (Chin et al. 1992), (capitolo 7 paragrafo 7.5.1.2);
- *Separazione e quantificazione degli AGT* (capitolo 7 paragrafo 7.5.2).



Figura 8.1 - Carcasse dopo il prelievo dei muscoli *Longissimus dorsi*.

8.3.3 Parte Sperimentale – obiettivo 2. Effetto dell'alimentazione sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli da taglio incrocio (F1) razza Sarda x Ile de France

Per la produzione degli agnelli da taglio, gli animali incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France) al raggiungimento di un peso vivo pari a 10-14 kg sono stati suddivisi in tre gruppi (6 capi ciascuno) omogenei per età, peso vivo, sesso e gemellarità. Gli animali appartenenti ai tre gruppi sono stati quindi sottoposti a tre differenti regimi alimentari come descritti di seguito:

- Gruppo LATTE: agnelli allattati dalle madri;
- Gruppo STALLA: alimentazione in stalla con fieno e concentrato;
- Gruppo ERBA: alimentazione al pascolo (solo erba), pascolavano tutto il giorno un erbaio di loglio italico.

Nella tabella 8.2 è riportata la composizione, corrispondente alla media di un prelievo a settimana, in acidi grassi del latte materno con cui sono stati alimentati gli agnelli appartenenti al gruppo LATTE. Nella Tabella 8.3 è riportata la composizione acidica degli alimenti offerti agli animali degli altri due gruppi (STALLA ed ERBA).

Dopo il raggiungimento del peso vivo di circa 20-26 kg (corrispondente al peso a freddo della carcassa di 10-13 kg, secondo il disciplinare di produzione dell'agnello da taglio, I.G.P., Agnello di Sardegna) tutti gli agnelli sono stati macellati. Da ogni carcassa a 24h dalla macellazione è stato prelevato il muscolo *Longissimus dorsi*. I campioni sono stati immediatamente confezionati in buste singole debitamente etichettate e trasportati, in condizioni di refrigerazione, presso il laboratorio di chimica del DIRPA dove sono stati macinati fino a completa omogeneizzazione e suddivisi in aliquote di circa 50 g ciascuna. Ogni aliquota è stata confezionata sotto vuoto e congelata a circa 20°C. Al momento dell'analisi i campioni venivano scongelati e, nell'arco della stessa giornata, si procedeva alla determinazione dei seguenti parametri chimico fisici e nutrizionali:

- Sostanza secca e ceneri (metodo AOAC1990: 945.46);
- Estratto etereo (metodo Hara-Radin), (capitolo 7 paragrafo 7.2.1.4);
- Proteine (metodo Kjeldahl , AOAC,1990, n.981,10);
- Determinazione degli acidi grassi totali (AGT):
 - Estrazione della frazione lipidica (metodo Hara-Radin) (capitolo 7 paragrafo 7.2.1.4);
 - Transesterificazione in ambiente acido (Chin et al. 1992), (capitolo 7 paragrafo 7.5.1.2);
 - Separazione e quantificazione degli AGT (capitolo 7 paragrafo 7.5.2).

Tabella 8.2 Profilo acidico (media \pm ds) del latte materno con cui sono stati alimentati gli agnelli appartenenti al gruppo LATTE .

Fame (%)	Latte materno
C4:0	5,40 \pm 0,53
C10:0	7,74 \pm 3,01
Corta catena	13,14 \pm 3,04
C12:0	4,44 \pm 1,42
C14:0	10,61 \pm 2,10
C16:0	24,73 \pm 1,80
Media catena	39,78 \pm 4,59
C18:0	13,78 \pm 2,65
C18:1 11t	3,54 \pm 1,02
C18:1 9c	23,12 \pm 5,95
C18:2 9c, 12c	2,75 \pm 0,30
C18:3 9c, 12c, 15c	1,64 \pm 0,21
CLA 9c, 11t	1,57 \pm 0,40
CLA 11t, 13c	0,10 \pm 0,02
C20:4 5c, 8c, 11c, 14c	0,13 \pm 0,02
C20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c	0,12 \pm 0,02
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	0,20 \pm 0,02
C22:6 4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c	0,13 \pm 0,02
Lunga catena	47,07 \pm 7,30
SFA	66,70 \pm 5,49
MUFA	26,66 \pm 5,59
PUFA	6,63 \pm 0,66
UFA	33,30 \pm 5,49
$\Sigma\omega 3$	2,09 \pm 0,23
$\Sigma\omega 6$	2,87 \pm 0,31

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega 3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega 6$ = somma acidi grassi omega 6. ds = stima della deviazione standard.

Tabella 8.3 – Composizione acidica degli alimenti offerti agli agnelli dei gruppi Stalla ed Erba.

Gruppo (% FAME)	Stalla		Erba
	Fieno	Concentrato	Loglio
C16:0	45,27	22,19	11,21
C18:0	7,42	3,53	0,96
C18:1 9c	5,25	23,69	0,65
C18:2 9c,12c	19,96	46,51	8,61
C18:3 9c,12c,15c	22,10	4,08	78,57

8.3.3.1 Analisi statistica

Il trattamento statistico dei dati è stato fatto utilizzando la procedura GLM (General Linear Model) ($\alpha = 0.05$) di Minitab statistical package release 12 (Minitab Inc., USA). Il confronto fra le medie è stato fatto utilizzando il test di Tukey.

Nell'analisi statistica relativa alla composizione acidica del latte, con cui sono stati alimentati gli agnelli leggeri, è stata valutata l'influenza del fattore "periodo" (5 livelli).

Nell'analisi statistica relativa alla composizione acidica del latte, con cui sono stati alimentati gli agnelli da taglio gruppo LATTE, è stata valutata l'influenza del fattore "periodo" (9 livelli).

Nell'analisi statistica relativa alla composizione chimica e al profilo acidico della carne degli agnelli leggeri dei gruppi Sarda e Francese è stata valutata l'influenza del fattore "razza" (2 livelli).

Nell'analisi statistica relativa alla composizione chimica e al profilo acidico della carne degli agnelli da taglio dei gruppi LATTE, STALLA ed ERBA è stata valutata l'influenza del fattore "alimentazione" (3 livelli).

8.4 Risultati e discussione

8.4.1 I° obiettivo - Effetto della razza sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli “leggeri” di razza Sarda (gruppo Sarda) e incrocio F1 razza Sarda x Ile de France (gruppo Francese)

8.4.1.1 *Produzione e composizione chimica del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli “leggeri”*

La composizione del latte varia da specie a specie soprattutto in rapporto all'habitat naturale. Diversi sono i fattori che possono influenzarla, in maniera più o meno marcata, tra questi i più importanti sono:

- età dell'animale;
- alimentazione;
- stato di lattazione;
- tecnica di mungitura;
- stato di salute dell'animale.

Nelle Tabelle 8.4 - 8.5 è riportata la produzione e la composizione chimica del latte individuale delle madri degli agnelli “leggeri” di razza sarda (gruppo Sarda) e il latte delle madre degli agnelli “leggeri” (F1, gruppo Francese) incrocio razza sarda x razza Ile de France, prelevato settimanalmente durante tutto il periodo dell'allattamento e fino alla macellazione degli agnelli. Nelle stesse tabelle è riportato l'effetto ascrivibile al fattore “periodo”. La produzione di latte delle madri degli agnelli leggeri di razza sarda varia significativamente ($P < 0.001$) durante tutto il periodo di prova (10 dicembre -14 gennaio) raggiungendo il valore più alto nella seconda settimana di lattazione e il valore più basso nell'ultima settimana, mentre non ci son differenze significative sui parametri chimici analizzati. Il contenuto di grasso tendenzialmente più elevato nel latte prodotto nella quinta settimana di lattazione è dovuto alla minore produzione latte dello stesso periodo.

Per quanto riguarda la produzione di latte delle madri degli agnelli leggeri incrociati (incrocio sarda* Ile de France) (Tabella 8.5), pur non essendoci una variazione significativamente differente durante tutto il periodo di campionamento l'andamento è simile a quello osservato per il latte delle madri degli agnelli leggeri di razza sarda. La composizione chimica di questo latte è in generale influenzata dal periodo di lattazione ed in particolare per i parametri grasso, lattosio e urea. Anche in questo caso la concentrazione del grasso prelevato nella quinta settimana è significativamente superiore ($P < 0.001$) rispetto a quello determinato nelle altre settimane.

Il tenore in lattosio (Tabella 8.5) è significativamente più elevato ($P < 0.05$) nella quarta settimana, che è quella in cui il latte ha anche il numero minore di cellule somatiche. Da notare sempre nella quarta settimana un valore significativamente elevato ($P < 0.001$) della concentrazione di urea nel latte, segno di elevati apporti proteici. Questi due parametri (lattosio e urea) pur non essendo significativi nel latte delle madri degli agnelli leggeri di razza sarda (Tabella 8.4) seguono lo stesso andamento evidenziato nel latte delle madri degli agnelli leggeri incrociati (sarda * Ile de France).

Tabella 8.4 - Produzione e composizione chimica del latte delle madri degli agnelli “leggeri” di razza sarda monitorata settimanalmente.

settimane	I	II	III	IV	V	SEM	Effetto
Latte (ml/giorno)	748,57 ^{ab}	994,29 ^a	777,14 ^{ab}	728,57 ^{ab}	500,00 ^b	43,69	**
Grasso (%)	4,82	4,58	5,44	4,84	6,44	0,25	ns
Proteine (%)	4,73	4,75	4,86	4,97	4,75	0,10	ns
Lattosio (%)	4,94	4,97	4,87	5,13	4,56	0,08	ns
Cellule somatiche	5254,29	4056,86	4121,57	1552,86	4641,00	1310,52	ns
Urea (%)	55,93	47,16	54,73	63,30	60,37	1,87	ns

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al periodo. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$; NS, non significativo. SEM = Errore Standard della Media.

Tabella 8.5- Produzione e composizione chimica del latte delle madri degli agnelli “leggeri” (incrocio sarda * Ile de France) monitorata settimanalmente.

settimane	I	II	III	IV	V	SEM	Effetto
Latte (ml/giorno)	860,00	950,00	813,33	840,00	663,33	33,34	ns
Grasso (%)	4,08 ^b	4,43 ^b	5,02 ^{ab}	4,26 ^b	6,26 ^a	0,22	**
Proteine (%)	4,57	4,72	4,80	4,86	4,79	0,05	ns
Lattosio (%)	5,20 ^{ab}	5,10 ^{ab}	5,12 ^{ab}	5,37 ^a	4,95 ^b	0,05	*
Cellule somatiche	638,33	1038,67	5598,00	313,17	2811,50	918,38	ns
Urea (%)	58,35 ^{ab}	52,30 ^b	66,95 ^a	67,30 ^a	61,77 ^{ab}	1,61	**

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al periodo. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$; NS, non significativo. SEM = Errore Standard della Media.

8.4.1.2 Profilo acidico del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli "leggeri"

L'alimentazione è tra i fattori che possono influenzare maggiormente la composizione acidica del grasso del latte (Tripaldi *et al.* 1997; Chilliard *et al.* 2001; Chilliard *et al.* 2002; Jensen 2002), sia per gli effetti che induce a livello ormonale, sia perché consente all'organismo dell'animale di rendere disponibili i precursori necessari alla sintesi lipidica (Piva *et al.* 1989).

Per verificare come cambia la composizione in acidi grassi nel latte durante il periodo di allattamento degli agnelli "leggeri" è stata riportata la composizione acidica del latte delle madri durante le settimane di allattamento fino al momento della macellazione degli agnelli.

8.4.1.3 Profilo acidico del latte delle madri degli agnelli "leggeri" di razza Sarda e incrocio F1 (sarda x Ile de France)

In Tabella 8.6 sono riportati i risultati relativi alla composizione acidica del latte delle madri degli agnelli leggeri di razza sarda prelevato durante le 5 settimane di allattamento e fino alla macellazione, nella Tabella 8.7 è riportata invece la composizione acidica del latte delle madri degli agnelli leggeri incrociati (sarda x Ile de France) prelevato sempre durante le 5 settimane. Nelle stesse tabelle è mostrata l'analisi della varianza relativa all'effetto periodo.

Per facilitare la discussione, gli acidi grassi sono stati suddivisi in classi: acidi grassi a corta, media e lunga catena, acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA), insaturi (UFA) e poliinsaturi (PUFA). Ciascuna classe verrà descritta nei termini dell'acido grasso più rappresentativo: l'acido butirrico (C4:0) per gli acidi grassi a corta catena; l'acido palmitico (C16:0) per gli acidi grassi a media catena e l'acido oleico (C18:1 9c) per gli acidi grassi a lunga catena. Verrà inoltre presa in considerazione la concentrazione degli acidi grassi insaturi, su cui maggiormente si concentra l'interesse della ricerca, per le loro possibili implicazioni in campo salutistico: l'acido vaccenico (C18:1 11t), l'acido rumenico (C18:2 9c, 11t) ed i relativi isomeri, gli acidi grassi omega 3 (ω 3) derivanti dall'acido linolenico (C18:3 9c, 12c, 15c) e gli omega 6 (ω 6) derivanti invece dall'acido linoleico (C18:2 9c, 12c).

Dai dati riportati nelle Tabelle 8.6 e 8.7 è possibile osservare un andamento pressoché simile nella composizione in acidi grassi del latte delle madri degli agnelli leggeri sia di razza sarda che incrociata.

L'acido butirrico determinato nel latte delle madri degli agnelli leggeri (Tabelle 8.7 e 8.8) varia significativamente durante le cinque settimane, in particolare il valore è risultato alto fino alla terza settimana e poi è diminuito fino a raggiungere il valore più basso nella quinta settimana. Anche la concentrazione di acido palmitico, stearico ed oleico varia significativamente durante tutto il periodo. I valori più bassi nel caso dell'acido palmitico e stearico si hanno nella quarta settimana

di lattazione, mentre l'acido oleico raggiunge un valore significativamente più basso nella terza settimana. L'acido palmitico è responsabile, insieme al C12:0 e C14:0, dell'effetto aterogenico e ipercolesterolemico attribuito agli acidi grassi saturi (SFA) presenti negli alimenti.

Il contenuto di acido rumenico (C18:2 9c, 11t) (Tabelle 8.6 e 8.7) nel latte delle madri degli agnelli "leggeri", sia di razza sarda che incrociata, è aumentato significativamente ($P < 0.0001$) a partire dalla terza settimana di lattazione diminuendo nell'ultimo controllo (V settimana di lattazione) Come riportato da altri autori su lavori riguardanti sia il latte di vacca (Secchiari *et al.*, 2003b, Kelsey *et al.*, 2003), sia il latte ovino proveniente da pecore di razza massese (Serra *et al.*, 2009), il contenuto di acido rumenico tende ad aumentare nel latte durante il primo mese di lattazione e successivamente a diminuire. L'andamento dell'acido vaccenico, precursore endogeno dell'acido rumenico, è pressoché identico a quello determinato per il CLA 9c, 11t.

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), ed in particolare l'acido linoleico (C18:2 9c,12c) e l'acido linolenico (C18:3 9c,12c,15c), hanno un'origine esogena, in quanto derivano dagli alimenti ingeriti dell'animale. Essi si accumulano nel rumine in seguito ad incompleta bioidrogenazione, che dovrebbe avere come risultato finale la formazione di C18:0. I PUFA non vengono sintetizzati dai tessuti ruminali, pertanto la loro concentrazione nel latte dipende esclusivamente dalla concentrazione nel rumine. Come riportato nel paragrafo 8.2.1, (Tabella 8.1) le pecore pascolavano tutto il giorno su campi di graminacee e leguminose, essenze foraggere entrambe ricche in acido linolenico, e ricevevano un'integrazione in stalla di fieno di medica ricco in acido palmitico e concentrato commerciale (ricco in acido linoleico). Nonostante l'efficienza del trasferimento di acido linolenico e linoleico dalla dieta dell'animale al latte sia spesso bassa, a causa dell'intensiva bioidrogenazione che questi acidi grassi subiscono a livello ruminale (Harfoot *et al.* 1997), i campioni di latte analizzati hanno un buon contenuto di entrambi acidi grassi essenziali. Il contenuto di acido linolenico nel latte delle madri degli agnelli "leggeri" incrociati varia significativamente, raggiungendo il valore più alto nella quarta settimana di lattazione. Nei campioni di latte prelevato dalle madri in lattazione degli agnelli "leggeri" di razza sarda, pur non essendoci una variazione significativa del contenuto di tale acido grasso, si rileva comunque una tendenza simile a quella osservata nelle madri degli agnelli "leggeri" di razza incrociata.

Il latte con cui vengono allattati gli agnelli "leggeri" incrocio è caratterizzato, inoltre, da un contenuto significativamente più elevato di PUFA e di acidi grassi della serie ω -3 nella quarta settimana.

Le differenze riscontrate nel latte delle madri degli agnelli "leggeri" di razza sarda e incrociata, oltre che al periodo di lattazione, sono probabilmente da attribuire ad una differenza individuale delle madri stesse.

Tabella 8.6 - Composizione acidica del latte delle madri degli agnelli leggeri di razza sarda.

FAME (%)	Settimane					SEM	Effetto
	I	II	III	IV	V		
C4:0	5,30 ^a	5,55 ^a	5,71 ^a	5,15 ^{ab}	4,42 ^b	0,12	**
C10:0	4,68	6,20	6,34	5,21	4,70	0,38	ns
Corta catena	9,99	11,74	12,05	10,36	9,12	0,40	ns
C12:0	3,02	3,56	3,71	3,27	3,14	0,17	ns
C14:0	8,57	9,16	9,60	8,55	8,63	0,22	ns
C16:0	24,53 ^{ab}	25,14 ^a	25,51 ^a	22,62 ^b	23,76 ^{ab}	0,28	**
Media catena	36,12	37,86	38,83	34,44	35,53	0,62	ns
C18:0	17,15 ^a	14,89 ^{ab}	13,03 ^b	16,33 ^{ab}	13,87 ^{ab}	0,49	*
C18:1 11t	2,97 ^b	2,84 ^b	4,87 ^a	3,91 ^{ab}	2,87 ^b	0,18	***
C18:1 9c	27,36 ^{ab}	25,57 ^{ab}	24,06 ^b	27,96 ^{ab}	31,87 ^a	0,83	*
C18:2 9c,12c	3,18	3,61	2,96	2,86	3,21	0,12	ns
C18:3 9c,12c,15c	1,33	1,44	1,49	1,57	1,17	0,05	ns
CLA 9c,11t	1,24 ^b	1,28 ^b	2,03 ^a	1,86 ^{ab}	1,54 ^{ac}	0,06	***
CLA 11t,13c	0,08	0,09	0,08	0,12	0,15	0,01	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	0,18	0,18	0,15	0,13	0,16	0,01	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	0,08	0,11	0,11	0,10	0,12	0,00	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	0,22	0,22	0,20	0,20	0,24	0,01	ns
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	0,10	0,15	0,14	0,14	0,15	0,01	ns
Lunga catena	53,90	50,39	49,12	55,20	55,35	0,99	ns
SFA	63,26	64,50	63,91	61,13	58,52	0,72	ns
MUFA	30,33	28,41	28,93	31,87	34,74	0,80	ns
PUFA	6,41	7,09	7,16	7,00	6,74	0,16	ns
UFA	36,74	35,50	36,09	38,87	41,48	0,72	ns
Σω3	1,73	1,93	1,94	2,03	1,68	0,05	ns
Σω6	3,36	3,79	3,11	2,99	3,37	0,13	ns

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, Σω3= somma acidi grassi omega 3, Σω6 = somma acidi grassi omega 6. Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al periodo. *** P< 0,0001; ** P< 0,001; * P<0,05; NS, SEM = Errore Standard della Media

Tabella 8.7 - Composizione acidica del latte delle madri degli agnelli leggeri”
F1 (incrocio Sarda x Ile de France).

FAME (%)	Settimane					SEM	effetto
	I	II	III	IV	V		
C4:0	5,85 ^a	6,05 ^a	5,98 ^a	5,77 ^a	4,87 ^b	0,11	**
C10:0	3,99	5,24	6,64	5,72	5,27	0,35	ns
Corta catena	9,84	11,28	12,63	11,49	10,14	0,38	ns
C12:0	2,66	3,16	3,88	3,58	3,46	0,16	ns
C14:0	7,87	8,96	9,52	9,09	9,37	0,21	ns
C16:0	23,68	24,37	24,76	23,16	23,72	0,27	ns
Media catena	34,21	36,49	38,16	35,82	36,55	0,46	ns
C18:0	17,73 ^a	16,32 ^{ab}	12,50 ^b	14,59 ^{ac}	13,63 ^{bc}	0,47	***
C18:1 11t	3,07 ^b	3,25 ^b	6,05 ^a	4,39 ^{ab}	2,70 ^b	0,28	***
C18:1 9c	28,91 ^{ab}	26,86 ^{ab}	23,56 ^b	26,35 ^{ab}	30,31 ^a	0,69	*
C18:2 9c,12c	2,91	2,39	2,72	2,82	2,95	0,11	ns
C18:3 9c,12c,15c	1,49 ^{ab}	1,35 ^b	1,52 ^{ab}	1,70 ^a	1,46 ^{ab}	0,03	*
CLA 9c,11t	1,21 ^b	1,34 ^b	2,20 ^a	2,09 ^{ac}	1,54 ^{bc}	0,09	***
CLA 11t,13c	0,07 ^b	0,10 ^{ab}	0,09 ^{ab}	0,13 ^a	0,09 ^{ab}	0,00	**
C20:4 5c,8c,11c,14c	0,16	0,14	0,13	0,13	0,13	0,00	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	0,08 ^b	0,12 ^a	0,12 ^a	0,12 ^a	0,13 ^a	0,00	**
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	0,25 ^a	0,21 ^b	0,19 ^b	0,23 ^b	0,23 ^b	0,01	*
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	0,08 ^b	0,13 ^a	0,13 ^a	0,14 ^a	0,13 ^a	0,01	***
Lunga catena	55,95 ^a	52,22 ^{ab}	49,21 ^b	52,69 ^{ab}	53,31 ^{ab}	0,77	*
SFA	61,78	64,10	63,29	61,90	60,32	0,61	ns
MUFA	31,99	30,11	29,61	30,75	33,01	0,57	ns
PUFA	6,24 ^{ab}	5,79 ^b	7,09 ^a	7,35 ^a	6,67 ^{ab}	0,16	**
UFA	38,22	35,90	36,71	38,10	39,68	0,61	ns
Σω3	1,90 ^{ab}	1,81 ^b	1,96 ^{ab}	2,18 ^a	1,95 ^{ab}	0,04	*
Σω6	3,07	2,53	2,85	2,95	3,08	0,11	ns

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, Σω3= somma acidi grassi omega 3, Σω6 = somma acidi grassi omega 6. Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al periodo. *** P< 0,0001; ** P< 0,001; * P<0,05; NS, SEM = Errore Standard della Media.

8.4.1.4 Macrocomposizione della carne degli agnelli “leggeri”

La carne occupa un posto di primo piano tra gli alimenti di maggior valore nutrizionale, contribuendo in maniera determinante allo sviluppo fisico dell’organismo grazie al suo apporto in termini di proteine ed energia. I principali componenti della carne ovina sono acqua, proteine e grasso che tengono conto per circa il 98% del prodotto tal quale. Il restante 2% è costituito da componenti minori quali vitamine e sostanze minerali. Queste percentuali possono variare in funzione di fattori di tipo endogeno (tipo di muscolo, razza, sesso specie, ecc.) ed esogeno (alimentazione , ecc.).

Effetto della razza

In Tabella 8.8 è riportata la composizione chimica del muscolo *Longissimus dorsi* prelevato dagli agnelli “leggeri” di razza sarda (Sarda) e incrocio F1 sarda x Ile de France (Francese). La razza di appartenenza non ha avuto nessuna influenza significativa relativamente al contenuto in ceneri, umidità e grasso. La carne degli agnelli “leggeri” di razza sarda è comunque caratterizzata da un contenuto significativamente più elevato ($P < 0.05$) in termini di proteine rispetto alla carne degli agnelli leggeri di razza incrociata. I dati da noi determinati per la carne degli agnelli “leggeri” di razza sarda sono confrontabili con quelli riportati da Vacca *et al*, (2008) su agnelli di razza sarda macellati a 40 giorni d’età.

Tabella 8.8 - Composizione chimica (media \pm ds) della carne degli agnelli “leggeri” macellati a circa 14-20Kg di peso vivo.

razza	Francese	Sarda	effetto
umidità (%)	75,67 \pm 1,14	75,43 \pm 0,92	ns
ceneri (%)	1,22 \pm 0,04	1,22 \pm 0,07	ns
estratto etereo (%)	2,32 \pm 0,89	2,21 \pm 0,76	ns
proteine (NT*6,25)	20,73 \pm 0,34	21,20 \pm 0,40	*

Analisi della varianza; ns, non significativo. ds = stima della deviazione standard.

8.4.1.5 Profilo acidico della carne degli agnelli “leggeri”

La composizione acidica qualitativa e quantitativa del grasso intramuscolare è fondamentale nella definizione della qualità della carne, in quanto influenza sia le caratteristiche sensoriali quali struttura e aroma, sia il valore nutrizionale della carne.

Effetto della razza

In Tabella 8.9 è riportata la composizione acidica media del muscolo *Longissimus dorsi* determinata negli agnelli “leggeri” di razza Sarda (Sarda) e incrocio F1 Sarda x Ile de France (Francese).

Per facilitare la discussione, gli acidi grassi sono stati suddivisi in classi: acidi grassi a corta, media e lunga catena, acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA), insaturi (UFA) e poliinsaturi (PUFA). Ciascuna classe verrà descritta nei termini dell'acido grasso più rappresentativo: l'acido caprinico (C10:0) per gli acidi grassi a corta catena; l'acido palmitico (C16:0) per gli acidi grassi a media catena e l'acido oleico (C18:1 9c) per gli acidi grassi a lunga catena. Verranno inoltre presi in considerazione i tenori in acidi grassi insaturi su cui maggiormente si concentra l'interesse della ricerca per le loro possibili implicazioni in campo salutistico: l'acido vaccenico (C18:1 11t), l'acido rumenico (C18:2 9c, 11t) ed i relativi isomeri, gli acidi grassi ω 3 (omega 3), derivanti dall'acido linolenico (C18:3 9c, 12c, 15c) e gli ω 6 (omega 6) derivanti invece dall'acido linoleico (C18:2 9c, 12c), nonché gli indici più significativi usati per definire la qualità nutrizionale della carne: $\Sigma\omega$ 6/ $\Sigma\omega$ 3, AI (Indice Aterogenico), TI (Indice Trombogenico) e P/S (Polinsaturi/Saturi).

L'Indice Aterogenico (AI) e l'Indice Trombogenico danno una stima dell'aterogenicità e/o della trombogenicità di una dieta o di un alimento.

La razza non ha avuto alcuna influenza sul profilo acidico della carne analizzata prelevata dagli agnelli “leggeri”. Gli acidi grassi più rappresentativi del profilo acidico dei campioni di carne analizzati sono l'acido oleico (C18:1 9c), l'acido palmitico (C16:0), e l'acido stearico (C18:0). La concentrazione di questi acidi grassi, nella frazione lipidica intramuscolare analizzata, è confrontabile con quella determinata da Vacca *et al.*, (2008) in campioni di carne di agnelli di razza sarda macellati a 40 giorni d'età; risulta, invece, più elevata rispetto a quella determinata da Serra *et al.*, (2009) in campioni di carne di agnelli di razza massese macellati ad un peso vivo di 17 Kg.

E' stato ampiamente dimostrato che, ad eccezione dell'acido stearico (C18:0) (Bonanome & Grundy, 1988), gli acidi grassi saturi (SFA), assunti con la dieta, tendono ad aumentare sia il livello di colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità (C-LDL) sia il livello di colesterolo

plasmatico totale; contrariamente a quanto accade per gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), che pare abbiano invece un ruolo determinante nel diminuire il livello di questi stessi metaboliti (Gurr *et al.*, 1989; Mensink & Katan, 1992). In considerazione di questo fatto l'indice P/S, dato dal rapporto tra acidi grassi polinsaturi e acidi grassi saturi, viene utilizzato per calcolare il fattore di rischio degli alimenti per quanto riguarda l'aumento del livello di colesterolo nel sangue. Il contenuto di acidi grassi saturi (SFA) determinato nel muscolo degli agnelli "leggeri" di razza Sarda è risultato tendenzialmente inferiore rispetto a quello determinato nel muscolo degli agnelli incrocio F1 Sarda x Ile de France, e paragonabile al valore riportato da Vacca *et al.*, (2008) per la carne di agnelli di razza Sarda macellati a 40 giorni di età. Il contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFA), come mostrato in Tabella 8.9, è risultato essere più elevato nella carne degli agnelli di razza Sarda rispetto alla carne degli agnelli incrocio Sarda x Ile de France. Conseguentemente a questo fatto la carne degli agnelli "leggeri" di razza Sarda è caratterizzata da un valore di P/S tendenzialmente superiore a quello determinato nella carne degli agnelli incrocio F1 (0.55 vs 0.46, Tabella 8.9). Il rapporto P/S determinato sia nella carne degli agnelli "leggeri" di razza Sarda che negli agnelli incrocio F1 è comunque più elevato di quello riportato da Vacca *et al.*, (2008) ed è, in entrambi i casi, superiore al valore di 0,45 suggerito dai nutrizionisti (Department of Health, 1994). La carne con un valore di grasso intramuscolare inferiore a 0,45 è considerata qualitativamente mediocre dal punto di vista nutrizionale in quanto il suo consumo può indurre un aumento dei livelli del colesterolo nel sangue.

Un altro indice utilizzato per esprimere la qualità nutrizionale di un alimento è il rapporto $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$. E' stato calcolato che nella dieta umana il rapporto $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$ è aumentato dall'intervallo 1:1 - 4:1 ad un valore attuale che si aggira in un range che va da 10:1 a 15:1 nei paesi occidentali (Mazza *et al.*, 2007). Le ricerche attuali suggeriscono che i livelli di acidi grassi $\omega6$ e $\omega3$ e l'equilibrio tra essi possa giocare un ruolo fondamentale non solo nella crescita e nello sviluppo, ma anche nella prevenzione e nel trattamento di patologie croniche. Gli stessi studi suggeriscono quindi un maggior consumo di alimenti con un rapporto $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$ basso, in generale un rapporto $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3 < 4$ è considerato valido dal punto di vista nutrizionale (Department of health, 1994).

Il rapporto $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$ nella carne di agnello "leggero" di entrambe le razze è risultato essere inferiore a 4 (2,66 vs 2,33, rispettivamente per gli agnelli di razza Sarda e razza incrocio F1). Questi valori sono paragonabili a quelli determinati da Vacca *et al.*, (2008) per agnelli di razza Sarda, macellati a 40 giorni di età, ed è più alti rispetto a quelli osservati da Serra *et al.*, (2009) per agnelli di razza massese macellati ad un peso vivo di 14 Kg.

Alcuni autori suggeriscono che il rapporto P/S potrebbe non essere adatto per valutare il valore nutrizionale del grasso perché considera che tutti gli acidi grassi saturi inducano allo stesso

modo un aumento dei livelli del colesterolo, trascurando inoltre gli effetti anticolesterolemici degli acidi grassi monoinsaturi ed in particolare del C18:1 9c (Santos-Silva *et al.*, 2002).

Per questo motivo Ulbricht & Southgate (1991) hanno introdotto altri due indici: l'indice aterogenico (AI) e l'indice trombogenico (TI). I valori raccomandati per questi due indici nella dieta devono essere bassi e inferiori ad 1. Il valore dell'indice AI osservato nei campioni in esame (0,80 per gli agnelli "leggeri" di razza Sarda e 0,88 per la gli agnelli "leggeri" incrocio F1) è inferiore a quello determinato da Vacca., (2008) sia per gli agnelli di razza Sarda che incrociati (Muflone x sarda) macellati a 40 giorni di età. Il valore dell'indice trombogenico (TI) è risultato essere invece confrontabile con quello trovato da Vacca *et al.*, (2008) per la carne di agnelli di razza sarda.

Tabella 8.9 - Composizione acidica (media \pm ds) della carne degli agnelli "leggeri" macellati a circa 14-20 Kg di peso vivo.

FAME (%)	razza		Effetto
	Sarda	Francese	
C10:0	0,28 \pm 0,06	0,34 \pm 0,09	ns
Corta catena	0,28 \pm 0,06	0,34 \pm 0,09	ns
C12:0	0,67 \pm 0,18	0,70 \pm 0,20	ns
C14:0	5,63 \pm 0,70	6,13 \pm 0,56	ns
C16:0	22,66 \pm 1,48	23,51 \pm 1,36	ns
Media catena	28,96 \pm 2,07	30,34 \pm 1,80	ns
C18:0	13,60 \pm 1,06	13,69 \pm 0,49	ns
C18:1 11t	2,20 \pm 0,15	2,27 \pm 0,21	ns
C18:1 9c	31,69 \pm 5,38	33,04 \pm 3,22	ns
C18:2 9c,12c	11,63 \pm 3,43	9,93 \pm 2,04	ns
C18:3 9c,12c,15c	2,45 \pm 0,28	2,53 \pm 0,27	ns
CLA 9c,11t	1,20 \pm 0,19	1,16 \pm 0,10	ns
CLA 11t,13c	0,05 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	4,41 \pm 1,67	3,49 \pm 1,06	ns
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	0,62 \pm 0,24	0,62 \pm 0,14	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	1,95 \pm 0,72	1,74 \pm 0,43	ns
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	0,96 \pm 0,37	0,80 \pm 0,19	ns
Lunga catena	70,76 \pm 2,03	69,32 \pm 1,87	ns
SFA	42,84 \pm 1,32	44,37 \pm 1,56	ns
MUFA	33,89 \pm 5,49	35,31 \pm 3,02	ns
PUFA	23,26 \pm 6,22	20,32 \pm 3,91	ns
UFA	57,16 \pm 1,32	55,63 \pm 1,56	ns
$\Sigma\omega3$	5,99 \pm 1,46	5,70 \pm 0,92	ns
$\Sigma\omega6$	16,03 \pm 5,06	13,42 \pm 3,10	ns
$\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$	2,66 \pm 0,42	2,33 \pm 0,30	ns
AI	0,80 \pm 0,09	0,88 \pm 0,08	ns
TI	0,99 \pm 0,13	1,05 \pm 0,11	ns
P/S	0,55 \pm 0,15	0,46 \pm 0,10	ns

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega6$ = somma acidi grassi omega 6. AI = (C12:0 + (C14:0*4) + C16:0)/UFA; TI = (C14:0+C16:0+C18:0)/((0.5* $\Sigma\omega6$)+(0.5*MUFA)+(3* $\Sigma\omega3$)+(0.5* $\Sigma\omega6$), P/S = PUFA/SFA. Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta alla razza. *** P< 0,0001; ** P< 0,001; * P<0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard.

8.4.2 II° obiettivo - Effetto dell'alimentazione sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne proveniente da agnelli "da taglio" incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France)

8.4.2.1 Produzione e composizione chimica del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli appartenenti al gruppo LATTE

I dati sulla produzione e sulla composizione chimica del latte delle madri degli agnelli "da taglio" appartenenti al gruppo LATTE sono riportati in Tabella 8.10. Nella stessa tabella viene inoltre mostrata l'analisi della varianza relativa all'effetto "periodo" di lattazione.

Il campionamento del latte è stato eseguito settimanalmente per 9 settimane (10 Dicembre-5 Febbraio). La produzione di latte individuale delle madri degli agnelli appartenenti al gruppo LATTE è variata, anche se non significativamente, durante tutto il periodo di lattazione. Il tenore di grasso nel latte aumenta in modo significativo nella VII e VIII settimana per diminuire significativamente al prelievo della IX settimana di lattazione. La concentrazione di proteine aumenta significativamente ($P < 0.001$) dalla seconda settimana dopo il parto raggiungendo il valore più alto all'ottava settimana. La concentrazione di urea è stata sempre piuttosto elevata, soprattutto nella terza, quarta e quinta settimana. Per quanto riguarda il tenore in lattosio esso è risultato tendenzialmente più elevato nella prima settimana. La conta delle cellule somatiche invece è risultata essere bassa durante tutto il periodo in cui si è svolta la prova.

Tabella 8.10 - Produzione e composizione chimica del latte delle madri degli agnelli da "taglio" incrocio F1) appartenenti al gruppo LATTE - osservazioni settimanali.

Settimane	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	SEM	Effetto
Latte (ml/di)	812,00	836,00	716,00	836,00	680,00	752,00	664,00	716,00	1116,00	38,26	ns
Grasso (%)	4,72 ^{ab}	5,42 ^a	5,41 ^{ab}	4,56 ^{ab}	4,81 ^{ab}	4,60 ^{ab}	6,07 ^a	6,20 ^a	4,53 ^b	0,14	**
Proteine (%)	4,72 ^b	4,95 ^{ab}	4,89 ^{ab}	5,00 ^{ab}	4,80 ^{ab}	5,21 ^{ab}	5,32 ^{ab}	5,78 ^a	5,71 ^{ab}	0,08	**
Lattosio (%)	5,16	5,10	5,10	5,19	4,94	5,06	4,89	5,04	5,09	0,03	ns
Cellule somatiche	151,00	854,40	254,20	199,20	457,20	406,86	644,20	391,80	414,80	80,38	ns
Urea (%)	58,62	53,04	64,94	64,12	63,44	57,78	61,42	62,10	58,68	1,35	ns

Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al periodo. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$; NS, non significativo. SEM = Errore Standard della Media.

8.4.2.2 Profilo acidico del latte materno utilizzato per l'alimentazione degli agnelli appartenenti al gruppo LATTE

Gli agnelli da “taglio” incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France) appartenenti al gruppo LATTE sono stati alimentati esclusivamente con latte materno fino al momento della macellazione. Il latte delle madri è stato prelevato settimanalmente fino alla nona settimana di lattazione, periodo in cui gli agnelli sono stati macellati. In Tabella 8.11 sono riportati i risultati relativi al profilo acidico del latte analizzato. Nella stessa tabella è riportata l'analisi della varianza per l'effetto periodo. Il periodo di lattazione ha in generale influenzato significativamente la composizione acidica del latte. In generale si osserva, durante il periodo di lattazione considerato, un aumento significativo degli acidi grassi a corta catena e parallelamente una diminuzione del livello di acidi grassi a lunga catena. Questo andamento potrebbe essere dovuto ad una efficienza della sintesi ex novo degli acidi grassi, meccanismo con il quale vengono sintetizzati gli acidi grassi a corta e media catena, che migliora con il progredire della lattazione, accompagnata per contro da una diminuzione del livello di acidi grassi a lunga catena che derivano, invece dalla mobilizzazione dei lipidi di deposito e dalla dieta dell'animale. In particolare tra gli acidi grassi a corta catena quello che aumenta maggiormente con il progredire della lattazione è il C10:0, mentre tra gli acidi grassi saturi a lunga catena l'acido stearico diminuisce da un valore di 13,97% ($P < 0.0001$) nella prima settimana ad un valore di 7,88% ($P < 0.0001$) nell'ultima settimana.

Nei campioni di latte prelevato settimanalmente, le concentrazioni di acido rumenico (CLA 9c, 11t), acido linolenico (C18:3 9c, 12c, 15c), $\omega 3$ e PUFA seguono un andamento parallelo, con valori inizialmente bassi che tendono ad aumentare significativamente alla quarta settimana, per diminuire ancora ed infine aumentare nuovamente nell'ottava settimana. Trattandosi di animali tenuti al pascolo per diverse ore (7 ore al giorno), l'andamento dei PUFA prima descritto potrebbe essere legato alla variazione della disponibilità di erba durante il periodo di lattazione. Dall'erba derivano infatti gli acidi grassi precursori necessari alla sintesi ruminale e tissutale degli acidi grassi di cui sopra.

Tabella 8.11 - Composizione acidica del latte delle madri degli agnelli da “taglio” incrocio (F1) gruppo LATTE.

Fame (%)	Settimane									SEM	Effetto
	I°	II°	III°	IV°	V°	VI°	VII°	VIII°	IX°		
C4:0	5,71 ^a	5,61 ^a	5,73 ^a	5,48 ^{ab}	4,72 ^b	5,36 ^{ab}	5,31 ^{ab}	5,25 ^{ab}	5,46 ^{ab}	0,072	*
C10:0	5,45 ^b	6,60 ^b	8,09 ^{ab}	7,24 ^{ab}	5,51 ^b	8,16 ^{ab}	7,85 ^{ab}	9,53 ^{ab}	11,22 ^a	0,407	*
Corta catena	11,16 ^b	12,21 ^{ab}	13,82 ^{ab}	12,72 ^{ab}	10,23 ^b	13,52 ^{ab}	13,16 ^{ab}	14,78 ^{ab}	16,68 ^a	0,413	**
C12:0	3,42 ^b	3,68 ^{ab}	4,45 ^{ab}	4,26 ^{ab}	3,52 ^{ab}	4,81 ^{ab}	4,70 ^{ab}	5,19 ^{ab}	5,92 ^a	0,193	*
C14:0	9,37 ^b	9,72 ^{ab}	10,86 ^{ab}	10,21 ^{ab}	9,18 ^b	11,24 ^{ab}	10,09 ^{ab}	11,71 ^{ab}	13,11 ^a	0,286	*
C16:0	24,58 ^{ab}	25,06 ^{ab}	26,58 ^a	23,47 ^{ac}	23,24 ^b	24,48 ^{ace}	23,54 ^{bde}	24,86 ^{acd}	26,81 ^a	0,245	***
Media catena	37,38 ^b	38,46 ^b	41,88 ^{ab}	37,94 ^b	35,94 ^b	40,53 ^{ab}	38,33 ^b	41,76 ^{ab}	45,83 ^a	0,625	**
C18:0	16,51 ^a	15,99 ^a	11,84 ^{bc}	15,69 ^a	14,93 ^a	13,77 ^{acd}	14,08 ^{ac}	11,13 ^{bd}	10,07 ^b	0,361	***
C18:1 11t	2,79 ^{cd}	2,82 ^{cd}	5,13 ^a	3,82 ^{abc}	2,41 ^b	3,47 ^{bd}	3,42 ^{bd}	4,22 ^{ba}	3,76 ^{bc}	0,139	***
C18:1 9c	25,93 ^{ab}	24,27 ^{bd}	20,62 ^{abd}	23,48 ^{bd}	30,26 ^a	22,34 ^{acd}	24,52 ^{bd}	20,31 ^{adb}	16,38 ^d	0,810	**
C18:2 9c,12c	2,91 ^{ab}	2,88 ^{ab}	2,59 ^b	2,45 ^b	2,80 ^{ab}	2,54 ^b	2,64 ^{ab}	3,08 ^a	2,82 ^{ab}	0,041	**
C18:3 9c,12c,15c	1,54 ^b	1,53 ^b	1,58 ^b	1,58 ^b	1,45 ^b	1,64 ^{bc}	1,60 ^b	1,99 ^a	1,87 ^{ac}	0,028	***
CLA 9c,11t	1,09 ^b	1,14 ^b	1,91 ^{bc}	1,68 ^{bcd}	1,32 ^{ade}	1,51 ^{abc}	1,62 ^{bc}	1,98 ^a	1,86 ^a	0,054	***
CLA 11t,13c	0,09 ^b	0,09 ^b	0,09 ^b	0,12 ^{bc}	0,09 ^b	0,11 ^{acd}	0,09 ^b	0,13 ^a	0,12 ^{bc}	0,003	***
C20:4 5c,8c,11c,14c	0,14 ^{ab}	0,15 ^a	0,12 ^{abc}	0,10 ^b	0,12 ^{abc}	0,12 ^{abc}	0,11 ^b	0,14 ^{ab}	0,13 ^{abc}	0,003	*
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11	0,13	0,13	0,002	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	0,20 ^{ab}	0,19 ^{bc}	0,18 ^b	0,18 ^b	0,20 ^{ab}	0,19 ^{bc}	0,19 ^{bc}	0,22 ^a	0,22 ^a	0,003	**
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	0,14	0,13	0,11	0,13	0,12	0,14	0,13	0,15	0,14	0,003	ns
Lunga catena	51,46 ^a	49,33 ^a	44,30 ^{ab}	49,34 ^a	53,83 ^a	45,95 ^{ab}	48,51 ^a	43,47 ^{ab}	37,49 ^b	0,994	**
SFA	65,04 ^{ab}	66,67 ^{ab}	67,54 ^{ab}	66,35 ^{ab}	61,10 ^b	67,82 ^{ab}	65,56 ^{ab}	67,67 ^{ab}	72,58 ^a	0,747	*
MUFA	28,72 ^{ab}	27,10 ^{ab}	25,75 ^{ab}	27,30 ^{ab}	32,67 ^a	25,80 ^{ab}	27,94 ^{ab}	24,53 ^{ab}	20,14 ^b	0,761	*
PUFA	6,23 ^b	6,24 ^b	6,71 ^b	6,35 ^b	6,22 ^b	6,38 ^b	6,50 ^{bc}	7,81 ^a	7,28 ^{ac}	0,090	***
UFA	34,96 ^{ab}	33,33 ^{ab}	32,46 ^{ab}	33,65 ^{ab}	38,90 ^a	32,18 ^{ab}	34,44 ^{ab}	32,33 ^{ab}	27,42 ^b	0,747	*
Σω3	2,00 ^b	1,97 ^b	2,00 ^b	1,99 ^b	1,88 ^b	2,09 ^b	2,04 ^b	2,49 ^a	2,35 ^a	0,031	***
Σω6	3,05 ^{ab}	3,04 ^{ab}	2,72 ^b	2,55 ^b	2,93 ^{ab}	2,67 ^{ab}	2,75 ^{ab}	3,21 ^a	2,95 ^{ab}	0,043	**

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, Σω3= somma acidi grassi omega 3, Σω6 = somma acidi grassi omega 6. Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta al periodo. *** P< 0,0001; ** P< 0,001; * P<0,05; NS, non significativo. SEM = Errore Standard della Media

8.4.2.3 Macrocomposizione della carne degli agnelli da “taglio” incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France)

La carne occupa un posto di primo piano tra gli alimenti di maggior valore nutrizionale contribuendo in maniera determinante allo sviluppo fisico dell'organismo grazie al suo apporto in termini di proteine ed energia. I principali componenti della carne ovina sono acqua, proteine e grasso che tengono conto per circa il 98% del prodotto tal quale. Il restante 2% è costituito da componenti minori quali vitamine e sostanze minerali. Queste percentuali possono variare in funzione di fattori di tipo endogeno (tipo di muscolo, razza, sesso specie, ecc.) ed esogeno (alimentazione, ecc.).

Effetto dell'alimentazione dell'animale

Nella Tabella 8.12 è riportata la composizione chimica del muscolo *Longissimus dorsi* prelevato dagli agnelli da “taglio” incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France) differenziati in base al regime alimentare a cui sono stati sottoposti. Gli animali, come descritto nella parte sperimentale, al momento dello svezzamento (10-14 kg) sono stati suddivisi in tre gruppi omogenei da sei agnelli ciascuno. Gli agnelli del gruppo LATTE venivano alimentati esclusivamente con latte materno, quelli del gruppo STALLA con una alimentazione a base di fieno di medica e concentrato ed infine quelli del gruppo ERBA pascolavano tutto il giorno su un pascolo di loglio italico. Il tipo di alimentazione non ha influenzato la composizione chimica del muscolo analizzato. La carne degli agnelli del gruppo STALLA, che ricevevano un alimentazione a base di fieno di medica (Tabella 8.3), sono caratterizzati da un contenuto tendenzialmente più basso di grasso e proteine rispetto alla carne degli agnelli appartenenti al gruppo ERBA ed al gruppo LATTE.

Tabella 8.12 - Composizione chimica (media \pm ds) della carne degli agnelli da “taglio” incrocio F1 macellati a circa 20-26Kg di peso vivo.

alimentazione	Latte	Stalla	Erba	Effetto
umidità (%)	75,08 \pm 1,12	75,78 \pm 0,91	75,72 \pm 0,67	ns
ceneri (%)	1,22 \pm 0,07	1,18 \pm 0,02	1,21 \pm 0,02	ns
estratto etereo (%)	2,33 \pm 0,75	1,98 \pm 0,48	2,09 \pm 0,27	ns
proteine (NT*6,25)	20,91 \pm 0,40	17,82 \pm 7,86	21,06 \pm 0,39	ns

Analisi della varianza; ns, non significativo. ds = stima della deviazione standard

8.4.2.4 Composizione acidica della carne degli agnelli “da taglio” incrocio F1 (sarda x Ile de France)

Tra le specie di animali da carne, è generalmente riconosciuto che un aumento del consumo di energia e / o una carenza nella dieta di proteine favorisce l'accrescimento del grasso corporeo (Campbell *et al.*, 1984). I ruminanti sintetizzano i lipidi attraverso la via delle fermentazioni ruminali e quella delle attività digestive post-ruminali.

La flora batterica presente nel rumine degrada parte dei nutrienti assunti dall'animale durante l'alimentazione. I carboidrati, in particolare, subiscono fermentazioni che portano alla formazione di acidi grassi volatili quali l'acido acetico, l'acido propionico e l'acido butirrico (Harfoot, 1981).

I tre prodotti dell'attività ruminale hanno origine da tre processi metabolici diversi, ma tutti hanno come punto di partenza la sintesi del fruttosio 6-fosfato e, successivamente, del piruvato. Da quest'ultimo si ottiene l'acetato attraverso la via dell'Acetil-fosfato, il proprionato attraverso la via del MetilmalonilCoA e il butirrato tramite la via dell'Acetil CoA. L'acetato ed il butirrato sono i precursori degli acidi grassi a media e corta catena nel latte e nel tessuto adiposo (Chilliard *et al.*, 2000) ed il loro equilibrio dipende anche dalla composizione della dieta ed in particolar modo, dalla proporzione della fibra nella razione alimentare.

Una dieta a base di concentrati aumenta la produzione a livello ruminale di acido propionico e diminuisce quella di acido acetico (Moloney, 1997). La disponibilità di una grande quantità di catene idrocarburiche più corte presenti negli alimenti all'interno del rumine, provoca una diminuzione della bioidrogenazione degli acidi grassi polinsaturi.

I lipidi (trigliceridi e fosfolipidi) presenti nell'alimento sono idrolizzati, nel rumine, da lipasi microbiche, rilasciando gli acidi grassi che li costituiscono. La lipasi idrolizza completamente i trigliceridi ad acidi grassi e glicerolo, con piccoli accumuli di mono- e digliceridi, mentre l'idrolisi dei fosfolipidi porta alla liberazione ed al metabolismo di molecole di zuccheri e di acidi grassi liberi.

Sebbene l'entità di idrolisi è generalmente elevata (> 85%), sono stati identificati alcuni fattori che ne influenzano la velocità ed il grado. Ad esempio quando aumenta il contenuto di grasso nella dieta si riduce il grado di idrolisi (Beam *et al.*, 2000), oppure quando fattori come un basso pH ruminale o la presenza di ionofori inibiscono l'attività e la crescita di batteri (Demeyer and Doreau, 1999).

La seconda grande trasformazione che i lipidi presenti nella razione alimentare, possono subire nel rumine è la bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi. Tale processo avviene a carico degli acidi grassi liberati durante l'idrolisi. I substrati più importanti sono gli acidi linoleico e

linolenico questi acidi grassi, presenti in molte diete, vengono idrogenati nella misura del 70-95% e 85-100%, rispettivamente (Doreau and Ferlay, 1994; Beam *et al.*, 2000). Questo livello estensivo di idrogenazione può essere ridotto con diete ad alto contenuto di concentrati (> 70%), tale effetto può essere attribuito ad un abbassamento del pH che limitando la lipolisi e quindi l'idrogenazione porta alla produzione di acidi grassi liberi (Van Nevel and Demeyer, 1995; 1996b).

La bile, secreta dal fegato, induce l'interazione degli acidi grassi con i fosfolipidi di membrana, formando una fase liquido-cristallina. L'aumento del pH favorisce la dispersione della fase in micelle, le quali vengono solubilizzate ad opera dell'enzima pancreatico fosfolipasi A2. Questa reazione favorisce l'assorbimento degli acidi grassi ad opera dei villi intestinali.

I trigliceridi, i fosfolipidi, il colesterolo e specifiche apoproteine vengono assemblati in chilomicroni nella mucosa intestinale, quindi drenati nel sistema linfatico. In seguito, i chilomicroni sono smontati nel fegato e gli acidi grassi che si ottengono, vengono utilizzati in vario modo (ossidazione, desaturazione, allungamento, riesterificazione).

Gli acidi grassi trasportati nel sangue in chilomicroni e lipoproteine (LDL, HDL, VLDL), giungono nella ghiandola mammaria e negli altri tessuti, dove vengono utilizzati per la sintesi del grasso.

Nei ruminanti il sito di maggiore sintesi degli acidi grassi è il tessuto adiposo. Durante la lattazione, invece, è la ghiandola mammaria a svolgere la maggiore attività biosintetica (Vernon & Flint, 1983).

I meccanismi responsabili della sintesi degli acidi grassi sono due, citoplasmatico, che rappresenta la via principale, e mitocondriale. La sintesi degli acidi grassi fino a 16 atomi di carbonio avviene nel citoplasma; il processo metabolico prevede l'intervento di alcuni enzimi chiave quali l'Acetil CoA Carbossilasi (ACC) e la Sintasi degli acidi grassi (FAS). L'ACC catalizza la formazione del malonil-CoA a partire dall'acetil-CoA. Il FAS, invece, catalizza la condensazione ciclica del malonil-ACP con molecole di acetato. La reazione di condensazione si ripete per un certo numero di volte sino alla formazione del palmitoil-CoA (C16:0), prodotto finale della sintesi.

Nella ghiandola mammaria, al contrario degli altri tessuti, la sintesi può terminare anche con il miristoil-CoA (C14:0), mentre l'acido palmitico non può essere convertito in acido stearico (C18:0) (Moore e Christie, 1981). La ghiandola mammaria, pur non essendo in grado di sintetizzare acidi grassi a catena più lunga di 16 atomi di carbonio, riesce a convertire l'acido stearico in acido oleico, grazie all'attività della Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) che introduce un doppio legame in posizione *cis*- Δ^9 della catena carboniosa. Negli altri tessuti, la sintesi mitocondriale opera l'allungamento dell'acido palmitico, sino ad arrivare a catene aciliche di 22 atomi di carbonio. I

microsomi, invece, sono il sito dove gli acidi grassi possono essere allungati e/o desaturati, nel caso in cui abbiano almeno 18 atomi di carbonio.

Gli acidi grassi preformati, provenienti dalla dieta o dalle riserve corporee, vengono prelevati direttamente dal circolo sanguigno se sono presenti nella forma non esterificata, oppure captati dall'enzima Lipoproteinlipasi (LPL) a livello della membrana basale della cellula alveolare se sono presenti nei chilomicroni o nelle VLDL. Gli acidi grassi, sia quelli di neo-sintesi che quelli provenienti dalla dieta, sono utilizzati dalla ghiandola mammaria e dagli altri tessuti per la sintesi dei trigliceridi e dei fosfolipidi.

Gli acidi grassi polinsaturi, in particolare l'acido linoleico e l'acido linolenico, poiché non vengono sintetizzati né dalla ghiandola mammaria né dai tessuti ruminanti, la loro concentrazione nel tessuto muscolare dipende dal contenuto nella razione alimentare, dall'entità della bioidrogenazione ruminale e dall'efficienza del loro trasferimento dal ruminante ai tessuti.

Il livello di questi acidi grassi nei lipidi della carne può essere aumentato introducendo nella dieta del ruminante alimenti che ne sono ricchi, o agendo sui fattori che ne diminuiscono la bioidrogenazione a livello ruminale, quali la velocità di transito e la protezione (Pariza et al., 1996, Scollan et al., 2002).

La strategia alimentare maggiormente utilizzata per incrementare il livello di acidi grassi polinsaturi $\omega 3$ nella carne è l'utilizzo di una miscela di semi di girasole e semi di lino che porta anche ad un aumento del contenuto di CLA 9c, 11t nella carne (Bessa et al, 2007, Jeronimo *et al.*, 2009).

Numerosi studi sono stati condotti negli ultimi anni con l'intento di migliorare il valore nutraceutico della carne delle principali specie di interesse zootecnico (vacca, pecora, agnello, capra e maiale) attraverso l'incremento del contenuto di CLA ed in particolare dell'isomero CLA 9c, 11t.

La quantità di CLA presente nella carne è influenzata principalmente dalla specie ruminante.

Un'alimentazione prevalentemente basata sull'utilizzo di pascolo di buona qualità e caratterizzata da una ridotta integrazione con mangimi concentrati aumenta il contenuto di CLA 9c, 11t nel grasso intramuscolare (French *et al.*, 2000, Auroseau *et al.*, 2004).

Effetto della dieta

La composizione acidica della carne degli agnelli da "taglio" incrocio F1 (razza Sarda x Ile de France) e sottoposti ai tre differenti regimi alimentari è riportata in Tabella 8.13. Nella tabella è riportata inoltre l'analisi della varianza relativa al fattore alimentazione.

Il regime alimentare, a cui sono stati sottoposti gli agnelli da “taglio”, ha influenzato significativamente la composizione in acidi grassi del grasso intramuscolare estratto dai campioni di *Longissimus dorsi* prelevati.

La carne degli agnelli, alimentati esclusivamente con latte materno (appartenenti al gruppo LATTE), è caratterizzata da un contenuto significativamente superiore di acidi grassi a media catena, in particolare di C12:0, C14:0 e C16:0, rispetto alla carne degli agnelli che pascolavano al seguito delle madri (gruppo ERBA). La carne degli agnelli appartenenti al gruppo erba è caratterizzata, invece, da un contenuto significativamente superiore di acidi grassi a lunga catena e monoinsaturi (MUFA), in particolare di C18:0 e C18:1 9c. La carne degli agnelli, la cui alimentazione prevedeva, invece, una integrazione a base di fieno e concentrato ha mostrato una concentrazione intermedia di acidi grassi a media e lunga catena, ma un contenuto di acidi grassi monoinsaturi significativamente inferiore, in particolare, rispetto alla carne degli agnelli al pascolo.

La concentrazione in acidi grassi polinsaturi, determinata nella carne degli agnelli dei tre gruppi, ha riflettuto da vicino la composizione acidica degli alimenti ingeriti dagli animali. Gli agnelli appartenenti al gruppo ERBA ed al gruppo LATTE hanno mostrato una composizione in acidi grassi polinsaturi molto simile tra loro. Il grasso intramuscolare degli agnelli di entrambi i gruppi ha mostrato valori significativamente più elevati sia di acido linolenico (C18:3 9c, 12c, 15c, $P < 0.05$) che di acido rumenico (CLA 9c, 11t, $P < 0.05$) rispetto a quello degli agnelli del gruppo STALLA. Questo risultato potrebbe essere attribuito al fatto che gli agnelli appartenenti al gruppo LATTE, oltre che venire alimentati con il latte materno, seguivano le madri al pascolo per cui potrebbero aver ingerito, anche loro, piccole quantità di erba caratterizzata, come mostrato in Tabella 8.4, da una elevata percentuale di acido linolenico (C18:3 9c, 12c, 15c, 78.57%). Diversi studi hanno evidenziato che il livello di acido linolenico e di CLA 9c, 11t nei prodotti lattiero caseari e nella carne dei ruminanti aumenta con l'aumentare dell'incidenza del pascolo nella dieta dell'animale, quindi con l'ingestione di erba e con la qualità dell'erba assunta, in termini di concentrazione dei precursori (Jahreis *et al.*, 1997).

La carne degli agnelli appartenenti al gruppo STALLA è caratterizzata invece da un contenuto significativamente superiore ($P < 0.0001$) di acido linoleico (C18:2 9c, 12c) e di acidi grassi della serie omega-6 ($\Sigma\omega 6$) ($P < 0.0001$) conseguentemente al fatto che questi animali seguivano una dieta a base di fieno e concentrato molto ricco, quest'ultimo, in acido linoleico (Tabella 8.3, 46.51%).

Per valutare gli effetti dei tre regimi alimentari sul valore nutrizionale del grasso sono stati determinati alcuni rapporti: il rapporto $\Sigma\omega 6/\Sigma\omega 3$, P/S e gli indici AI e TI. La concentrazione significativamente inferiore di acidi grassi $\omega 6$ e tendenzialmente superiore di acidi grassi $\omega 3$ ha permesso alla carne degli agnelli del gruppo LATTE ed ERBA di avere un rapporto $\Sigma\omega 6/\Sigma\omega 3$

significativamente ($P < 0.001$) inferiore rispetto al gruppo STALLA (rispettivamente 2.09, 1.86 e 3.36). Il rapporto $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$ è risultato in tutti e tre i gruppi comunque inferiore al limite raccomandato (Department of health, 1994). Il rapporto P/S in tutti e tre i gruppi è risultato essere inferiore al limite raccomandato di 0,45, anche se il valore più basso è stato osservato nella carne degli agnelli tenuti al pascolo. Questi risultati sono simili a quelli riportati in letteratura (Velasco *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2005). L'indice aterogenico è variato significativamente ($P < 0.001$) tra 0,79 per gli agnelli del gruppo erba a 1,04 per gli agnelli del gruppo LATTE. I valori determinati per tale indice sono risultati inferiori a quelli riportati da Vacca *et al.*, (2008) per agnelli di razza Sarda (alimentati con latte materno). Valutando gli indici di qualità nutrizionale $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$, P/S ed AI la carne degli agnelli al pascolo è risultata essere qualitativamente superiore alla carne degli altri gruppi ed in particolare rispetto a quella degli agnelli tenuti in stalla ed alimentati con fieno e concentrato.

Tabella 8.13 - Composizione acidica (media \pm ds) della carne degli agnelli sottoposti a tre differenti regimi alimentari e macellati a circa 20-24 Kg di peso vivo.

FAME (%)	Alimentazione			Effetto
	LATTE	STALLA	ERBA	
C10:0	0,38 \pm 0,12	0,28 \pm 0,05	0,40 \pm 0,20	ns
Corta catena	0,38 \pm 0,12	0,28 \pm 0,05	0,40 \pm 0,20	ns
C12:0	0,75 ^a \pm 0,17	0,59 ^{ab} \pm 0,17	0,41 ^b \pm 0,05	*
C14:0	6,76 ^a \pm 0,83	4,94 ^b \pm 0,73	4,52 ^b \pm 0,58	**
C16:0	26,15 ^a \pm 2,17	25,07 ^{ab} \pm 0,92	23,47 ^b \pm 1,40	*
Media catena	33,65 ^a \pm 3,01	30,61 ^{ab} \pm 1,55	28,40 ^b \pm 1,73	**
C18:0	13,79 ^b \pm 1,05	16,76 ^a \pm 0,86	17,83 ^a \pm 1,53	***
C18:1 11t	2,23 ^b \pm 0,31	2,08 ^b \pm 0,29	2,97 ^a \pm 0,49	**
C18:1 9c	31,92 ^{ab} \pm 3,86	30,26 ^b \pm 2,11	34,96 ^a \pm 1,73	*
C18:2 9c,12c	8,73 ^b \pm 1,38	11,67 ^a \pm 1,24	7,12 ^b \pm 0,26	***
C18:3 9c,12c,15c	2,89 ^a \pm 0,62	2,12 ^b \pm 0,31	2,98 ^a \pm 0,32	*
CLA 9c,11t	1,10 ^a \pm 0,11	0,76 ^b \pm 0,16	0,98 ^{ab} \pm 0,19	*
CLA 11t,13c	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,05	ns
C20:4 5c,8c,11c,14c	2,64 ^{ab} \pm 0,34	3,10 ^a \pm 0,73	2,21 ^b \pm 0,39	*
C20:5 5c,8c,11c,14c,17c	0,55 \pm 0,18	0,42 \pm 0,09	0,46 \pm 0,15	ns
C22:5 7c,10c,13c,16c,19c	1,41 \pm 0,35	1,41 \pm 0,26	1,19 \pm 0,37	ns
C22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	0,66 ^a \pm 0,12	0,48 ^b \pm 0,14	0,44 ^b \pm 0,07	*
Lunga catena	65,97 ^b \pm 3,11	69,11 ^{ab} \pm 1,59	71,19 ^a \pm 1,66	**
SFA	47,83 \pm 2,94	47,65 \pm 1,25	46,63 \pm 0,37	ns
MUFA	34,15 ^{ab} \pm 3,72	32,34 ^b \pm 2,05	37,92 ^a \pm 1,28	*
PUFA	18,02 ^{ab} \pm 2,89	20,01 ^a \pm 2,16	15,44 ^b \pm 1,26	*
UFA	52,17 \pm 2,94	52,35 \pm 1,25	53,37 \pm 0,37	ns
$\Sigma\omega3$	5,51 \pm 1,20	4,43 \pm 0,58	5,07 \pm 0,74	ns
$\Sigma\omega6$	11,37 ^b \pm 1,70	14,78 ^a \pm 1,91	9,33 ^b \pm 0,56	***
$\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$	2,09 ^b \pm 0,19	3,36 ^a \pm 0,43	1,86 ^b \pm 0,22	***
AI	1,04 ^a \pm 0,16	0,87 ^{ab} \pm 0,09	0,79 ^b \pm 0,06	**
TI	1,20 \pm 0,16	1,27 \pm 0,07	1,18 \pm 0,06	ns
P/S	0,38 ^{ab} \pm 0,07	0,42 ^a \pm 0,05	0,33 ^b \pm 0,03	*

SFA = acidi grassi saturi, MUFA = acidi grassi monoinsaturi, PUFA = acidi grassi poliinsaturi, UFA = acidi grassi insaturi, $\Sigma\omega3$ = somma acidi grassi omega 3, $\Sigma\omega6$ = somma acidi grassi omega 6. AI = (C12:0 + (C14:0*4) + C16:0)/UFA; TI = (C14:0+C16:0+C18:0)/((0.5* $\Sigma\omega6$)+(0.5*MUFA)+(3* $\Sigma\omega3$)+(3* $\Sigma\omega3/\Sigma\omega6$); P/S = PUFA/SFA. Lettere minuscole diverse sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie, dovuta all'alimentazione. *** P < 0,0001; ** P < 0,001; * P < 0,05; NS, non significativo. ds = stima della deviazione standard.

8.5 Conclusioni

L'obiettivo di questo secondo contributo sperimentale è stato quello di valutare le caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali della carne dell'agnello "leggero" sia di razza sarda, sia di razza ottenuta incrociando pecore Sarde con arieti di razza Ile de France e dell'agnello da "taglio" incrocio F1 (Sarda x Ile de France) sottoposto a differenti regimi alimentari.

La composizione chimica ed il profilo acidico del grasso intramuscolare degli agnelli "leggeri" di razza sarda e degli agnelli "leggeri" incrociati (Sarda x Ile de France) non è stata influenzata dalla razza. Le caratteristiche chimiche della carne degli agnelli da "taglio" incrociati e sottoposti a tre differenti regimi alimentari, non sono state influenzate dal tipo di dieta offerta agli animali, mentre la composizione di alcuni acidi grassi del grasso intramuscolare è risultata essere fortemente influenzata dal tipo di alimentazione a cui gli agnelli erano sottoposti. In particolare il gruppo degli agnelli da "taglio" che venivano allattati dalle madri ed il gruppo degli agnelli al pascolo hanno presentato un profilo acidico molto simile tra loro, relativamente agli acidi grassi linolenico e rumenico, probabilmente perché anche gli agnelli allattati seguendo le madri al pascolo avevano la possibilità di ingerire piccole quantità di erba. Da un punto di vista nutrizionale la carne di questi due gruppi di agnelli è risultata essere migliore rispetto a quella degli agnelli alimentati con fieno di medica e concentrato. Infatti il grasso intramuscolare degli agnelli da "taglio" allattati ed al pascolo è caratterizzato da valori più elevati di acido rumenico (C18:2 9c, 11t), di acidi grassi polinsaturi (PUFA) e del rapporto P/S e per contro da un più basso valore del rapporto $\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$.

Bibliografia

Addis M., Cabiddu A., Pinna G., Decandia M, Piredda G., Pirisi A., and Molle G., (2005). Milk and Cheese Fatty Acid Composition in Sheep Fed Mediterranean Forages with Reference to Conjugated Linoleic Acid cis-9,trans-11. *J. Dairy Sci.*, 88: 3443–3454.

Adlof R. O., Duval S., & Emken E. A., (2000). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans. *Lipids*, 35, 131–135.

Ahnn E. H., Schroeder J. J., (2002). Sphingoid bases and ceramide induce apoptosis in HAT-29 and HCT-116 human colon cancer cell. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 227: 345-353.

Amaducci L., (1988). Phosphatidylserine in the treatment of alzheimers-disease - Results of a multicenter study. *Psychopharmacol Bull*;24:130-134.

Andrikopoulos N. K.,(2002). Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats. *Critical Rev. in Food Sci..Nutr.*; 42(5): 473–505.

Antongiovanni M., Banni S., Buccini A., Cercaci L., Contarini G., Cutrignelli M., Lercker G., Lo Firgo D., Mele M., Minieri S., Nudda A., Piasentier E., Serra A., (2007). Metodi di analisi per lo studio della frazione lipidica del latte, dei prodotti di origine animale e degli alimenti zootecnici. *Edizioni Plus Pisa Italy*.

A.O.A.C., (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15 th edn., n. 960.39, *Ed. Ass. Off. Analyt. Chemists*, Washington.

AOAC, (1990), n.981,10, (metodo Kjeldahl).

Aurousseau B., Bauchart D., Calichon E., Micol D., Priolo A., (2004). Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the M. longissimus thoracis of lambs. *Meat Sci.* 66, 531–54.

Avalli A., Contarini G., (2005). Determination of dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *J. Chrom. A.*; 1071: 185-190.

-
- Banni S.**, Carta G., Contini M.S., Angionni E., Deiana M., Dessi M.A., Melis M.P., Corongiu F.P., (1996). Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products and lamb tissues. *J. Nutr. Biochem.*, 7: 150-155.
- Bauman D. E.**, Baumgard L. H., Corl B. A. , Griinari J.M. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*, 1-15.
- Banni S.**, Angioni E., Carta G., Murru E., Spada S., Melis M. P., (2001). *Proceeding of 1st International Conference on Conjugated Linoleic Acid*. June 10-13, Alesund-Norway. 22.
- Barzanti V**, Battino M, Baracca A, Cavazzoni M, Cocchi M, Noble R, Maranesi M, Turchetto E, Lenaz G (1994). The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Brit. J. Nutr.*, 71: 193-202.
- Bas P.**, Morand-Fer P., (2000). Effect of nutritional factors on fatty acid composition of lamb fat deposits. *Livest. Prod. Sci.*, 64: 61-79.
- Bauman D.E.**, Griinari J.M., (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.*, 23: 203-227.
- Bauman D.E.**, Griinari J.M., (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.*, 23: 203-27.
- Beam T. M.**, Jenkins T. C., Moate P. J, Kohn R. A., and Palmquist D. L., (2000). Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.* 83:2564-2573.
- Beauchesne-Rondeau,E.**, Gascon A., Bergeron J., Jacques H., (2003). Plasma lipids and lipoproteins in hypercholesterolaemic men fed a lipid-lowering diet containing lean beef, lean fish, or poultry. *Am. J.Clin. Nutr.*, 77(3): 587-593.
- Bennun F. R.**, Roth G. A., Monferan C. G., Cumar F. A., (1989). Binding of cholera toxin to pig intestinal mucosa glycosphingolipids: relationship with ABO blood group system. *Infect. Immun.*, 57: 969-974.
- Berlitz H. D.**, Grosch W., Schieberle P., (2009). Food Chemistry. 4th revised and extended ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Bessa** R.J.B., Santos-Silvia J., Ribiero J.M.R., Portugal A.V., (2000). Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Liv. Prod. Sci.*, 63: 201-211.
- Bevers** EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M and Zwaal RF., (1998). Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance. *Biol. Chem.*, 379(8-9): 973-986.
- Bligh** E. G., Dyer E. J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*; 37: 911-917.
- Borghese** A., Terzano G.M., Bartocci S., (1988). L'allevamento intensivo della capra per la produzione di latte di qualità.. *Biologia oggi*, 1: 145- 154.
- Boccard** R., Buchter, L., Casteels E., Cosentino E., Dransfield E., Hood D.E., Joseph R.L., MacDougall D.B., Rhodes D.N., Schon I., Timbergen B.J. and Touraill C., (1981). Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments. Report of a Working Group in the Commission of the European Communities' (CEC) Beef Production Research Programme, *Livest. Prod. Sci.*; 8: 385-397.
- Bonanome** A. & Grundy S. M., (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New Engl J Med*, 318: 1244-1248.
- Buang** Y., Wang Y.M., Cha J.Y., Nagao K., Yanagita T., (2005). Dietary phosphatidylcholine alleviates fatty liver induced by orotic acid. *Nutrition*, 21:867-873.
- Buchman** A.L., Dubin M., Moukarzel A.A., Jenden D., Roch M., Rice K., (1993). Choline deficiency causes tpn-associated hepatic steatosis in man and is reversed by choline-supplemented tpn. *Gastroenterology*, 104:A881.
- Brasitus** T. A.,Dudeja P. K., Dahiya R., (1986). Premalignant alterations in the lipid composition and fluidity of colonic brush border membranes of rats administered 1,2 dimethylhydrazine. *J. Clin. Invest.*, 77: 831-840.
- Breton** L., Serkiz B., Volland J. P., Lepagnol J., (1989). A new rapid method for phospholipid separation by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *J. Chrom.*; 497: 243-249.

- Bruni A.**, Mietto L., Bellini F., Boarato E., Toffano G., (1989). Pharmacological and autopharmacological action of phosphatidylserine. In: NG, Horrocks G., Toffano G., editors. Phospholipids in the nervous system: *Bioc. Mol. pathol.*, Padova: Liviana Press, 217-224.
- Bruni A.**, Mietto L., Secchi F. E., (1995). Inhibition by cholesterylphosphoserine of T-cell-mediated immune responses in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, 17: 517-521.
- Bunger H.**, Pison U., (1995). Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J. Chrom. B: Biomed. Appl.*; 672(1): 25–31.
- Cabiddu A.**, Carta G., Molle G., Decandia M., Addis M., Piredda G., Delogu A., Pirisi A., Lai V., Cera V., Taras L., Lallai C., Banni S., (2005). Relationship between feeding regimen and content of conjugated linolenic in sheep milk and cheese. *Options Méditerranéennes*, 67: 171-175.
- Caboni M.F.**, Menotta S., Lercker G., (1996). Separation and analysis of phospholipids in different foods with a Light-Scattering Detector. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73: 1561-1566.
- Campbell R.G.**, Taverner, M.R., Curic, D.M., (1984). Effect of feeding level and dietary protein content on the growth, body composition and rate of protein deposition in pigs growing from 45 to 90 kg. *Anim. Prod.*, 38: 233–240.
- Canty D.J.**, Zeisel S.H., (1994). Lecithin and choline in human health and disease. *Nutr Rev.*,52:327-339.
- Chilliard Y.**, Ferlay A., Faulconnier Y., Bonnet M., Rouel J., Bocquier F., (2000): Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, 59: 127-134.
- Chilliard Y.**, Ferlay A., Doureau M., (2001). Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.*, 70: 31-48.
- Chilliard Y.**, Ferlay A., Loor J., Rouel J., Martin B., (2002). Trans and conjugated fatty acids in milk from cows and goats consuming pasture or receiving vegetable oils or seeds. *Ital. J. Anim. Sci.*,1: 243-254
- Chilliard Y.**, Ferlay A., Rouel J., Lamberet G., (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.*, 63: 1751-1770.

- Chin S.F.**, Liu W., Storkson J.M., Ha Y.L., Pariza M.W., (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.*, 5: 185-197.
- Christie W.W.**, (1989). Gaschromatography and lipids: A practical guide, 1 st ed. *The Oily Press*, Ayr, Scotland.
- Christie W.W.**, (1990). Gas Chromatography and Lipids. 1nd, *The Oily Press*. Bridgwater, U.K.
- Christie W.W.**, (1982). Lipid Analysis, 2nd, *Pergamon Press*, New York, 1.
- Collomb M.**, Sollberger H., Bütikofer U., Sieber R., Stoll W., Schaeren W., (2004). Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, lenseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int. Dairy J.*, 14: 549-559.
- Commission of the European Communities** (1993). Nutrient and energy intakes for the European Community. *Reports of the Scientific Committee for Food* (Thirty-first series). Luxembourg.
- Cruz-Hernandez, C.**, Deng, Z., Zhou, J., Hill, A. R., Yurawecz, M. P., Delmonte, P., Mossoba, M.M, Dugan, M.E.R., Kramer, J.K.G. (2004). Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *J. of AOAC Int.*, 87, 545–562.
- Corradini C.**, (1995). Chimica e tecnologia del latte, Tecniche nuove, Milano.
- Daghetta A.**. Aspetti tecnologici e nutrizionali. *Istituto Danone*.
- Department of Health** (1994). Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease. *Report on Health and Social Subject No. 46*. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Del Bono G.**, Stefani A., Latte e derivati. Fonti produttive, sistemi di risanamento, controllo igienico-sanitario, qualità e legislazione, *edizioni ETS*, 1997.
- Delmonte P.**, Kataoka A., Corl B.A., Bauman D.E., Yurawecz M.P., (2005). Relative retention order of all isomers of cis/trans conjugated linoleic acid FAME from the 6,8 to 13,15 position using silver ion HPLC with two elution systems. *Lipids*, 40: 509-514.

- Demeyer D.**, and Doreau M., (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proc. Nutr. Soc.* 58:593-607.
- Dietschy J.M.**, (1998). Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *J. Nutr.* 128(Suppl), 444S–448S.
- Dillehay D. L.**, Webb S. K., Schmelz E. M., Merrill A. H., (1995). Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J. Nutr.*, 124: 615-620.
- Dobson G.**, Deighton N., (2001). Analysis of phospholipid molecular species by liquid chromatography—atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of diacylglycerol nicotines. *Chem. Phys. Lipids*; 111(1): 1–17.
- Donovan D.C.**, Schingoethe D.J., Baer R.J., Ryali J., Hippen A.R., Franklin S.T., (2000). Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 83: 2620-2628.
- Doreau M.**, Ferlay A., (1994). Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol*, 45: 379–396.
- Duan, R. D.**, (2005). Anticancer Compounds and Sphingolipid Metabolism in the Colon. *In vivo*, 19: 293-300.
- Eckhardt E.R.**, Wang D.Q.H., Donovan J., Carey M.C., (2002). Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers. *Gastroenterology* 122: 948-956.
- Ensminger A. H.**, Ensminger M. E., Konlade J. E., Robson J. R. K., (1994). *The concise Encyclopedia of Food and Nutrition*. CRC press, Boca Raton, FL, 384-469.
- Enser M.**, Hallett K., Hewett B., Fursey G.A.J., Woog J.D., (1996) Fatty acid content and composition of english beef, lamb and pork at retail. *Meat Sci.*, 42: 443-456.
- Enser M.**, Scollan N., Gulati S., Richardson I., Nute G., Wood J., (2001). The effects of ruminally-protected dietary lipid on the lipid composition and quality of beef muscle. *Proceedings of the 47th Int. Con. Meat Sci. Technol.*, 1: 12–13.
- Fantini J.**, Cook D. G., Nathason N., Spitalik S., Gomzales-Scarano F., (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface

expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:2700-2704.

Fantini J., Hammache D., Delezay O., Yahi N., André-Barrès C., Rico-Lattes I., Lattes A., (1997). Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (Galcer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1-induced fusion and entry. *J. Biol. Chem.*, 272: 7245-7252.

FIL-IDF 182/1999 - Milkfat - Preparation of fatty acid methyl esters.

Fischer L.M., Searce J.A., Mar M.H., Patel J.R., Blanchard R.T., Macintosh B.A., (2005). Ad libitum choline intake in healthy individuals meets or exceeds the proposed adequate intake level. *J Nutr.*, 2005;135:826-829.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H., (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*; 226: 497-509.

Franklin S.T., Martin K.R., Baer R.J., Schingoethe D.J., Hippen A.R., (1999). Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and trans vaccenic acids in milk of dairy cows. *J. Nutr.*, 129: 2048-2054.

French P. C., Stanton C., Lawless F., O’Riordan G., Monahan F. J., Caffrey P. J., (2000). Fatty acid composition including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage or concentrate-based diets. *J. Anim. Sci.*, 78: 2849-2855.

Gault N. F. S., (1992). Structural aspects of raw meat. In: The chemistry of muscle-based foods (Eds.: D.E. Johnston, M.K. Knight, D.A. Ledward). *Royal Soc. Chem.*, Cambridge, 79.

Gillis M. H., Duckett S. K., Sackman J. S., Keisler D. H., (2003). Effect of rumen-protected conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid on leptin and CLA content of bovine adipose depots. *J. Anim. Sci.*, 81 (Suppl. 2): 12 (Abstr.).

Glaser K. R., Scheeder M. R. L., Wenk C., (2000). Dietary C18:1 trans fatty acids increase conjugated linoleic acid in adipose tissue of pigs. *Eur. J. Lipid Sci. and Technol.*, 102: 684–686.

Griinari J. M., Dwyer D.A., McGuire M.A., Bauman D.E., Palmquist D.L., Nurmela K.V.V., (1998). Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.*, 81: 1251-1261.

- Griinari J.M.**, Nurmela K., Dwyer D.A., Barbano D.M., Bauman, D.E., (1999). Variation of milk fat concentration of conjugated linoleic acid and milk fat percentage is associated with a change in ruminal biohydrogenation. *J. Anim. Sci.*, 77 (Suppl.1):117-118 (Abstr.).
- Griinari J.M.**, Corl B.A., Lacy S.H., Chouinard P.Y., Nurmela K.V.V., Bauman D.E., (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *J. Nutr.*, 130: 2285-2291.
- Guan Z.**, Grunler J., Piao S., Sindelar P. J., (2001). Separation and quantitation of phospholipids and their ether analogues by highperformance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*; 297(2): 137–143.
- Gunnarsson T.**, Ekblad L., Karlsson A., Michelsen P., Odham G., Jergil B., (1997). Separation of polyphosphoinositides using normal-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection or electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.*; 254(2): 293–296.
- Gurr M. I.** and James A. T., (1971). Lipid Biochemistry and Introduction. *Cornell University Press*, Ithaca, NY, 1971, p. 1.
- Gurr M.**, Borlak N. & Ganatra S., (1989). Dietary fat and plasma lipids. *Nutrition Research Reviews*, 1: 57-78.
- Gurr M.**, (1998). Dietary $\omega 6/\omega 3$ polyunsaturates balance: is it important? *Lipid Technol.*, 10: 14-16.
- Hara A.**, Radin N., (1978). Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Anal. Biochem.*; 90: 420-426.
- Harfoot C. G.**, (1981). In Lipid Metabolism in Ruminant Animals, pp. 21-55 [W. W. Christie, editor]. Oxford: Pergamon Press.
- Harfoot C.G.**, Hazlewood G.P., (1988). Lipid metabolism in the rumen. In: P.N. Hobson (Ed.) The Rumen Microbial Ecosystem. pp 285-322. *Elsevier Applied Science Publishers*, London.
- Harfoot C.G.**, Hazlewood G. P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. *In: The Rumen Microbial Ecosystem, 2nd, Elsevier Science Publishing*, New York, USA.
- Hannun Y. A.** & Bell R. M., (1989). Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, Vol 243, Issue 4890, 500-507.

- Hakomori S. I.**, (1991). Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signalling and mediators for cellular interactions. *J. Biol. Chem.*, 265:18713-18716.
- Hegsted D.M.**, McGandy, R.B., Stare, F.J., (1965). Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr.*, 17: 281-295.
- Hermetter A.**, Paltauf F., Hauser H., (1982). Synthesis of diacyl and alkylacyl glycerophosphoserines. *Chem. Phys. Lipids*, 50:35-45.
- Heron S.**, Dreux M., Tchaplal A., (2004). Post-column addition as a method of controlling triacylglycerol response coefficient of an evaporative light scattering detector in liquid chromatography-evaporative light-scattering detection. *J. Chrom. A*; 1035(2): 221–225.
- Hodgson J.**, Burke V., Beilin L. J., Puddey I. B., (2006). Partial substitution of carbohydrate intake with protein intake from lean red meat lowers blood pressure in hypertensive persons. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83: 780–78.
- Hornstein I.**, Crowe P. F., Heimberg M. F., (1961). Fatty acid composition of meat tissue lipids. *J. Food Sci.*, 26: 581-586.
- Hoving E. B.**, (1995). Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *J. Chrom. B: Biomed. Appl.*; 671(1–2): 341–362.
- Howell W. H.**, McNamara D. J., Tosca M. A., Smith B. T., Gaines J. A., (1997). Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: A metaanalysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65(6): 1747–1764.
- Hughes P.E.**, Hunter W.J. Tove, S.B., (1982). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9, trans-11- octadecadienoate reductase. *J. Biol. Chem.*, 257: 3643–3649.
- Imaizumi K.** Tominaga A., Sato M., Sugano M., (1992). Effects of dietary sphingolipids on levels of serum and liver lipids in rats. *Nutr. Res.*, 12: 543-548.
- I.N.N.**, (1997). Linee guida per una sana alimentazione italiana. Istituto nazionale della nutrizione. <http://inn.ingrm.it>. Roma

Institute of medicine and national academy of sciences USA, (1998). Dietary reference intakes for folate, thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington D.C.: *National Academy Press*.

Ip C., Jiang C., Thompson H.J., Scimeca A.J., (1997). Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66: 1523-1529.

Ip M.M., Masso-Welch P.A., Ip. C., (2003). Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of the stroma and the epithelium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 8:103–118.

ISO 1443:1973. Meat and meat products -- Determination of total fat content.

Jacobs B. C., Hazenberg M. P., Van Doorn P. A., Endtz H. P., Van der Mechè F. G. A., (1997). Cross-reactive antibodies against gangliosides and *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides in patients with Guillain-Barre or Miller Fisher syndrome. *J. Infect. Dis.*, 175: 729-733.

Jensen R.G., (2002). The composition of milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.*, 85: 295:350

Jeronimo E., Alves S. P., Prates J. A. M., Santos-Silva J., Bessa R. J. B., (2009). Effect of dietary replacement of sunflower oil with linseed oil intramuscular fatty acids of lamb meat. *Meat Sci.*, in press.

Jiang J., Bjoerck L., Fonden R., Emanuelson M., (1996). Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: Effects of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci.*, 79: 438-445.

Jorissen B.L., Brouns F., Van Boxtel M.P.J., Ponds R.W.H.M., Verhey F.R.J., Jolles J., (2001). The influence of soy-derived phosphatidylserine on cognition in age-associated memory impairment. *Nutr Neurosci.*, 4:121-134

Juarez M., Horcada A., Alcalde M. J., Valera M., Polvillo O., Molina A., (2009). Meat and fat quality of unweaned lambs as affected by slaughter weight and breed. *Meat Sci.*; 83: 308-313.

Jump, D. B., (2002). The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. . *Biol. Chem.*, Vol. 277, Issue 11: 8755-8758.

- Jungalwala** FB, Turel RJ, Evans JE and McCluer RH., (1975). Sensitive analysis of ethanolamine- and serine-containing phosphoglycerides by high-performance liquid chromatography. *Biochem. J.*; 145(3): 517–526.
- Kaluzny** M. A., Duncan L. A., Merritt M. V., Epps D. E., (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res.*;26(1):135-40.
- Kay** J.K., Mackle T.R., Auldism M.J., Thompson N.A., Bauman D.E., (2002). Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 85 (suppl. 1): 176 (Abstr.).
- Kay** J.K., Mackle T.R., Auldism M.J., Thomson N.A., Bauman D.E., (2004). Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *J. Dairy Sci.*, 87: 369-378.
- Karlsson**, K. A., (1986). Animal glycolipids as attachment sites for microbes. *Chem. Phys. Lipids*, 42: 153-172.
- Kates** M., (1986). Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. *Elsevier*, New York, 1986, 1.
- Keeny** M., (1970). Lipid metabolism in the rumen. In Phillipson, A.T. (ed.) Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant.. *Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne*: 489-503.
- Kemp** P., Lander D.J., (1984). Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J Gen Microbiol.*, 130: 527-533.
- Kemp** P., Lander D.J., Gunstone F.D., (1984). The hydrogenation of some cis- and trans-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. *Br. J. Nutr.*, 52: 165-170.
- Kepler** C.R., Hirons K.P., McNeill J.J., Tove, S.B., (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem*, 241: 1350-1354.
- Kepler** C.R., Tucker W.P., Tove S.B., (1970). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate 12-cis, 11-trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 245: 3612-3620.
- Keys** A., Anderson J. T., Grande F., (1965). Serum cholesterol responses to change in diet. IV: Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism*, 14:776-787.

-
- Keys A.**, (1970). Coronary heart disease in seven countries. *American Heart Association Monograph*, No. 29.
- Khanal R.C.**, Dhiman T.R., McMahon D.J., Boman R.L., (2002). Influence of diet on conjugated linoleic acid content of milk, cheese and blood serum. *J. Dairy Sci.*, 85: (Suppl. 1): 142 (Abstr.).
- Khosla P.**, Sundram K., (1996). Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol. *Prog. Lipid Res.*, 35: 93-132.
- Kobayashi T.**, Shimizugawa T., Osakabe T., Watanabe S., Okuyama H., (1997). A long-term feeding of sphingolipids affected the levels of plasma cholesterol and hepatic triacylglycerol but not tissue phospholipids and sphingolipids. *Nutr. Res.*, 17:111-114.
- Kraft J.**, Jahreis G., (2001). Conjugated linoleic acids: formation and metabolic effects. *Ernaehrungs-Umschau*, 48: 348.
- Kramer J.K.G.**, Sehat N., Fritsche J., Mossoba M.M., Eluit K., Yurawecz M.P., Ku Y., (1999). Separation of Conjugated Fatty Acid Isomers. In *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research Vol 1*. Ed. Yurawecz M.P, Mossoba M.M., Kramer J.K. G., Paria M.W., Nelson G.J., (1999). *AOCS Press*, Champaign, IL.
- Kramer J.K.G.**, Cruz-Hernandez C., Deng Z., Zhou J., Jahreis G., Dugan M.E.R., (2004). Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79: 1137-1145.
- Kramer J. K. G.**, Fellner V., Dugan M. E. R., Sauer F. D., Mossoba M. M., Yurawecz M. P., (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*;32: 1219-1228.
- LARN** (1996). Livelli di assunzione raccomandati di energia e nutrienti per la popolazione italiana; 63-67.
- Larson B. L.**, (1979). Biosynthesis and secretion of milk proteins: a review. *J. Dairy Res.*, 46: 161.
- Lehninger A. L.**, (1987). *Biochimica*, vol. II . Edit. Zanichelli, Bologna.
- Lehninger A. L.**, Nelson D. L., Cox M. M., (2002). *Principi di Biochimica*. III ed. Zanichelli, Bologna.

- Li D.**, Sinclair A. J., Mann N., Turner A., Ball M., Kelly, F., (1999). The association of diet and thrombotic risk factors in healthy male vegetarians and meat-eaters. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53, 612–619.
- Lieber C.S.**, Decarli L.M., Mak K.M., Kim C.I., Leo M.A., (1990). Attenuation of alcohol-induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. *Hepatology*, 12:1390-1398.
- Lieber C.S.**, Robins S.J., Li J.J., Decarli L.M., Mak K.M., Fasulo J.M., (1994). Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterology*, 106:152-159.
- Lima A.**, (2002). High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *An. Chim. Acta*; 465: 81–91.
- Lekim D.**, Betzing H., (1976). Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.*, 357:1321-1331.
- Lock A. L.**, Garnsworthy P. C., (2002). Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Anim. Sci.*, 74: 163-176.
- Lock A. L.**, Bauman D. E., (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, 39:1197–1206.
- Loor J. J.**, Herbein J. H., Polan C. E., (2002). Trans18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *J. Dairy Sci.*, 85: 1197-1207.
- Martinelli & Cabras**, (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin Nuova Libreria. Padova.
- Max L. Foster, Jr.** and Sharon E. Gonzales, (1992). *J. of AOAC Intern.*, Vol. 75 n°2, 288-292.
- McGuire M.A.**, McGuire M.K., Ritzenthaler K., Shultz T.D. Dietary sources and intakes in humans, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. Ed. Yurawecz M.P, Mossoba M.M., Kramer J.K. G., Paria M.W., Nelson G.J., (1999). *AOCS Press*, Champaign, IL.
- McGuire M.A.**, McGuire M.K., (2000). Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*, 1999. Available at <http://www.asas.org/JAS/symposia/proceeding/0938pdf>. Accessed 4 april 2006.

- Mensink** R. P. & Katan M. B.,(1992). Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A Metaanalysis of 27 trials. *Arter. Thromb.*,12: 911-919.
- Merchant** T. E., Diamantis P. M., Lauwers G., Haida T., Kasomos J. N., Guillem J., Glonek T., Minsky B. D., (1995). Characterization of malignant colon tumors with 31P nuclear magnetic resonance phospholipid and phosphatic metabolite profiles. *Cancer*, 76: 1715-1723.
- Moloney** A. P., (1997). Growth and carcass composition in lambs with different ruminal fermentation patterns. *Proceedings of the 48th Annual meeting of European Association of Animal Production*. Vienna.
- Moloney**, A.P., Mooney, M.T., Kerry, J.P. and Troy, D.J. (2001). Producing tender and flavoursome beef with enhanced nutritional characteristics. *Proceedings of the Nutrition Society* 60: 221-229.
- Mulder** H., P.Walstra. (1974). The Milk Fat Globule. Emulsion Science as Applied to Milk Products and Comparable Foods. *Commonwealth Agricultural Bureaux*, Farnham Royal, Bucks, UK.
- Murphy** J.J., McNeill G.P., Connolly J.F., Gleeson P.A., (1990). Effect on cow performance and milk fat composition of including full fat soybean and rapeseed in the concentrate mixture for lactating dairy cows. *J. Dairy Res.*, 57: 295-306.
- Naitana** S., Nuvole P., Marongiu A. Lattazione, in: G. Aguggini, V. Beghelli, e L.F. Giulio, *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*, *UTET*, 781-808, Torino, 1992.
- Newburg** D. S., Chaturvedi P., (1992). Neutral glycolipids of human and bovine milk. *Lipids*, 27: 923-927.
- Nuernberg** K., Nuernberg G., Ender K., Lorenz S., Winkler K., Rickert R., Steinhart H., (2002). N-3 fatty acids and conjugated linoleic acids of longissimus muscle in beef cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 463– 471.
- Nichols** B.W., (1963). Separation of the lipids of photosynthetic tissues: Improvements in analysis by thin-layer chromatography. *Biochem. Bioph. Acta*, 70:417-422.
- Noci**. F., O’Kiely, P., Monahan, F.J., Stanton, C. and Moloney, A.P., (2005b). Conjugated linoleic acid concentration in m. longissimus dorsi from heifers offered sunflower oil-based concentrates and conserved forages. *Meat Sci.*, 69: 509-518.

- Noè L.**, Feligini M., (1999). Il latte di capra un alimento antico. *Informatore Zootecnico*, Edagricole, Bologna, 9: 64-66.
- Olsson N. U.**, Salem N. Jr., (1997). Molecular species analysis of phospholipids. *J. Chrom. B: Biomed. Sci. Appl.*; 692(2): 245–256.
- Pacetti D.**, Malavolta M., Bocci F., Boselli E., Frega N. G., (2004). Highperformance liquid chromatography/electrospray ionization iontrap tandem mass spectrometric analysis and quantification of phosphatidylcholine molecular species in the serum of cystic fibrosis subjects supplemented with docosahexaenoic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; 18(20): 2395–2400.
- Pariza M.W.**, Ashoor S.H., Chu F.S., (1979). Mutagens in heat-processed meat, bakery and cereal products. *Food Cosmet. Toxicol.*, 17: 429-430.
- Pariza M.W.**, Hargraves W.A., (1985). A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12- dimethyl-benz[a]anthracene. *Carcinogenesis*, 6: 591–593.
- Pariza M.W.**, Park Y., Cook M., Albright K., Liu W., (1996). *FASEB J.*, 10, 3227-3235.
- Parodi P.W.**, (1994). Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Aust. J. Dairy Tec.*, 40: 93-97.
- Pipero L.S.**, Sampugna J., Teter, B.B., Kalscheur K.F., Yurawecz M.P., Ku Y., Morehouse K.M., Erdman R.A., (2002). Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J. Nutr.*, 132: 1235-1241.
- Pepeu G.**, Casamenti F., Scali C., Jeglinski W., (1993). Effect of serine phospholipids on memory and brain cholinergic mechanism in ageing rats. *Neurosci. Res. Comm.*, 13 (suppl.):S63-66.
- Pepeu G.**, Pepeu I.M., Amaducci L., (1996). A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects. Is phosphatidylserine a drug for the ageing brain? *Pharmacol. Res.*, 33: 73–80.
- Pepeu G.**, (2003). Is there evidence that phospholipid administration is beneficial for your brain? In: Szuhaj BF, van Nieuwenhuyzen W, editors. Nutrition and biochemistry of phospholipids. Illinois, USA: American oil association press, p. 30-39.
- Pepping J.**, (1999). Phosphatidylserine. *Am J Health Syst Pharm*, 56:2038-2044.

- Perez-Palacios T.**, Ruiz J., Martin D., Muriel E., Antequera T., (2008). Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chem.*; 110: 1025-1029.
- Perona J. S.**, Ruiz-Gutierrez V., (2003). Simultaneous determination of molecular species of monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols in human very-low-density lipoproteins by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chrom. B, An. Technol. in the Biomed. and Life Sci.*; 785(1): 89–99
- Poulson C. S.**, Dhiman T. R., Ure A. L., Cornforth Daren P., Olson K. C., (2004). Conjugated Linoleic Acid content of beef from cattle fed diets containing high grain, CLA, or raised on forages. *Livest. Prod. Sci.*, 91: 117-128.
- Pinkart H. C.**, Devereux R., Chapman P.J., (1998). Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *J. Microbiol. Methods*; 34: 9–15.
- Piva G.**, Masoero F., Prandini A., (1989). Factors affecting milk fat composition. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 40: 253-275.
- Pulfer M.**, Murphy R. C., (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.*; 22(5): 332–364.
- Realini C. E.**, Duckett S. K., Brito G. W., Dalla Rizza M., & De Mattos D., (2004). Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Sci.*, 66, 567–577.
- Robins S. J.**, Patton G. M., (1986). Separation of phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography: potentials for use in metabolic studies. *J. Lipid Res.*; 27(2): 131–139.
- Romeo G.**,(2001). Cibi funzionali manna o ciarlataneria? Così carne e latte ci proteggono. *Le Scienze*. 399: 118-124.
- Ruiz J.**, Antequera T., Andrei A. I., Patron M. J, Muriel E., (2004). Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Anal. Chim. Acta*; 520: 201-205.
- Ruiz-Gutierrez V.**, Perez-Camino M. C., (2000). Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr. A*, 885, 321–341.

- Sackman** J. R., Duckett S. K., Gillis M. H., Bealin C. E., Parks A. H., Egelston R. B., (2003). Effects of forage and sunflower levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J. Anim. Sci.*, 81: 3174-3181.
- Saito** H., Ishihara K., (1997). Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1531–1536.
- Salvadori del Prato** O., Trattato di tecnologia casearia, Calderoni *Ed. agricole*, 2001.
- Santos-Silva** J., Bessa R. J. B., Santos-Silva F., (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs II. Fatty acid composition of meat. *Livest. Prod. Sci.*, 77: 187-194.
- Schmelz** E. M., Dillehay D. L., Webb S. K., Reiter A., Adams J., Merrill A. H., (1996). Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, 56: 4936-4941.
- Schmelz** E. ., Bushnev A., Dillehay D. L., Sullards M., Liotta D., Merrill A. H. Jr, (1999). Ceramide-Beta-D-glucuronide: synthesis, digestion, and suppression of early markers of colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, 59: 5768-5772.
- Schmelz** E. M., Sullards M. C., Dillehay D. L., Merrill A. H., (2000). Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine treated CF1 mice. *J. Nutr.*, 130: 522-527.
- Schultz**, H.W., Anglemier, A.F., (1964). (Eds.): Proteins and their reactions. *AVI Publ. Co.*:Westport, Conn.
- Scollan** N. D., Choi N. J., Kurt E., Fisher A. V., Enser M., Wood J. D., (2001). Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *Br. J. Nutr.*, 85(1): 115–124.
- Scollan** N., Hocquette J., Nuernberg K., Dannenberger D., Richardson I., Moloney A., (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.*, 74(1): 17–33.
- Sheard** N.F., Tayek J.A., Bistran B.R., Blackburn G.L., Zeisel SH. (1986). Plasma choline concentration in humans fed parenterally. *Am J Clin Nutr*;43:219-224.

- Sehat N.**, Kramer J.K.G., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Roach, J.A.G., Eulitz K., Morehouse K.M., (1998). Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids*, 33: 963-971.
- Sheard N.F.**, Tayek J.A., Bistran B.R., Blackburn G.L., Zeisel S. H., (1986). Plasma choline concentration in humans fed parenterally. *Am J Clin Nutr* ,43:219-224.
- Schmidt D. G.**, (1980). Colloidal aspects of casein. *Neth Milk Dairy J.*:34-42.
- Serra A.**, Mele M., La Comba F., Conte G., Boccioni A., Secchiari P., (2009). Conjugated Linoleic acid (CLA) content of meat from three muscles of Massese suckling lambs slaughtered at different weights. *Meat Sci.*, 81: 396-404.
- Shirouchi B.**, Nagao K., Inoue N., Ohubo T., Hibino H., Yanagita T., (2007). Effect of dietary omega3-PC on obesity-related disorders in obese OLEFT rats. *J. Agric. Food Chem.* 55:7170-7176.
- Sprong R.C.**, Hulstein M.F.E, van der Meer R., (2002). Bovine milk fat components inhibit food-borne pathogens. *Int. Dairy J.*, 12: 209–215.
- Spada S.**, Fiori M., Addis M, Fois N., Sitzia M., (2009). Effect of feeding system on growing lamb performance, on meat macronutrients, α -tocopherol and fatty acid content. 15th meeting of the FAO-CIHEAM Mountain Pastures Network– 7-9 Ottobre 2009, Les Diablerets Svizzera.
- Stith B. J.**, Hall J., Ayres P., Waggoner L., Moore J.D., Shaw W. A., (2000). Quantification of major classes of Xenopus phospholipids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Lipid Res.*; 41(9): 1448–1454.
- Storlien L. H.**, Kriketos, A. D., Calvert, G. D., Baur, L. A., and Jenkins, A. B., (1997). *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids*, 57: 379-385.
- Suchocka Z.**, Gronostajska D., Suchocki P., Pachecka J., (2003). New HPLC method for separation of blood plasma phospholipids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 32(4–5): 859–865.
- Turpeinen A. M.**, Mutanen M., Aro A., Salminen I., Basu S., Palmquist D. L., (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76: 504–510.

- Thudichum** J. L. W., (1884). A Treatise on the Chemical Constitution of Brain. *Bailliere, Tindall, and Cox*, London: p 149.
- Tripaldi** C., Catillo G., Martillotti F., Angeluci M., (1997). Influence of some characteristics of diet on milk quality of water buffalo. *Buffalo J.*, 1: 1-13.
- Ulbricht** T.L.V., Southgate, D.A.T. (1991) Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338, 985-992.
- Urbetalle** A., Bianchi M., Marzocco P., (1980). Caratteristiche annonarie del latte di capra e variazioni determinate dai fattori zootecnici. *La Rivista della società italiana di Scienza dell'Alimentazione*, 1: 21-26.
- Vacca** G. M., Carcangiu V., Dettori M. L., Pazzola M., Mura M. C., Luridiana S., Tilloca G., (2008). Productive performance and meat quality of Mouflon x Sarda and Sarda x Sarda suckling lambs. *Meat Sci.*, 80: 326-334.
- Van Nevel** C. J., and Demeyer D. I., (1995). Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: Inhibition by antimicrobials. *J. Dairy Sci.* 78:2797-2806.
- Van Nevel** C. J., and Demeyer D. I., (1996b). Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 36:53-63.
- Velasco** S., Caneque V., Perez C., Lauzurica S., Diaz M. T., Huidobro F., Manzaneres C., Gonzales J., (2001). Fatty acid composition of adipose depots of suckling lambs raised under different production systems. *Meat Sci.*, 59: 325-333.
- Vernon** R. G. and Flint D. J., (1988). Lipid metabolism in farm animals. *Proc. Nut.Soc.*, 41: 287-293.
- Vesper** H., Schmeitz E.M., Nikolova-Karakashian M.N., Dillehay D.L., Lynch D.V, Merill A.H.Jr., (1999). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nutr.*, 129: 1239–1250.
- Verhulst** A., Janssen G., Parmentier G., Eyssen H., (1987). Isomerization of polyunsaturated fatty acids by Propionibacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 9: 12-15.
- Weihrauch** J.L.; Son, Y.S., (1983). The phospholipid content of foods. *JAOCS*, 60; 1971-1978.

WHO (1990) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases , *Technical Report Series 797*. Geneva, WHO.

WHO (2002). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, *Technical Report Series 916*. Geneva, WHO.

Wolff T., Wanders H., Guengerich F., P., (1989). Organic solvents as modifiers of aldrin epoxidase in reconstituted monooxygenase systems and in microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 38 (2): 4217-4223.

Wood J. D., Enser M., (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of anti-oxidants in improving meat quality. *Br. J. Nutr.*, 78: S49–S60

Wood J.D. , Richardson R.I., Nute G.R., Fisher A.V., Campo M.M., Kasapidou E., Sheard P.R., Enser M., (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.*, 66: 21-32.

Yanagita T., (2003). Nutritional functions of dietary phosphatidylinositol. *Inform*, volume 14(2); 64-66.

Yanagita T., Nagao K., (2008). Functional lipids and the prevention of the metabolic syndrome. Asia Pac.. *J. Clin. Nutr.*, 17(S1): 189-191.

Yokoyama M.T., Davis, C.L., (1971) Hydrogenation of unsaturated fatty acids by *Treponema* (Borrelia) strain B25, a rumen spirochete. *J Bacteriol.*, 107, 519-527.

Vanhoutte B., Rombaut R., Dewettinck K, Van der Meeren P., (2004). Phospholipids. *Food Anal.*, Vol 1.; 349–382. L. M. L. Nollet, ed. Marcel Dekker, New York, NY.

Zhang L., Hu S., Cook L., Dovichi N. J., (20029). Analysis of aminophospholipid molecular species by methyl-beta-cyclodextrin modified micellar electrokinetic capillary chromatography with laserinduced fluorescence detection. *Electrophoresis*; 23(17): 3071–3077.

Zemski Berry K. A., Murphy R. C., (2004). Electrospray ionization tandem mass spectrometry of glycerophosphoethanolamine plasmalogen phospholipids. *J. of the Amer. Soc. Mass Spec.*, 15(10): 1499-1508

Zeisel S.H., Growdon J.H., Wurtman R.J., Magil S.G., Logue M., (1980). Normal plasma choline responses to ingested lecithin. *Neurology*;30:1226-1229.

Zeisel S. H., daCosta K. A. , Franklin P. D., Alexander E. A., Lamont J. T., Sheard N. F., Beiser A.(1991). Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB*, 5:2093-2098.

Zopf D., (1996). Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet*, 347: 1017-1021.

Ringraziamenti

I miei più sentiti e sinceri ringraziamenti alla Dott.ssa Margherita Addis che ha con grande professionalità supportato scientificamente questo lavoro di Tesi. Grazie Margherita per i tuoi preziosi e determinanti consigli.

Un grazie alla Dott.ssa Francesca Scintu e al Dott. Giovanni Piredda per aver messo a mia disposizione i laboratori di chimica dell'Agenzia AGRIS Sardegna.

Grazie ai colleghi dei settori di chimica e chimica zootecnica del DIRPA Daniele Petretto, Adriano Porcu, Marzia Picinelli, Antononella Sanna e Martino Del Rio per il loro prezioso aiuto.

Un grazie al collega e amico Dott. Enrico Salvatore con il quale ho iniziato e condiviso gran parte di questa esperienza formativa.

Ringrazio la Dott.ssa Claudia Zazzu per il suo quotidiano sostegno.

Uno speciale ringraziamento va poi alla Dott.ssa Simona Spada, per essermi stata sempre vicina in questi tre anni, per avermi sopportato anche nei momenti di difficoltà e per avermi sempre saputo dare una parola d'incoraggiamento.

Infine ma non per ultimo desidero ringraziare Pierluigi che con la sua presenza e infinita pazienza ha condiviso ogni momento di questa Tesi di Dottorato.