



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ANIMALI

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

**Determinazione quantitativa del profilo acido del latte
con particolare riferimento agli isomeri
coniugati dell'acido linoleico**

**Qualitative assessment of milk fatty acidic profile with
emphasis on the active isomers of conjugated linoleic acid**

Relatore: Prof. Schiavon Stefano

Correlatori: Dott. Dal Maso Matteo

Laureando: Pellegrin Nicola
matricola n. 520204

ANNO ACCADEMICO 2007 – 2008



Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Schiavon Stefano e il dottor Dal Maso Matteo per prezioso aiuto che mi è stato elargito durante questa esperienza di tesi.

Uno speciale ringraziamento va assolutamente espresso al Perito Agrario Luca Grigoletto, tecnico di laboratorio presso il DSA, per la grande disponibilità e pazienza con cui mi ha seguito durante tutte le attività di laboratorio. La sua professionalità è stata essenziale per la buona riuscita di questo lavoro.

Ringrazio mio padre, mia madre e mia sorella che, con amore, pazienza e saggezza mi sono sempre stati vicini e mi hanno sostenuto soprattutto nelle difficoltà. Infine mio nonno Danilo che mi ha insegnato a non mollare, a credere in me stesso e nei miei sogni, a onorare il prossimo ponendosi a lui con rispetto e senza esaltarsi.

A tutti voi grazie.

Riassunto

I prodotti lattiero-caseari sono alimenti di grande importanza nella dieta umana per le intrinseche caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche. La frazione lipidica del latte, in particolar modo, essendo la principale fonte di CLA (conjugated linoleic acid), nell'alimentazione umana.

Seguendo questo principio, negli ultimi anni, sono state condotte numerose ricerche volte a comprendere i processi di sintesi naturale di tali sostanze e valutarne un aumento dei contenuti nel latte e nella carne anche attraverso la somministrazione di prodotti esogeni. Dal momento che i diversi isomeri CLA possiedono proprietà biologiche differenziate è importante sviluppare metodologie di analisi in grado di determinarne i contenuti quanti-qualitativi, nelle diverse matrici biologiche.

Nella seguente sperimentazione è stata messa a punto e descritta una metodica di valutazione quanti-qualitativa degli acidi grassi, presenti nel latte, partendo da una metodica di base già operativa presso il Dipartimento di Scienze Animali. A questa sono state apportate diverse modifiche per consentire la valutazione quantitativa delle singole forme isomeriche. Le variazioni hanno riguardato:

- la scelta della colonna di separazione (colonna capillare HP-88, lunga 100 m);
- la costruzione delle rette di taratura;
- la validazione delle misure.

La metodica di analisi è stata poi applicata per l'analisi di campioni di latte prelevati durante una sperimentazione in corso presso l'azienda sperimentale "Lucio Toniolo" dell'Università di Padova, situata in Legnaro (PD). La prova consisteva nella somministrazione di un integratore, contenente isomeri CLA, ad tre gruppi di bovine omogenei per produzione, giorni di lattazione, body condition score e ordine di parto.

Dalla metodica messa a punto è stato riscontrato che, l'utilizzo di supplementi a base di CLA, ha provocato una variazione della frazione lipidica nel latte a favore degli stessi CLA, migliorando ulteriormente le caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche del latte. Dai risultati si evince inoltre che l'accuratezza delle rette di taratura ha permesso di individuare valori precisi dei vari analiti, come ad esempio, per i due isomeri oggetto di studio, si sono riscontrati valori di correlazione pari a 0,9998 per il CLA C18:1 *cis*-9,

trans-11 e 0,9994 per il CLA C18:2 *trans*10,*cis*12. questo ha permesso di ottenere un cromatogramma accurato, completo e leggibile per tutti gli acidi grassi analizzati.

Per quanto concerne la verifica della ripetibilità delle misure si è accertato che le misure sono più accurate all'aumentare degli atomi di carbonio dei singoli acidi grassi, con valori più accurati compresi fra i 14 ed i 18 atomi di carbonio. La deviazione standard trovata nelle ripetizioni effettuate è stata in media pari a 1,63% con valore minimo di 0,35% nel caso dell'acido oleico (C18:1 *cis n*-9) ed un valore massimo di 7,58% per l'acido cervonico (C22:6 *n*3).

Dalle analisi effettuate nei laboratori del Dipartimento di Scienze Animali è stato riscontrato che, l'utilizzo di integratori a base di CLA, provoca una diminuzione della quantità di grasso nel latte ed un tendenziale aumento della produzione di latte e proteine. All'aumentare della quantità di integratore fornito agli animali, si è notato un aumento significativo degli acidi grassi mono e poli insaturi con 18 atomi di carbonio, tuttavia gli acidi grassi che hanno subito un marcato trasferimento nel latte sono stati l'acido vaccenico e i due isomeri CLA oggetto di sperimentazione.

Abstract

Milk products are widely utilized in human nutrition for its several nutritional properties. Milk fat content, especially, is the main source of conjugated linoleic acid (CLA) in human nutrition. In the last years the research focus on their nutritional properties and the goal is to enhance these positive fats in milk and meat. Every CLA isomer has different positive or negative biological properties so is important to develop a method to find the qualitative and quantitative content of different isomeric forms of CLA. The aim of this work was to develop a new quantitative and qualitative evaluation method to quantify free fatty acids in milk based on the method already used in our laboratories. A second aim was to evaluate the acidic profile of milk collected from an experiment where cows received different dosage of a supplement containing CLA isomers.

The accuracy of the calibration curve was high for the two isomers of CLA. For C18:2 *cis-9,trans-11* the correlation value was 0,9998 and 0,9994 for CLA C18:2 *trans-10, cis-12*. The measurement of repeatability was more accurate for the fatty acids that have from 14 to 18 C atoms. The validation of the data collected was successful. Milk samples were collected during the experiment from 12 dairy cow balanced for milk yield, days in milk and body condition score. The cows were divided in 3 groups supplemented with different levels of CLA in the diet (40 and 80 g/day for low dose CLA and high dose of CLA respectively) and treated to a 3 x 3 Latin Square design. Increasing doses of CLA linearly reduced milk fat content (3,9 to 3,1%; $P < 0,01$), but increased the content of C18 mono and polyunsaturated fatty acids. The transfer of the CLA C18:2 *trans-10, cis-12* isomer to milk averaged 6%. From the results of the analyses done with the improved method of analysis we concluded that low doses of CLA can be supplemented in a dairy cow diet to reduce milk fat content and to enhance the quantity of positive fatty acids in milk.

Indice

Riassunto	5
Abstract	7
1.- Introduzione	11
1.1- Il latte: frazioni lipidiche	11
1.2- Acidi grassi	12
1.1.2- Acidi grassi saturi	13
1.1.3- Acidi grassi insaturi	15
1.1.4- Acidi grassi Monoinsaturi (MUFA)	16
1.1.5- Acidi Grassi Polinsaturi (PUFA)	17
1.1.6- Acidi Grassi trans-insaturi	19
1.1.7- Coniugati dell'acido linoleico (CLA): aspetti biochimici ed effetti nutraceutici...	20
1.3- Metodologie di analisi	24
1.3.1- Preparativa	25
1.3.2- Separazione e analisi	25
2- Obiettivi	27
3- Materiale e metodi	29
3.1- Scopo e campo di applicazione	29
3.2- Principio del metodo	29
3.3- Reagenti e materiali	30
3.4- Apparecchiatura	34
3.5- Taratura	36
3.5.1- Retta di taratura	36
3.5.2- Standard interno	37
3.6- Analisi del campione	38

3.6.1- Preparazione.....	38
3.6.2- Estrazione dei lipidi.....	38
3.7- Trans-esterificazione.....	43
3.8- Determinazione gascromatografica (GC).....	44
3.9- Espressione dei risultati.....	45
3.10- Controlli.....	46
A- Controllo buon funzionamento GC.....	46
B- Controllo bianco GC.....	46
C- Controllo standard GC.....	46
3.11- Validazione.....	46
3.12- Applicazione della metodica per l'analisi del profilo acidico di latte raccolto da bovine in prova riceventi diversi livelli di CLA con un additivo rumino- protetto.....	46
3.13- analisi statistica per i quadrati latini:.....	50
3.13.1- modello standard.....	50
3.13.1- modello testato.....	50
4.- Risultati e discussione.....	51
4.1- Retta di taratura.....	51
4.2- Valutazione della ripetibilità delle misure.....	53
4.3- Composizione acidica del latte.....	56
4.4- Valutazione della variabilità individuale dei profili acidi del latte.....	59
5.- Conclusioni.....	61
6.- Bibliografia.....	63
7.- Abbreviazioni.....	67

1. INTRODUZIONE

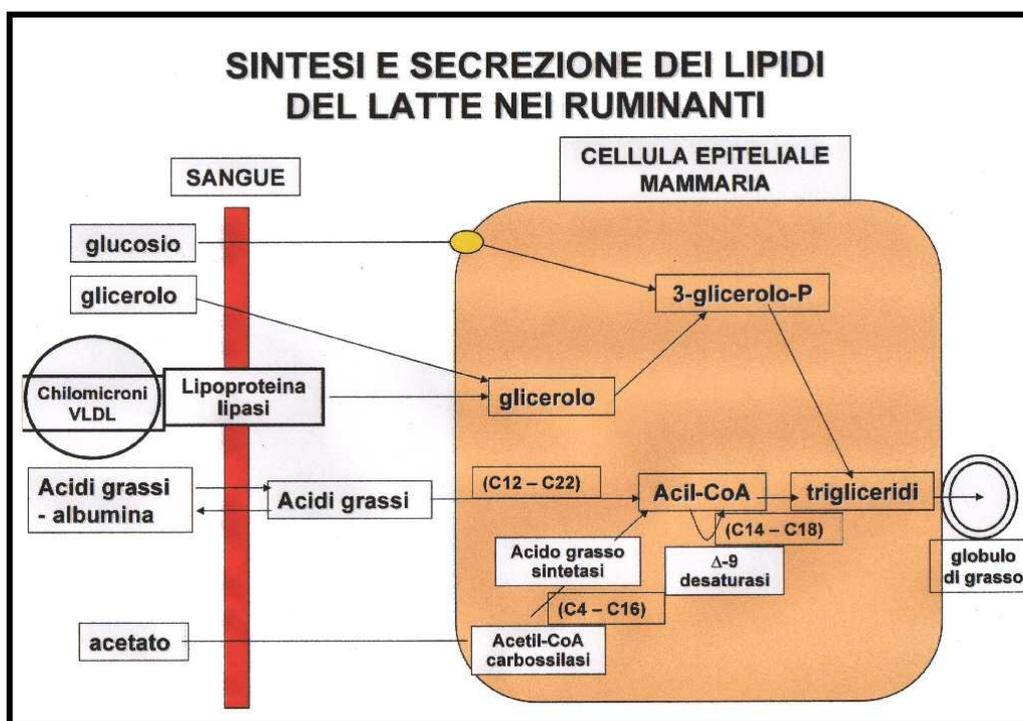
1.1 - Il latte: frazioni lipidiche

La componente lipidica (3,5%) del latte è particolarmente interessante per le numerose proprietà nutrizionali e nutraceutiche che vengono esercitate dalle numerose molecole lipidiche che la costituiscono (fig. 1.1 e 1.2).

Figura 1.1: Profilo acidico del grasso del latte vaccino

Composizione percentuale indicativa in acidi grassi saturi e insaturi del grasso del latte	
	Vacca
Acidi grassi saturi:	61
- a corta catena (\leq C14)	26
- acido palmitico (C16)	25
- acido stearico (C18)	9
- altri (\geq C20)	1
Acidi grassi monoinsaturi:	35
- acido palmitoleico (C16:1)	4
- acido oleico (C18:1)	31
Acidi grassi polinsaturi:	4
- acido linoleico (C18:2)	4
- acido linolenico (C18:3)	0
- acido arachidonico (C20:4)	-
- altri (\geq C22:2)	0

Figura 1.2: Sintesi e secrezione dei lipidi nel latte (Biblioteca Ercolani, 2008)



1.2 - Gli acidi grassi

Gli acidi grassi, componenti fondamentali dei lipidi, sono molecole costituite da una catena di atomi di carbonio, denominata catena alifatica, con un solo gruppo carbossilico (-COOH) ad una estremità. La catena alifatica che li costituisce è tendenzialmente lineare e solo in rari casi si presenta in forma ramificata o ciclica. La lunghezza di questa catena è estremamente importante, in quanto influenza le caratteristiche fisico-chimiche dell'acido grasso. Quindi potremmo classificarli, a seconda della lunghezza della catena carboniosa, in:

- Acidi grassi *a catena corta* con un numero di atomi di carbonio minore di 14.
- Acidi grassi *a catena media e lunga* con un numero di atomi di carbonio maggiore o uguale a 14.

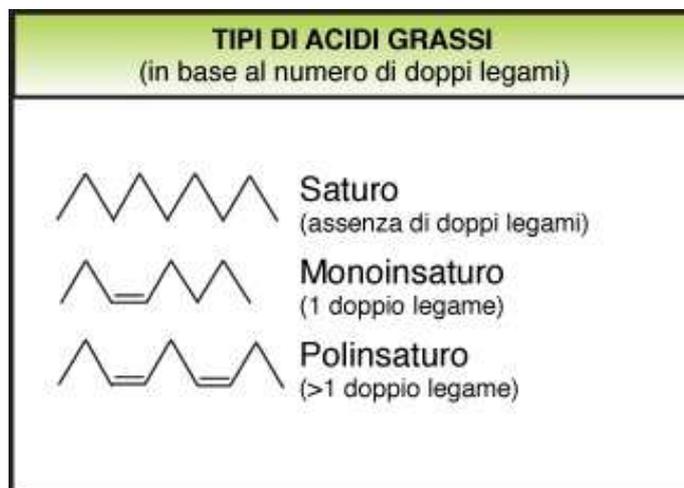
Gli acidi grassi possiedono generalmente un numero pari di atomi di carbonio e possono presentare anche uno o più doppi legami nella catena alifatica. La presenza o meno di doppi legami fa variare la temperatura di fusione degli acidi grassi stessi (*fig. 1.3*) che potremmo perciò classificare in:

- Acidi grassi *saturi* quando la loro struttura chimica non contiene doppi legami. (es: acido caprilico C 8:0, acido palmitico C 16:0, acido stearico C 18:0)
- Acidi grassi *insaturi* quando sono presenti uno o più doppi legami: monoinsaturi (MUFA) se ne è presente uno e polinsaturi (PUFA) se ne sono presenti più di uno. (es: acido oleico C 18:1, acido linoleico C 18:2, acido linolenico C 18:3, acido arachidonico C 20:4)

Essendo essenziali certi acidi grassi insaturi, quest'ultimi si classificano anche in base alla loro appartenenza a determinati processi metabolici in:

- omega-3 quando l'ultimo doppio legame è presente sul terzo carbonio a partire dalla fine. (es: acido linolenico C 18:3)
- omega-6 quando l'ultimo doppio legame è presente sul sesto carbonio a partire dalla fine. (es: acido linoleico C 18:2)
- omega-9 quando l'ultimo doppio legame è presente sul nono carbonio a partire dalla fine. (es: acido oleico C 18:1)

Figura 1.3: tipi di acidi grassi



1.2.1 - Acidi grassi saturi

Il latte presenta notoriamente un elevato quantitativo di acidi grassi saturi, rispetto ad altri prodotti. Gli acidi grassi saturi presentano potere aterogeno (alzando la colesterolemia) variabile: i più pericolosi sono il palmitico (C16:0), il miristico (C14:0) ed il laurico (C12:0). Lo **stearico** (C18:0), invece non determina disturbi cardiaci perché, pur essendo saturo è poco aterogeno, viene desaturato rapidamente dall'organismo ad acido oleico (Khosla e Sundram, 1996). Anche gli acidi grassi a corta e media catena sono privi di potere aterogeno. Questi vengono direttamente assorbiti nel sangue andando a rifornire il fegato e non contribuendo perciò all'aumento della concentrazione di lipoproteine nel sangue o alla deposizione del tessuto adiposo (Gurr,1997). L'apporto giornaliero consigliato di acidi grassi saturi deve essere inferiore al 10% (7-10%) delle calorie totali. In *tabella 1.1* sono riportati i principali acidi grassi saturi.

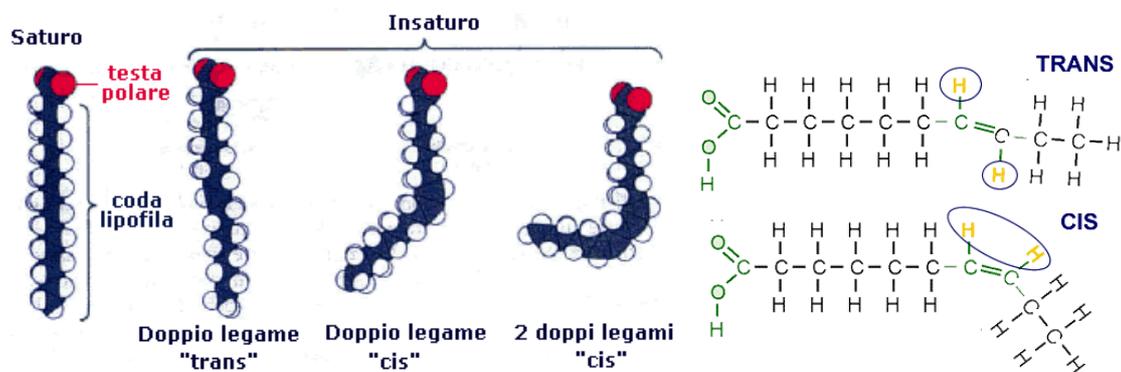
Tabella 1.1: acidi grassi saturi

<i>n° atomi C: n° doppi legami</i>	<i>nome comune</i>	<i>nome IUPAC</i>	<i>formula chimica</i>	<i>punto fusione (°C)</i>	<i>grassi di:</i>
4:0	acido butirrico	acido butanoico	$C_4H_8O_2CH_3(CH_2)_2COOH$	-8	latte
5:0	acido valerico	acido pentanoico	$C_5H_{10}O_2CH_3(CH_2)_3COOH$	-	-
6:0	acido caproico	acido esanoico	$C_6H_{12}O_2CH_3(CH_2)_4COOH$	-3	latte
7:0	acido enantico	acido eptanoico	$C_7H_{14}O_2CH_3(CH_2)_5COOH$	-	-
8:0	acido caprilico	acido ottanoico	$C_8H_{16}O_2CH_3(CH_2)_6COOH$	16	latte e cocco
9:0	acido pelargonico	acido nonanoico	$C_9H_{18}O_2CH_3(CH_2)_7COOH$	-	-
10:0	acido caprico	acido decanoico	$C_{10}H_{20}O_2CH_3(CH_2)_8COOH$	31	animali e vegetali
11:0	-	acido undecanoico	$C_{11}H_{22}O_2CH_3(CH_2)_9COOH$	-	-
12:0	acido laurico	acido dodecanoico	$C_{12}H_{24}O_2CH_3(CH_2)_{10}COOH$	43,2	animali e vegetali
13:0	-	acido tridecanoico	$C_{13}H_{26}O_2CH_3(CH_2)_{11}COOH$	-	-
14:0	acido miristico	acido tetradecanoico	$C_{14}H_{28}O_2CH_3(CH_2)_{12}COOH$	53,9	latte, oli di pesce, animali e vegetali
15:0	-	acido pentadecanoico	$C_{15}H_{30}O_2CH_3(CH_2)_{13}COOH$	-	-
16:0	acido palmitico	acido esadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2CH_3(CH_2)_{14}COOH$	62,8	animali e vegetali
17:0	acido margarico	acido eptadecanoico	$C_{17}H_{34}O_2CH_3(CH_2)_{15}COOH$	-	animali e vegetali
18:0	acido stearico	acido ottadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2CH_3(CH_2)_{16}COOH$	69,6	animali e vegetali
19:0	-	acido nonadecanoico	$C_{19}H_{38}O_2CH_3(CH_2)_{17}COOH$	-	-
20:0	acido arachidico	acido eicosanoico	$C_{20}H_{40}O_2CH_3(CH_2)_{18}COOH$	75,4	semi vegetali, animali
22:0	acido behenico	acido docosanoico	$C_{22}H_{44}O_2CH_3(CH_2)_{20}COOH$	-	semi vegetali, animali e malattia di Gaucher
24:0	acido lignoceric	acido tetracosanoico	$C_{24}H_{48}O_2CH_3(CH_2)_{22}COOH$	-	Vegetali, componente della sfingomiolina
26:0	acido cerotico	acido esacosanoico	$C_{26}H_{52}O_2CH_3(CH_2)_{24}COOH$	-	cera d'api, cera carnauba e lana
28:0	acido montanico	acido ottacosanoico	$C_{28}H_{56}O_2CH_3(CH_2)_{26}COOH$	-	cere animali e vegetali
30:0	acido melissico	acido triacontanoico	$C_{30}H_{60}O_2CH_3(CH_2)_{28}COOH$	-	cere animali e vegetali
32:0	acido laceroico	acido dotriacontanoico	$C_{32}H_{64}O_2CH_3(CH_2)_{30}COOH$	-	-

1.2.2 - Acidi grassi insaturi: *importanza della stereo-isomeria del doppio legame*

In *figura 1.4* si può notare la rappresentazione di un acido grasso saturo con catena alifatica (coda lipofila) perfettamente lineare. Alla sua destra si osserva invece lo stesso acido grasso con un legame di tipo trans: in questo caso la catena subisce una piccola flessione, ma rimane comunque una struttura lineare, simile a quella dell'acido grasso saturo. Ancora più a destra si apprezza il ripiegamento della catena indotto dalla presenza di un doppio legame cis. Infine, all'estrema destra, è rappresentato il fortissimo ripiegamento associato alla presenza di due doppi legami insaturi cis. Ecco spiegato come mai il burro, alimento ricco di acidi grassi saturi, è solido a temperatura ambiente, mentre gli oli, in cui prevalgono gli acidi grassi insaturi cis, sono liquidi nelle medesime condizioni. In altre parole, la presenza di doppi legami cis abbassa il punto di fusione del lipide.

Figura 1.4: acidi grassi



Negli alimenti gli acidi grassi insaturi sono presenti prevalentemente in forma cis; tuttavia, nella carne e nel latte dei ruminanti come i bovini e gli ovini (formati nel rumine a grazie all'azione di determinati batteri) e nei prodotti contenenti oli modificati industrialmente che hanno subito un processo di idrogenazione parziale, esiste una percentuale di acidi grassi insaturi in forma trans. Tutta questa attenzione rivolta agli acidi grassi trans (trans fatty acid) è dovuta alle implicazioni salutistiche negative che il loro uso comporta. Questi acidi grassi determinano infatti un aumento del colesterolo negativo (lipoproteine LDL) accompagnato ad una diminuzione della frazione positiva

(lipoproteine HDL). Un elevato consumo di acidi grassi trans aumenta quindi il rischio di sviluppare gravi patologie cardiovascolari (aterosclerosi, trombosi, ictus, ecc) (Gurr, 1998).

1.2.3 - Acidi grassi Monoinsaturi (MUFA)

L'apporto giornaliero consigliato di acidi grassi monoinsaturi è consigliato fino a coprire il 20% del fabbisogno calorico totale. I più diffusi acidi grassi monoinsaturi in natura sono l'acido oleico e l'acido palmitoleico. L'acido oleico in particolare, molto diffuso nell'olio d'oliva ha un effetto ipocolesterolemizzante, ed aumenta i livelli di HDL. In *tabella 1.2* sono riportati i principali acidi grassi monoinsaturi.

Tabella 1.2: acidi grassi monoinsaturi

<i>n° atomi C:</i> <i>n° doppi legami</i>	<i>posizione doppi legami</i>	<i>nome comune</i>	<i>nome IUPAC</i>	<i>formula chimica</i>	<i>punto fusione (°C)</i>	<i>grassi di:</i>
16:1	7	acido palmitoleico	acido cis-9-esadecenoico	$C_{16}H_{30}O_2$ $CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	-0,5	latte, di riserva degli animali, vegetali oli di pesce,
18:1	cis-9	acido oleico	acido cis-9-ottadecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$ $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	16	olio di oliva in tutti i grassi naturali
18:1	trans-9	acido elaidico	acido trans-9-ottadecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$ $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	-	nei grassi dei ruminanti
18:1	11	acido vaccenico	acido cis-11-ottadecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$ $CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$	-	-
20:1	11	acido gadoleico	acido cis-9-eicosenoico	$C_{20}H_{38}O_2$ $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_9COOH$	-	olio di colza
22:1	11	acido cetoleico	acido cis-11-docosenoico	$C_{22}H_{42}O_2$ $CH_3(CH_2)_9CH=CH(CH_2)_9COOH$	-	oli vegetali
22:1	13	acido erucico	acido cis-13-docosenoico	$C_{22}H_{42}O_2$ $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$	-	olio di colza
24:1	15	acido nervonico	acido cis-15-tetracosenoico	$C_{24}H_{46}O_2$ $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$	-	-

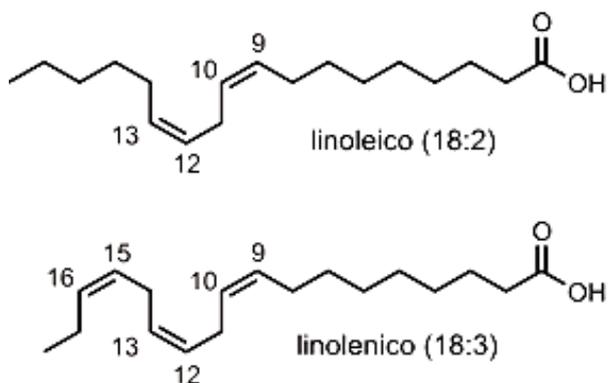
1.2.4 - Acidi Grassi Polinsaturi (PUFA)

L'apporto calorico giornaliero in acidi grassi polinsaturi deve rappresentare circa il 7% delle calorie totali. I più importanti acidi grassi polinsaturi di interesse alimentare sono senza dubbio quelli che comunemente vengono chiamati acidi grassi essenziali: omega-3 ed omega-6. Quest'ultimi differiscono per la posizione del primo doppio legame:

- Gli **omega-6** (o n-6) hanno il primo doppio legame in corrispondenza del sesto atomo di carbonio lungo la catena dell'acido grasso e derivano principalmente dall'acido linoleico.
- Gli **omega-3** (o n-3) hanno il primo doppio legame in corrispondenza del terzo atomo di carbonio lungo la catena dell'acido grasso e derivano principalmente dall'acido α -linolenico.

Questi non sono presenti a livelli molto alti nel grasso del latte infatti il rapporto omega-6/omega-3 è più basso di quello trovato nei PUFA di altri alimenti come ad esempio le margarine (Gurr,1998). Come riportato i capostipiti di queste 2 classi di acidi grassi sono l'acido α -linolenico (18:3 ω -3) e l'acido linoleico (18:2 ω -6) visibili in *figura 1.5*:

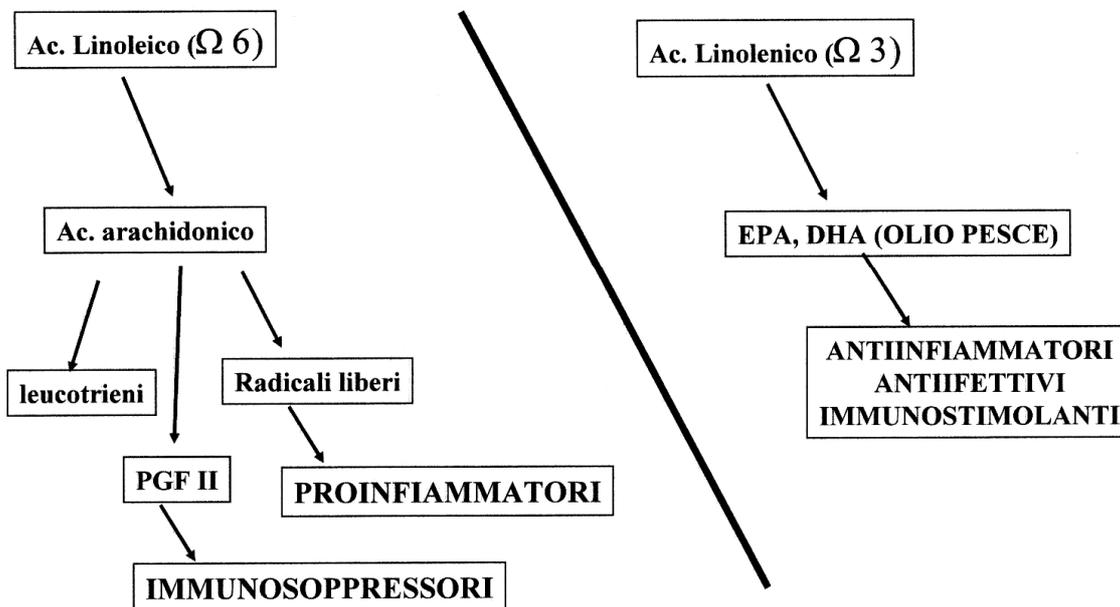
figura 1.5: acidi linoleico e linolenico



Vengono chiamati acidi grassi essenziali perché il nostro organismo non è in grado di sintetizzarli, e devono essere assunti con la dieta. Si deve mantenere un rapporto ottimale omega-6/omega-3 di 1:5 (*fig. 1.6*) e l'apporto minimo consentito è dello 0,1% delle calorie totali per gli omega-6 e lo 0,5% delle calorie totali per gli omega-3.

Figura 1.6: rapporto ottimale omega-6/omega-3 (Biblioteca Ercolani, 2008)

Rapporto ottimale $\Omega 6 / \Omega 3 = 1:5; 1:10$



L'organismo è in grado di trasformare l'acido alfa-linoleico nella sua versione a catena lunga, l'EPA (acido eicosapentanoico) ed in misura minore in DHA (acido docosaesaenoico). L'EPA è il principale precursore delle prostaglandine della serie 3 (che hanno attività antiaggregante piastrinica) ed svolge assieme al DHA un'azione protettiva nei confronti dell'aterosclerosi proteggendo l'organismo da malattie cardiovascolari. Il singolo DHA svolge invece una funzione di rilievo nella retina (costituendo l'80% dei PUFA che la compongono) in quanto la rapida trasmissione della luce. Inoltre DHA e ARA (Acido Arachidonico) sono importanti componenti strutturali dei lipidi di membrana, molto diffusi nel sistema nervoso centrale. Infatti il 50% del peso secco del cervello è rappresentato da lipidi, soprattutto fosfolipidi contenenti acido Arachidonico (ARA). Dal metabolismo degli acidi grassi omega-6 ed omega-3 otteniamo perciò: **prostaglandine, trombossani, leucotrieni** (attraverso reazioni catalizzate dagli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi), molecole segnale come **eicosanoidi** ed **endocannabinoidi**. Queste sostanze sono importanti per la formazione delle membrane cellulari e partecipano alla coagulazione del sangue e alla guarigione di ferite e infiammazioni.

Una carenza in acidi grassi omega-6 porta a: lesioni cutanee, anemia, aumento dell'aggregazione piastrinica, trombocitopenia, danni epatici, ritardata cicatrizzazione delle ferite, aumentata suscettibilità alle infezioni, diarrea, ritardo di crescita nell'età evolutiva, calo della fertilità

Una carenza di acidi grassi omega-3 invece è caratterizzata da: sintomi neurologici, ridotta funzionalità visiva, lesioni cutanee, ritardi di crescita, alterazioni delle capacità cognitive, alterazioni nel metabolismo dei neurotrasmettitori monoaminergici.

In *tabella 1.3* sono riportati i principali acidi grassi polinsaturi.

Tabella 1.3: acidi grassi polinsaturi

<i>n° atomi di C: n° doppi legami</i>	<i>posizione dei doppi legami</i>	<i>nome comune</i>	<i>nome IUPAC</i>	<i>formula chimica</i>	<i>punto di fusione (°C)</i>	<i>grassi di:</i>
18:2	9, 12	acido linoleico	acido 9,12-ottadecadienoico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-5	olio di girasole
18:3	9, 12, 15	acido linolenico	acido 9,12,15-ottadecatrienoico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-11	pesce e oli vegetali
18:4	6, 9, 12, 15	acido stearidonico	acido 6,9,12,15-ottadecatetraenoico	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	-	semi di canapa, olio di semi di ribes nero
20:4	5, 8, 11, 14	acido arachidonico	acido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	-49,5	animali e oli di pesce
20:5	4, 8, 12, 15, 18	acido timnodonico	acido 4,8,12,15,18-eicosapentaenoico	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	-	oli di pesce
22:5	4, 8, 12, 15, 19	acido clupanodonico	acido 4,8,12,15,19-docosapentaenoico	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	-	oli di pesce
22:6	4, 7, 10, 13, 16, 19	acido cervonico	acido 4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	-	oli di pesce

1.2.5 - Acidi Grassi trans-insaturi

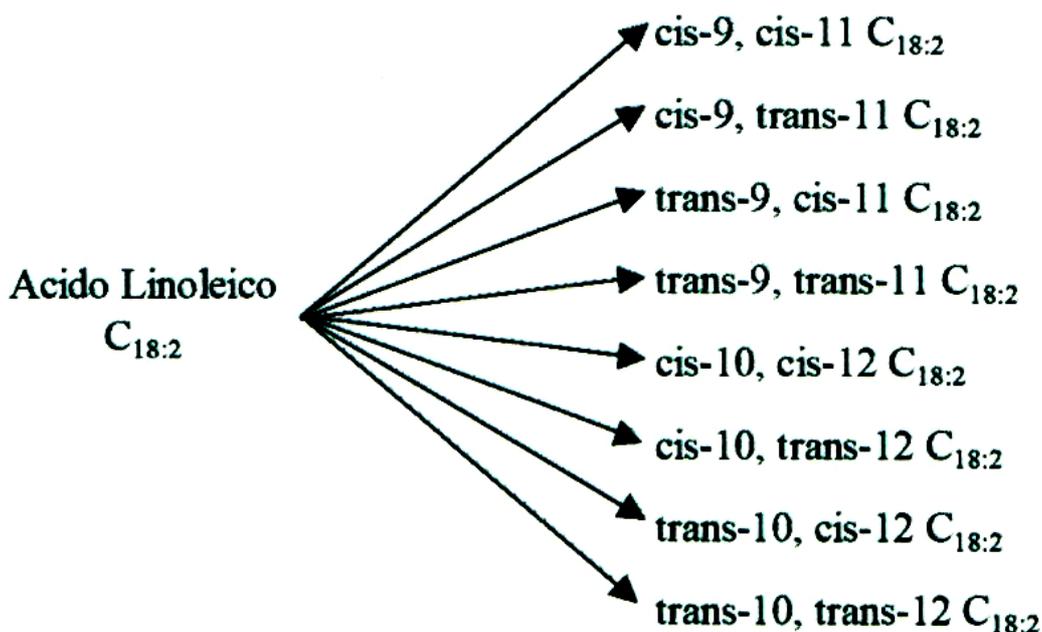
Derivano da processi chimici di idrogenazione per rendere solidi gli oli vegetali, che a temperatura ambiente sono liquidi. Questo perché i doppi legami trans rendono la catena più rigida degli acidi grassi con insaturazioni cis, quindi le loro proprietà fisiche si avvicinano a quelle degli acidi grassi saturi. Questi derivano da una trasformazione batterica di acidi grassi insaturi nei ruminanti, che passano poi nel grasso, nella carne e

nel latte. Gli effetti che gli Acidi Grassi trans-insaturi hanno nel nostro organismo sono riconducibili ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari.

1.2.6 – Coniugati dell'acido linoleico (CLA): *aspetti biochimici ed effetti nutraceutici*

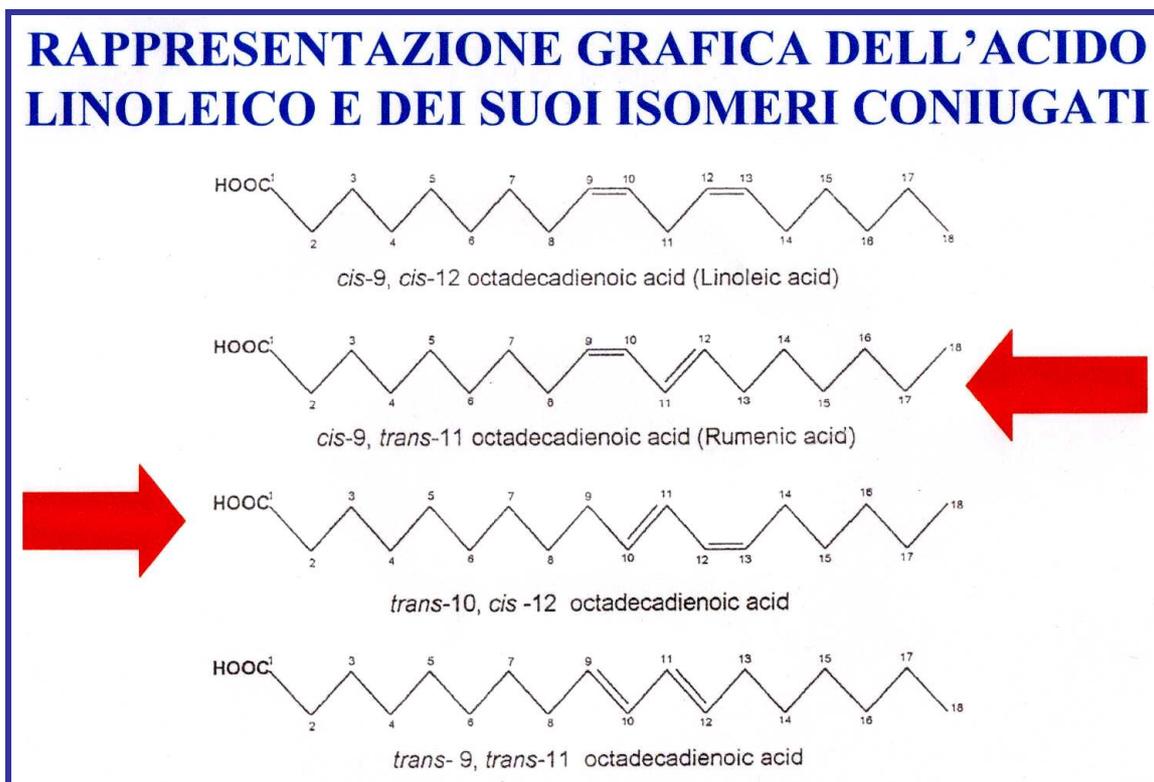
I CLA (conjugated linoleic acid), sono isomeri geometrici dello stesso acido linoleico con doppi legami, le cui possibili varianti sono illustrate in *figura 1.7*:

Figura 1.7: varianti acido linoleico



I coniugati dell'acido linoleico (CLA) più importanti (*fig. 1.8*), invece, presentano i doppi legami in posizione 9 - 11, o 10 - 12 assumendo sia forme cis che trans (Parodi, 1994). In particolare due sono gli isomeri cui si attribuiscono le maggiori attività biologiche: il cis-9, trans-11 CLA e il trans-10, cis-12 CLA.

Figura 1.8: coniugati dell'acido linoleico più importanti (Biblioteca Ercolani, 2008)



Numerosi studi condotti su modelli animali (Mc Guire and Mc Guire, 2000; Romeo 2001; Lock e Garnsworthy, 2002) hanno dimostrato gli effetti benefici dei CLA nel controllo di numerose patologie, in particolare:

- 1) limitano l'insorgenza e la progressione di neoplasie;
- 2) esercitano un'azione antimitotica;
- 3) prevengono in misura significativa l'arteriosclerosi;
- 4) riducono la colesterolemia (aumento del colesterolo HDL);
- 5) hanno attività di regolazione della risposta immunitaria ed in particolare di quella allergica;
- 6) favoriscono la mineralizzazione delle ossa;
- 7) controllano alcuni caratteri del diabete di tipo 2;
- 8) riducono l'obesità attraverso la modificazione della deposizione del tessuto adiposo.
- 9) limitano l'insorgenza di malattie tumorali;

Essendo carne e prodotti lattiero-caseari (*tab. 1.4*) le principali fonti di CLA nella dieta umana (in particolare il formaggio; Williams 2000) negli ultimi anni si sono condotte numerose ricerche sia per comprenderne i processi di sintesi naturale sia per verificare le possibili strategie per aumentare i contenuti di queste sostanze nel latte e nella carne anche attraverso la somministrazione di prodotti esogeni.

Tabella 1.4: Contenuto di CLA nel latte di varie specie (Secchiari et al. 2005)

	Ruminanti					Non ruminanti		
	Pecora (min-max)	Vacca (min-max)	Dromedaria	Capra (min-max)	Bufala (min-max)	Donna	Scrofa	Cavalla
CLA (g/100g grasso)	0.84-2.15	0.3-0.7	0.7	0.64-0.79	0.46-0.66	0.4	0.2	0.1

La sintesi dei CLA avviene quasi esclusivamente nelle ghiandole mammarie anche se l'isomero cis-9, trans-11 CLA è prodotto durante le fermentazioni microbiche a livello ruminale. Nel rumine, da parte dei microrganismi cellulolitici (*Butyrivibrio fibrisolvens*), viene attuato un processo di bioidrogenazione con riduzione dell'acido linoleico a acido stearico e formazione di intermedi come l'Acido Rumenico o RA (C18:2 *cis9-trans11*) e l'Acido Vaccenico o VA (C18:1 *trans 11*) (Kepler et al., 1966; Bauman et al., 1999; Boccioni et al., 2002; Lock et al., 2003; Khanal et al., 2004) contenuti nel latte. Il VA, diretto precursore del RA a livello tissutale, tende ad accumularsi nel liquido ruminale, in quanto la sua riduzione a acido stearico rappresenta la fase più lenta del processo di bioidrogenazione; pertanto può venire in larga parte assorbito a livello intestinale e trasportato ai tessuti (ghiandole mammarie), dove può essere ossidato a livello dei microsomi cellulari. La reazione di ossidazione è catalizzata dall'enzima Stearoil CoA-Desaturasi (SCD), che inserisce un doppio legame di tipo *cis* in posizione $\Delta 9$ (Heinemam et al., 2003; Ntambi et al., 2004) e converte così l'Acido Vaccenico in Acido Rumenico (*fig. 1.9*).

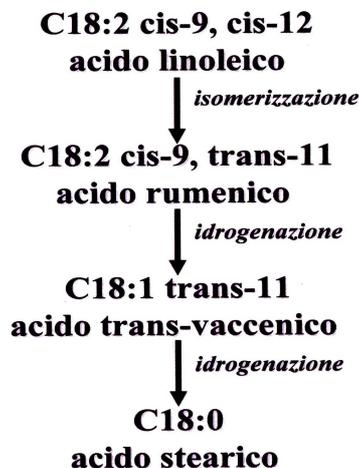
Figura 1.9: schema sintesi dell'acido Vaccenico (Secchiari et al. 2005)



Il VA quindi può essere desaturato a RA, e il massimo di conversione si ha con il 2% di VA nella dieta (Banni et al., 2002). A questa concentrazione, si aggiunge l'effetto alimentare di RA (1% della sostanza secca della dieta), garantendo una diminuzione dell'incidenza dei tumori di circa il 50% (Banni et al., 2002).

Nello schema (riportato in figura 1.10) si evidenzia l'isomerizzazione degli acidi linoleico e linolenico, tramite un meccanismo di conversione enzimatica che da origine ad acido rumenico (18:2 cis-9, trans-11).

Figura 1.10: idrogenazione ruminale dell'acido linoleico (Biblioteca Ercolani, 2008)



Questo sembra il principale cammino metabolico da cui deriva il cis-9, trans-11 CLA presente nel grasso del latte (T. R. Dhiman et al. 2005). Per analogia, si trova la presenza di acido trans-10-octadecanoico nel latte, e perciò anche il trans-10, cis-12 CLA potrebbe seguire questa via metabolica. Ma se la cellula mammaria non possiede l'enzima delta-12 desaturasi è impossibilitata alla conversione in trans-10, cis-12 CLA. E' stato dimostrato che i diversi isomeri CLA posseggono proprietà biologiche diverse (Ip et al., 1997; McGuire et al., 1999; Pariza et al., 2001; Secchiari et al., 2005).

In particolare è stato accertato che il cis 9 trans 11 -CLA possiede proprietà anticancerogene: è dose-dipendente, nel caso del carcinoma della mammella, ed è maggiore se la sostanza viene assunta durante lo sviluppo del tumore (Ip et al., 1997), così come si può osservare per i tumori dell'intestino e della prostata (McGuire et al., 1999; Pariza et al., 2001). Il meccanismo d'azione è ancora oggetto di studi; è assodato comunque che compete con l'acido Linoleico (LA) riducendo la formazione dell'acido Arachidonico (AA), precursore degli eicosanoidi, agenti importanti del processo di carcinogenesi. Il trans 10 cis 12-CLA invece modifica la massa corporea, inducendo l'aumento della massa magra e riducendo la massa grassa (Pariza et al., 2001). L'isomero suddetto, impedirebbe l'introduzione dei lipidi nelle cellule degli adipociti interferendo con l'attività degli enzimi lipoproteinlipasi e stearoil CoA-desaturasi; Inoltre i due importanti isomeri sopra citati (cis 9 trans 11 e trans 10 cis 12) presentano comuni proprietà antiaterogene e ipocolesterolemiche (Pariza et al., 2001). Questa breve disamina sulle attività biologiche dei CLA, comprova le affermazioni della National Academy of Science (NRC, 1996) degli USA, sull'effetto anticancerogeno dei CLA e soprattutto dell'RA. L'interesse per queste molecole si è anche manifestato in una serie di studi che hanno valutato la possibilità di aumentarne le concentrazioni nei prodotti animali operando sulla somministrazione di foraggi freschi, oli vegetali e diverse tipologie di integratori di CLA opportunamente protetti per evitarne la degradazione ruminale (Dawson R.M.C. et al., 1970).

1.3 - Metodologie di analisi

Dal momento che i diversi isomeri possiedono proprietà biologiche differenziate diventa di estremo interesse sviluppare metodologie analitiche in grado di determinare,

anche in termini quantitativi, i loro contenuti nelle diverse matrici biologiche. Gli approcci analitici più comuni per la determinazione degli isomeri di CLA contenuti in matrici biologiche come il latte, comprendono principalmente due fasi a seguito esposte.

Preparativa: fase di estrazione e derivatizzazione (metilazione) della frazione lipidica

- *metodo di Christopherson & Glass o ISO 15884* (Christopherson et al., 1969) non adatto alla determinazione degli acidi grassi totali;
- *metodo alternativo in piccolo (metilazione rapida)* (Christopherson et al., 1969), adatto per preparare esteri metilici di acidi grassi da oli o grassi che possiedono una quantità trascurabile di acidi grassi liberi, in quanto non sono metilati;
- *preparazione degli esteri metilici con metilato sodico*, la metilazione o transesterificazione dei trigliceridi e fosfolipidi (Christie, 1982);
- *transmetilazione basica di Christie (microscala)* (Christie, 1982);
- *transmetilazione basica di Christie (macroscala)* (Christie, 1982);
- *preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi con catalisi acida o BF_3* (Antongiovanni et al., 2007);
- *metilazione con diazometano* (ideale per la derivatizzazione ma cancerogeno ed esplosivo) (Antongiovanni et al., 2007);
- *metilazione con trimetilsilil diazometano ($TMSCHN_2$)* (Antongiovanni et al., 2007);
- *metodo di Kramer* (metodo rapido) (Kramer et al., 1997);
- *metilazione per catalisi acida blanda* (metodo rapido) (Banni et al., 1994).

Separazione e analisi: frazionamento delle classi lipidiche per arrivare allo stadio finale di analisi, che viene condotto tramite le diverse tecniche.

- *cromatografia liquida HPLC* (determinazione CLA);
- *gascromatografia liquida capillare* (GLC);
- *TLC argentata (Thin Layer Chromatography)* o cromatografia su strato sottile;
- *NMR (Nuclear magnetic resonance)*;
- *spettrometria di massa*;
- *cromatografia a ioni argento (Ag-HPLC)*;
- *cromatografia a scambio ionico (IEC)*.

2. OBIETTIVI

I coniugati dell'acido linoleico rivestono un ruolo importante nell'alimentazione umana conseguentemente a queste particolari proprietà biologiche, è importante sviluppare metodologie di analisi (*fig. 2.1*) in grado di determinarne i contenuti quanti-qualitativi nelle diverse matrici biologiche.

In questa tesi l'obiettivo è stato quello di mettere a punto e descrivere una metodica di valutazione quali-quantitativa del contenuto di acidi grassi, comprensiva dei principali isomeri CLA, in diverse matrici alimentari, con particolare riferimento al latte.

Sulla base di queste premesse sono state apportate diverse modifiche ad una metodica di base per consentire la migliore valutazione delle singole forme isomeriche dei coniugati dell'acido linoleico. Le variazioni hanno riguardato:

- la colonna di separazione;
- la costruzione delle rette di taratura;
- la validazione delle misure.

Un secondo obiettivo ha riguardato l'applicazione della metodica su campioni di latte raccolti in una sperimentazione su vacche che ricevevano diversi dosaggi di un integratore contenente quantità note di CLA, nelle due forme isomeriche *cis* 9-*trans* 11 e *trans* 10-*cis* 12.

Figura 2.1: messa a punto di una metodologia d'analisi



3. MATERIALE E METODI

Per mettere a punto la metodica di determinazione quanti-qualitativa dei singoli acidi grassi, comprese le diverse forme isomeriche CLA, si è utilizzata come metodica di base quella già operativa presso il Dipartimento di Scienze Animali. La metodica, descritta di seguito, è stata modificata al fine di consentire la valutazione delle singole forme isomeriche. Le principali variazioni hanno riguardato:

- Scelta della colonna di separazione adatta (colonna capillare HP-88, lunga 100 m);
- costruzione delle rette di taratura (in funzione dello standard utilizzato);
- verifica della ripetibilità delle misure (per la validazione della metodica).

3.1 - Scopo e campo di applicazione

Il presente metodo permette la determinazione quantitativa nel latte del contenuto totale di grasso e del suo profilo acidico. Operando alle condizioni, descritte a seguito, il metodo consente la determinazione quali/quantitativa degli acidi grassi, esprimendo il dato in due modalità:

- **percentuale**, rapporto dell'area del picco cromatografico di ogni singolo acido, sulla sommatoria di tutte le aree dei picchi cromatografici costituiti dagli acidi grassi;
- **quantitativa**, mg di ogni singolo acido su 100 ml di latte.

3.2 - Principio del metodo

L'analisi viene condotta effettuando una serie di tre estrazioni a freddo dei lipidi che vengono separati dal campione di latte mediante estrazione liquido/liquido con alcol iso-propilico ed esano. L'estratto lipidico viene essiccato ed una sua frazione viene trattata a freddo con una soluzione metanolica di sodio metossido per trans-esterificare gli acidi grassi (3.7). L'introduzione in gas-cromatografo degli esteri metilici ottenuti avviene mediante l'iniezione split in presenza dello standard interno.

3.3 - Reagenti e materiali

- 3.4.1 isopropanolo;
- 3.4.2 n-esano per cromatografia HiperSolv ditta BDH cod.152496;
- 3.4.3 metanolo per analisi titolo $\geq 99.9\%$, Carlo erba cod 414816;
- 3.4.4 sodio solfato anidro per analisi titolo $\geq 99.5\%$, ACROS 1664.0025;
- 3.4.5 acqua di qualità cromatografica, ottenuta da un sistema di purificazione MilliQ Gradient, ditta Millipore S.A. Molsheim France, cod.ZMQS5V00Y;
- 3.4.6 sodio solfato soluzione 0,47 M . In un matraccio tarato, da 1l, pesare 66,8g di sodio solfato (3.3) ed introdurre una prima aliquota di acqua (3.4), circa 500ml, agitando fino alla completa soluzione del sale, quindi portare a volume con una seconda aliquota di acqua, la soluzione è pronta per l'uso;
- 3.4.7 Sodio metossido per analisi titolo $\geq 97\%$, ditta BDH cod.663234C;
- 3.4.8 Soluzione di sodio metossido 1 M, pesare 542 mg di sodio metossido (3.4.7) in un matraccio tarato da 10 ml (3.4.35), aggiungere una prima aliquota di metanolo (3.4.3) ca. 5-6 ml e agitare fino alla completa solubilizzazione della base, attendere che la soluzione si raffreddi e quindi portare a volume con la seconda aliquota di metanolo. Agitare bene prima dell'utilizzo.
- 3.4.9 metile acetato per analisi titolo ≥ 99.5 (GC), ditta Fluka cod.45998;
- 3.4.10 acido Ossalico per analisi titolo ≥ 99.5 , RPE ditta Carlo Erba cod. 306007;
- 3.4.11 etere dietilico per analisi titolo ≥ 99.8 (GLC), ditta Carlo Erba cod. 447534;
- 3.4.12 reagente di terminazione costituito da: soluzione di acido ossalico in etere etilico, ottenuta sciogliendo 1 g di acido ossalico (3.4.10), in 30ml di etere dietilico (3.4.11);
- 3.4.13 methyl nonadecanoate, titolo $\geq 98\%$ (GC),ditta Aldrich cod.28,683-4;
- 3.4.14 Standard interno costituito da: soluzione avente concentrazione di 1 mg/ml in esano (3.4.1) di methyl nonadecanoate (3.4.13) per ottenerla: pesare 50 mg di prodotto in una navicella e introdurla in un matraccio tarato da 50 ml (3.4.35) portando a volume con esano (3.4.1).
- 3.4.15 Composizione 100mg 37 FAM.E, mix di standard avente n. di lotto LB-49737 data MFG. Jul 2007 EXP. Jul 2010, preparate il 08/01/2008, come da certificato allegato al prodotto.

Tabella LB-49737 (1° parte): Estratto del certificato di composizione dello standard.

100 mg sono costituiti dalle seguenti quantità di ogni singolo acido				
	estere metilico dell'acido grasso	Purezza%	mg %	Peso% purezza * mg
1	butyric acid	99,9	3,994	3,990
2	caproic acid	99,8	4,000	3,992
3	caprylic acid	99,9	3,996	3,992
4	capric acid	99,8	3,994	3,986
5	undecanoic acid	99,9	2,008	2,006
6	lauric acid	99,7	4,014	4,002
7	tridecanoic acid	99,9	2,014	2,012
8	myristic acid	99,9	3,995	3,991
9	myristoleic acid	99,9	2,000	1,998
10	pentadecanoic acid	99,9	1,998	1,996
11	cis-10-pentadecenoic acid	99,0	1,999	1,979
12	palmitic acid	99,9	5,993	5,987
13	palmitoleic acid	99,3	2,005	1,997
14	heptadecanoic acid	99,8	2,021	2,017
15	cis-10-heptadecenoic acid	99,5	2,000	1,990
18	stearic acid	99,9	3,994	3,990
17	oleic acid	99,7	3,996	3,984
18	elaidic acid	99,9	1,996	1,994
19	linoleic acid	99,7	1,997	1,991
20	linolelaidic acid	99,9	1,999	1,997
21	linolenic acid	99,6	1,998	1,990
22	gamma-linolenic acid	99,7	2,007	2,001
23	arachidic acid	99,8	3,995	3,987
24	cis-11-eicosenoic acid	99,3	2,020	2,006
25	cis-11,14-eicosadienoic acid	99,7	1,998	1,992
26	cis-11,14,17-eicosatrienoic acid	99,0	1,997	1,977
27	cis-8,11,14-eicosatrienoic acid	99,9	1,998	1,996
28	arachidonic acid	98,5	1,998	1,968
29	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	99,4	2,001	1,989
30	heneicosanoic acid	99,6	1,996	1,988
31	behenic acid	99,7	3,995	3,983
32	erucic acid	99,7	2,003	1,997
33	cis-13,16-docosadienoic acid	99,3	1,998	1,984
34	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	99,5	1,996	1,986
35	tricosanoic acid	99,9	1,999	1,997
36	lignoceric acid	99,9	3,994	3,990
37	nervonic acid	99,9	1,992	1,990
		totale	99,998	99,712

3.4.16 Soluzione madre degli standards di calibrazione: trasferire l'intero contenuto della fiala degli standards (3.15) in un matraccio tarato da 2 ml (3.4.35), portare a volume con la soluzione contenente lo standard interno (3.4.14).

Tabella LB-49737 (2° parte) preparazione di soluzioni diluite per la calibrazione di tutti i 37 acidi grassi (il numero progressivo identifica ciascun acido grasso)

	Sol. Madre 100 mg portati a volume in matraccio da 2 ml con STD interno	Sol. Madre 800 µl STD interno 200 µl fattore diluizione 0.8	Sol. Madre 400 µl STD interno 600 µl fattore diluizione 0.4	Sol. Madre 200 µl STD interno 800 µl fattore diluizione 0.2	Sol. Madre 100 µl STD interno 900 µl fattore diluizione 0.1	Sol. Madre 25 µl STD interno 975 µl fattore diluizione 0.04
	Soluzione di calibrazione n. 6	Soluzione di calibrazione n. 5	Soluzione di calibrazione n. 4	Soluzione di calibrazione n. 3	Soluzione di calibrazione n. 2	Soluzione di calibrazione n. 1
	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %	mg %
1	1,9950	1,5960	0,7980	0,3990	0,1995	0,0798
2	1,9960	1,5968	0,7984	0,3992	0,1996	0,0798
3	1,9960	1,5968	0,7984	0,3992	0,1996	0,0798
4	1,9930	1,5944	0,7972	0,3986	0,1993	0,0797
5	1,0030	0,8024	0,4012	0,2006	0,1003	0,0401
6	2,0010	1,6008	0,8004	0,4002	0,2001	0,0800
7	1,0060	0,8048	0,4024	0,2012	0,1006	0,0402
8	1,9955	1,5964	0,7982	0,3991	0,1996	0,0798
9	0,9990	0,7992	0,3996	0,1998	0,0999	0,0400
10	0,9980	0,7984	0,3992	0,1996	0,0998	0,0399
11	0,9895	0,7916	0,3958	0,1979	0,0990	0,0396
12	2,9935	2,3948	1,1974	0,5987	0,2994	0,1197
13	0,9985	0,7988	0,3994	0,1997	0,0999	0,0399
14	1,0085	0,8068	0,4034	0,2017	0,1008	0,0403
15	0,9950	0,7960	0,3980	0,1990	0,0995	0,0398
18	1,9950	1,5960	0,7980	0,3990	0,1995	0,0798
17	1,9920	1,5936	0,7968	0,3984	0,1992	0,0797
18	0,9970	0,7976	0,3988	0,1994	0,0997	0,0399
19	0,9955	0,7964	0,3982	0,1991	0,0996	0,0398
20	0,9985	0,7988	0,3994	0,1997	0,0999	0,0399
21	0,9950	0,7960	0,3980	0,1990	0,0995	0,0398
22	1,0005	0,8004	0,4002	0,2001	0,1000	0,0400
23	1,9935	1,5948	0,7974	0,3987	0,1994	0,0797
24	1,0029	0,8023	0,4012	0,2006	0,1003	0,0401
25	0,9960	0,7968	0,3984	0,1992	0,0996	0,0398
26	0,9885	0,7908	0,3954	0,1977	0,0989	0,0395
27	0,9980	0,7984	0,3992	0,1996	0,0998	0,0399
28	0,9840	0,7872	0,3936	0,1968	0,0984	0,0394
29	0,9945	0,7956	0,3978	0,1989	0,0994	0,0398
30	0,9940	0,7952	0,3976	0,1988	0,0994	0,0398
31	1,9915	1,5932	0,7966	0,3983	0,1992	0,0797
32	0,9985	0,7988	0,3994	0,1997	0,0998	0,0399
33	0,9920	0,7936	0,3968	0,1984	0,0992	0,0397
34	0,9930	0,7944	0,3972	0,1986	0,0993	0,0397
35	0,9985	0,7988	0,3994	0,1997	0,0999	0,0399
36	1,9950	1,5960	0,7980	0,3990	0,1995	0,0798
37	0,9950	0,7960	0,3980	0,1990	0,0995	0,0398
Tot	49,8560	39,8848	19,9424	9,9712	4,9856	1,9942

La concentrazione effettiva della soluzione madre degli standards riferita al singolo analita (estere metilico di acido grasso) componente la miscela, è determinata dalla seguente formula:

$$[C] = P(\text{mg})/V(\text{ml})$$

- dove:
- [C] = concentrazione effettiva analita mg/ml
- P(mg) = peso come da certificato di composizione vedi (3.17).
- V(ml) = volume diluizione

La concentrazione effettiva delle soluzioni derivate dalla soluzione madre degli standards è determinata dalla seguente formula:

$$[CS] = C(\text{mg/ml}) * \text{FD}$$

- dove:
- [CS] = concentrazione soluzione
- C = concentrazione soluzione madre
- FD = fattore di diluizione dato dal rapporto (volume soluzione madre)/(volume finale soluzione)

Per la preparazione degli standards è necessario partire dal materiale di riferimento a titolo certificato. Le soluzioni degli standards si conservano per 3 mesi in freezer a -18°C.

3.4.17 Isomeri dell' Acido Linoleico: metil 9-cis, 11-trans e metil 10-trans, 12-cis. Per la calibrazione dei CLA : **9-cis**, **11-trans** e **10-trans**, **12-cis** preparare la soluzione madre utilizzando la procedura in *tabella 3.4.17* che permette di ottenere una concentrazione prossima a 1 mg/ml:

Tabella 3.4.17: procedura per la calibrazione dei 2 CLA 9-11 e 10-12

Soluzione madre di calibrazione 12/09/2007		a volume con STD int	
metil 9-cis, 11-trans CLA		metil 10-trans, 12-cis CLA	
mg	50,1	mg	46,66
		estere C19:0 1mg/ml in n-esano in 50 ml	
Concentrazione finale soluzioni madre		a volume con STD int	
09/12/2007		estere C19:0 1mg/ml	
metil 9-cis, 11-trans CLA		metil 10-trans, 12-cis CLA	
mg/ml	1,002	mg/ml	0,933
		in n-esano in 50 ml	

Sol. Madre	mg/ml	Sol. Madre 0.5 ml	Sol. Madre 2 ml	Sol. Madre 4 ml	Sol. Madre 6 ml	Sol. Madre 8 ml
metil 9-cis, 11-trans	1,002	STD interno 9.5 ml	STD interno 8 ml	STD interno 6 ml	STD interno 4 ml	STD interno 2 ml
metil 10-trans, 12-cis	0,933	fattore diluizione 0.05	fattore diluizione 0.2	fattore diluizione 0.4	fattore diluizione 0.6	fattore diluizione 0.8
		soluzione n.1	soluzione n.2	soluzione n.3	soluzione n.4	soluzione n.5
metil 9-cis, 11-trans	mg/ml	0,050	0,200	0,401	0,601	0,802
metil 10-trans, 12-cis	mg/ml	0,047	0,187	0,373	0,560	0,737

Utilizzando i cromatogrammi di 2 corse della soluzione standard n. 5 è stato determinato il livello di purezza degli standard, ricavato dal rapporto % delle aree dei due CLA, sulla somma totale delle aree cromatografiche, livello di purezza % pari a 92,5

tabella corretta

Sol. Madre	mg/ml	Sol. Madre 0.5 ml	Sol. Madre 2 ml	Sol. Madre 4 ml	Sol. Madre 6 ml	Sol. Madre 8 ml
metil 9-cis, 11-trans	1,002	STD interno 9.5 ml	STD interno 8 ml	STD interno 6 ml	STD interno 4 ml	STD interno 2 ml
metil 10-trans, 12-cis	0,933	fattore diluizione 0.05	fattore diluizione 0.2	fattore diluizione 0.4	fattore diluizione 0.6	fattore diluizione 0.8
		soluzione n.1	soluzione n.2	soluzione n.3	soluzione n.4	soluzione n.5
metil 9-cis, 11-trans	mg/ml	0,046	0,185	0,371	0,556	0,741
metil 10-trans, 12-cis	mg/ml	0,043	0,173	0,345	0,518	0,681

3.4- Apparecchiatura

3.4.18 bilancia analitica, Gibertini Milano;

3.4.19 centrifuga refrigerata, Sorval R C2-8 Newtown Connecticut USA;

3.4.20 Ultra Turrax, Micra DB Laber-technik Müllheim;

3.4.21 evaporatore rotante, BUCHI R 205, dotato di pompa per vuoto a membrana in PTFE, denominata Vac V.501, con post-condensatore e di un sistema di raffreddamento del circuito di condensazione fino a -6°C , denominato Recirculating Chiller B-740, ditta Buchi Labortechnik AG CH-9230 Flawil/Schweiz, Switzerland;

3.4.22 gas-cromatografo 8000 Serie Top Thermo Quest Italia Strada Rivoltana 20090 Rodano Milano, dotato di:

- detector a ionizzazione di fiamma FID.
- supporto per colonne capillari.
- sistema di iniezione Split-Splittless.
- forno programmabile con condizioni di lavoro impostate a seconda del tipo di colonna adottata;
- campionatore automatico:
 - volume di iniezione 0.5 μl , filling (volume di avvinamento siringa) 3 μl , air (volume d'aria pre-iniezione) 1 μl ;

- numero di cicli di lavaggio, 4 pre-iniezione con solvente A(n-esano), 3 post-iniezione con solvente B(acqua);
 - volumi cicli di lavaggio, 3 μl pre-iniezione solvente A (n-esano), 3,5 μl post-iniezione con solvente B (acqua);
 - tempi di ritardo, 4 sec. pre-iniezione, 3 sec. post-iniezione;
 - eliminazione bolle nella siringa, 5 cicli con ritardo finale di 2 s;
 - velocità del pistone, per eliminazione bolle 8 $\mu\text{l/s}$, per iniezione 15 $\mu\text{l/s}$.
- colonna capillare HP-88,100 m lunghezza, i.d. 0,250 mm, film 0,20 mm, Agilent Technologies (tab 3.4.1).

Tabella 3.4.1: descrizione della programmata di separazione individuata

Colonna	HP 88 100 m
condizioni di lavoro	<i>F.A.M.E</i> , mix di standard,
Temp. iniettore °C	250
Temp. detector °C	250
Temp. iniziale °C	100
Isoterma .(hold)	5 min.
Incremento °C / min.	4(rate)
Fino a °C	218
Isoterma .(hold)	4min.
Gas di trasporto (carrier) idrogeno	2.68 ml/min
volume di splittaggio	80
Rivelatore	<i>F.I.D.</i>
Flusso idrogeno (H₂)	75 kPa
Flusso aria (air)	110 kPa
Flusso make up	105 kPa

3.4.23 vial in vetro da 2 ml di volume per campionatore automatico, ditta Agilent cod. 5181-3375 DE (Germany);

3.4.24 ghiere e setto da 11 mm di diametro ditta Agilent cod.5181-1210 (Denmark);

3.4.25 pinza per chiusura ghiere vials ditta Agilent cod. 8710-0979 US;

3.4.26 computer;

3.4.27 software, CE.istruments Chrom card Milano, programma specifico per l'acquisizione dati provenienti dal GC;

- 3.4.28 provette pirex da 5 ml con tappo provvisto di guarnizione in teflon, ARTIGLASS via Piemonte 13 Due Carrare Padova;
- 3.4.29 imbuti separatori da 250 ml, ARTIGLASS via Piemonte 13 Due Carrare Padova;
- 3.4.30 imbuti in vetro diametro 60-80 mm, ARTIGLASS via Piemonte 13 Due Carrare Padova;
- 3.4.31 pipette in vetro da 10 ml, ARTIGLASS via Piemonte 13 Due Carrare Padova, ;
- 3.4.32 Micropipette a pistone da 100 μ l , 200 μ l e 1000 μ l, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, 22331 Hamburg Germany;
- 3.4.33 filtri di carta 41 Fast, diametro 55mm ditta Whatman Int. Maidston, England;
- 3.4.34 palloni in vetro da 100ml aventi collo smerigliato 29/32;
- 3.4.35 matraccio tarato da 50 ml e da 100 ml, ARTIGLASS via Piemonte 13 Due Carrare Padova;
- 3.4.36 guanti in lattice di misura adeguata;
- 3.4.37 cappa chimica aspirante, ditta Kottermann GmbH e Co, Industriestrasse 2-10, D-31311 Uetze-Haningsen, Germany;
- 3.4.38 essiccatore sotto vuoto;
- 3.4.39 agitatore multi mixer per provette, mod. 717 +, ditta ASAL srl Via Firenze 37 20063 Cermusco S/N MI.

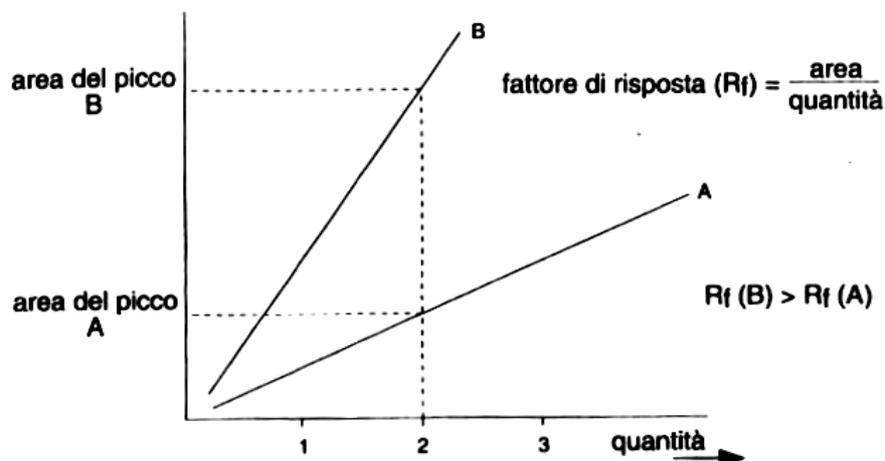
3.5- Taratura

3.5.1 Retta di taratura

La retta di taratura fatta con uno standard particolare può essere usata solo per le analisi quantitative di un componente con la stessa identità dello standard. Ciò significa che per effettuare l'analisi quantitativa di ciascun componente, deve essere preparata una specifica retta di taratura. Questo è determinato dalla differente sensibilità del rivelatore (*fig. 3.1*) verso ciascun componente: la risposta (segnale del rivelatore) non sarà uguale per uguali quantità di diversi componenti generando perciò picchi di dimensione diversa. La differenza della risposta viene espressa dal così detto *fattore di risposta* (RF_x) che lega l'area del picco alla quantità del componente iniettato.

La retta di taratura è preparata su standards di esteri metilici di acidi grassi a quantità nota (come indicato in tabella LB-49737: 2° parte). La retta del singolo estere metilico (dal C4 al C24) viene costruita riportando in ordinata l'area sottesa dal picco dell'estere metilico rapportata allo standard interno, e in ascissa la quantità di estere metilico processata.

Figura 3.1: risposta del rivelatore in funzione della quantità dei componenti



La retta di taratura, come nella seconda parte di tab. LB-49737, è costruita su 5 livelli: per determinare le quantità si fa riferimento alla medesima tabella. Inoltre la si formula seguendo le indicazioni del programma di acquisizione degli spettri, a cui si fa riferimento al punto (3.4.27). E' infine necessario utilizzare la stessa soluzione di standard interno per la costruzione della intera retta di calibrazione.

3.5.2 Standard interno

Ogni qualvolta si debba preparare la soluzione di standard interno è necessario effettuare una nuova curva di calibrazione. Lo standard interno si prepara come indicato al punto (3.4.14).

Questo composto è stato scelto in quanto presenta le stesse proprietà fisiche e chimiche dei componenti del campione esterificato. La quantità di ciascun componente preso in esame viene determinata nel seguente modo:

$$\text{Quantità (x)} = \left[\frac{\text{Area (x)} \cdot (\text{IS})}{\text{Area (IS)} \cdot \text{RF (x)}} \right] \cdot \frac{1}{\text{SA}}$$

Dove:

(x) = Componente del campione;

(RF) = Fattore di risposta (area/ quantità)

(IS) = Standard interno;

(SA) = quantità del campione misurato

3.6- Analisi del campione

3.6.1 Preparazione

- a. Se il campione è costituito da latte non congelato è sufficiente agitarlo per 10 s. prima del prelievo dell' aliquota destinata all'analisi.
- b. Se il campione è costituito da latte congelato è necessario scongelarlo a temperatura ambiente. Si omogeneizza all'Ultra- Turrax (3.4.20) a velocità minima (A) per 10 s. prima del prelievo dell' aliquota destinata all'analisi.
- c. Se il campione è costituito da latte liofilizzato, è necessario ricostituirlo rispettando all'incirca il valore di sostanza secca media del latte, che per il latte vaccino intero è intorno al 13%. Si pesano 2 g di campione in un imbuto separatore (3.4.29) contenente 15 ml di acqua (3.4.5) e si procede come al punto 2 nella fase di estrazione dei lipidi (6.2).

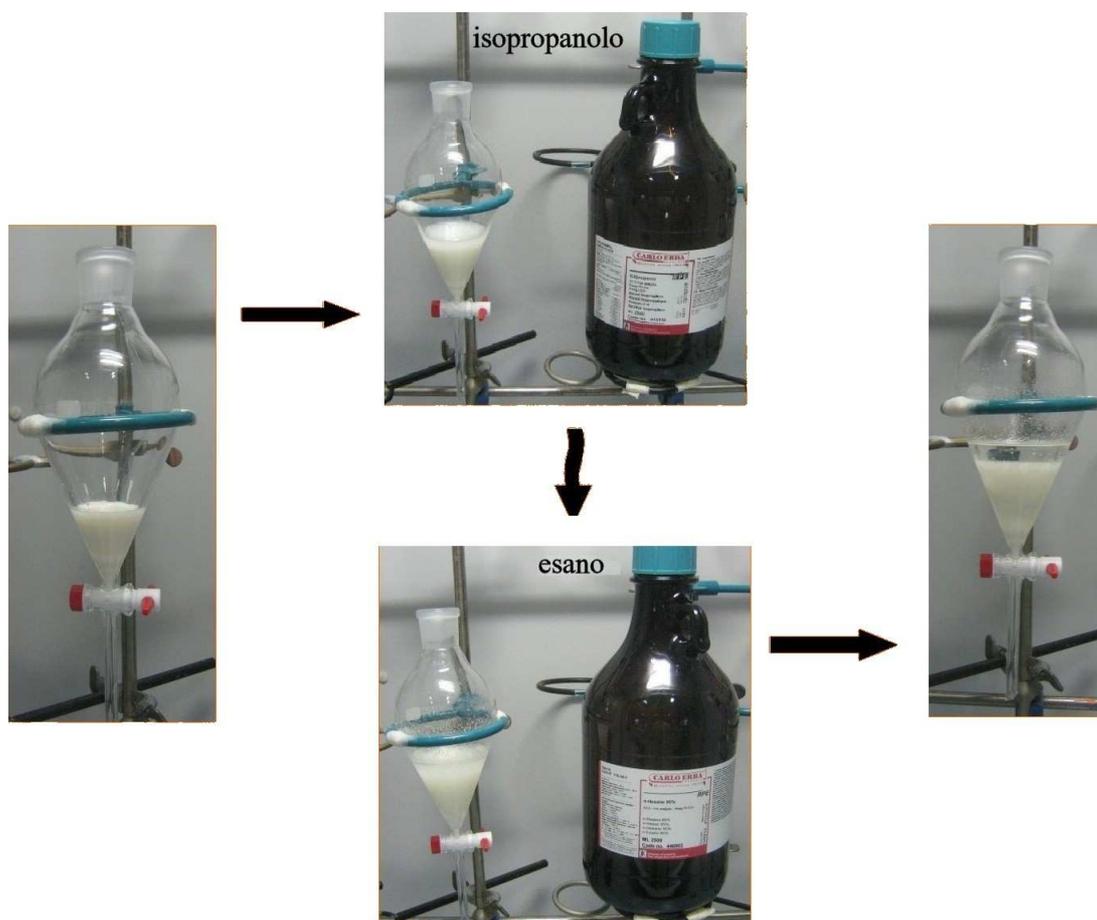
3.6.2 Estrazione dei lipidi

Figura 3.2: materiale per l'estrazione



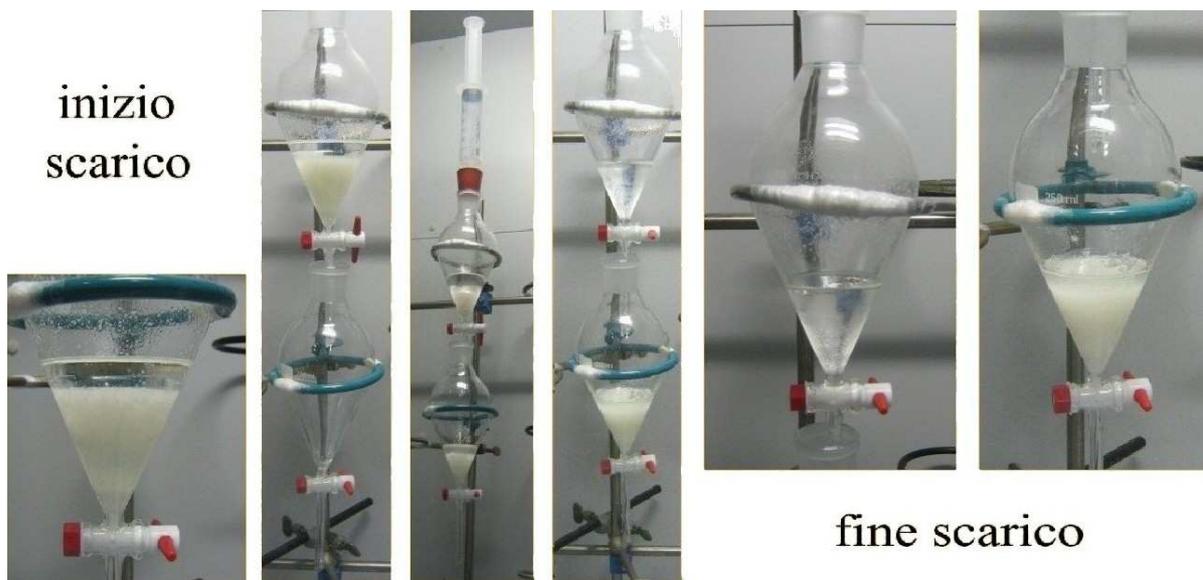
1. prelevare 17 ml di latte con una pipetta graduata (3.4.31) e porre in un imbuto separatore (3.4.29);
2. procedere sotto cappa (3.4.37) aggiungendo 30 ml di isopropanolo (3.4.1), agitare per 30 secondi;
3. aggiungere 22,5 ml di n-esano (3.4.2) ed agitare per 30 minuti (*fig. 3.3*);

Figura 3.3: prime tre fasi estrazione



4. lasciare a riposo, sotto cappa, fino alla completa separazione delle fasi (circa 60 minuti);
5. scaricare (*fig. 3.4*) la fase inferiore (bianca) e quella intermedia (ambrata) in un secondo imbuto separatore, conservare la fase di esano superiore (incolore) nel primo imbuto separatore;

Figura 3.4: scarico fasi



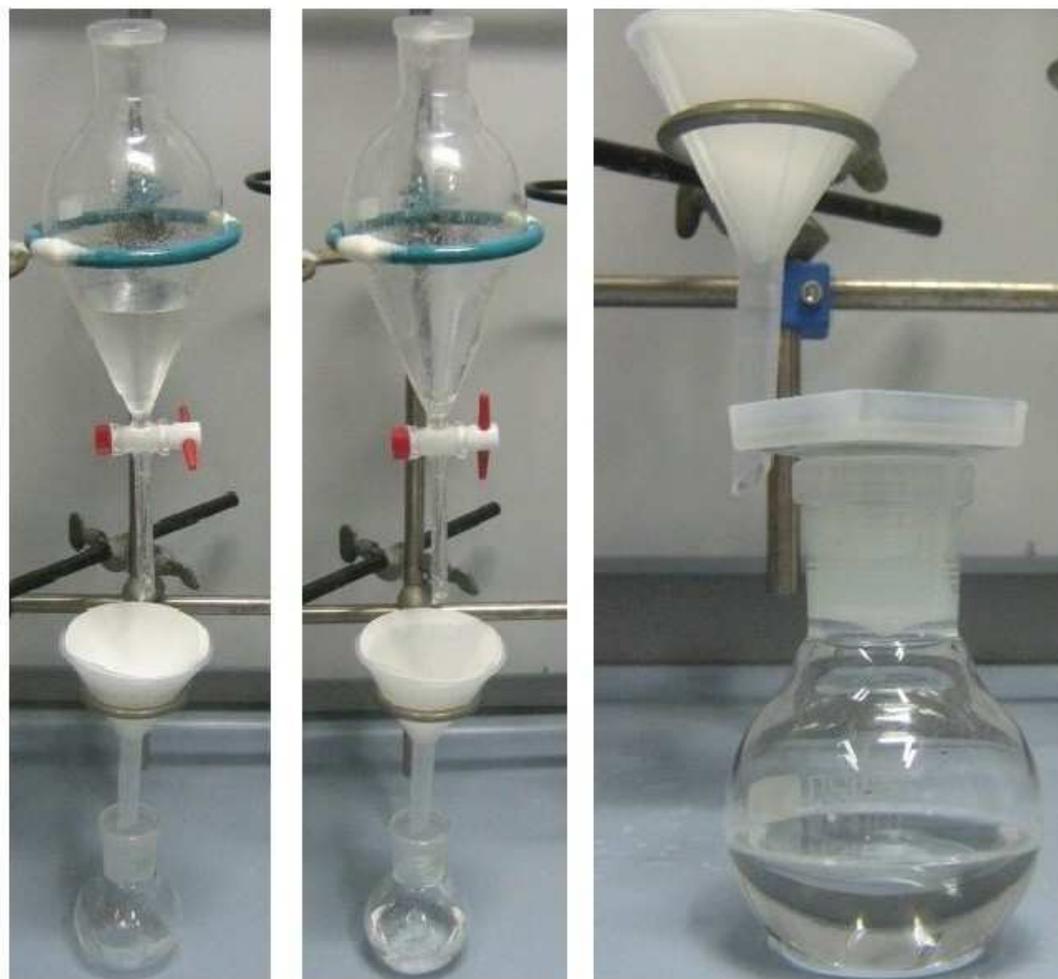
- riestrarre le fasi contenute nel secondo imbuto con 22,5 ml di n-esano, agitare per 3 minuti e lasciare a riposo sotto cappa fino alla completa separazione delle fasi (circa 30 minuti). Recuperare la fase di esano, come al punto 5, ed unirla a quella presente nel primo imbuto. Ripetere l'estrazione delle due fasi inferiori ancora una volta;
- lavare le tre fasi di esano, unite nel primo imbuto separatore, aggiungendo 15 ml di soluzione salina (3.4.6). Agitare vigorosamente per 30 secondi e lasciare che si separino le fasi (circa 30 minuti) (*fig.3.5*);

Figura 3.5: soluzione salina e sodio solfato



8. scartare la fase inferiore;
9. filtrare la fase di esano, rimasta nell'imbuto separatore, attraverso un filtro di carta (3.4.33) (*fig. 3.5 e 3.6*), posto in un imbuto (3.4.31) e contenente 2 g di sodio solfato anidro; il filtrato verrà raccolto in un pallone da 100 ml (3.4.34) preventivamente pesato. Lavare il filtro ed il sodio solfato nell'imbuto con 5 ml di n-esano (3.4.2) che andrà unito a quello presente nel pallone.

Figura 3.6: filtraggio fase esano



10. Portare a secco con evaporatore rotante (3.4.21) (*fig. 3.7*), avente il bagno termostatico impostato a 37°C, fino a peso costante e completare l'essiccamento in stufa a meno di 100 Torr a 40°C con essiccatore sotto vuoto (3.4.38);

Figura 3.7: evaporatore rotante (sopra), essiccatore sotto vuoto + stufa (sotto)



11. pesare il residuo alla bilancia analitica (3.4.18) per calcolare la percentuale di lipidi del campione.

$\% \text{ lipidi} = (I_p - t_p) / p_c \times 100$	<p>Dove:</p> <p>I_p = palloncino + estratto lipidico</p> <p>t_p = tara palloncino</p> <p>p_c = peso campione (= 17xpeso specifico)</p>
--	---

3.7- Trans-esterificazione

1. pesare alla bilancia analitica (3.4.18), in una provetta di pirex 30/40 mg di estratto lipidico (*fig. 3.8*);
2. aggiungere, con una micropipetta a pistone da 1000 μ l (3.4.32), 2 ml di standard interno (preparato come al punto 3.14);
3. aggiungere, con una micropipetta a pistone da 100 μ l (3.4.32), 100 μ l di acetato di metile (3.4.9) e, dopo aver tappato la provetta, la si è posta in agitazione al multi-mixer (3.4.39) per 1 minuto;
4. aggiungere, con una micropipetta a pistone da 100 μ l (3.4.32), 100 μ l di soluzione di sodio metossido 1M (3.4.8), tappare e porre in agitazione al multi-mixer (3.4.39) per 10 minuti a temperatura ambiente;
5. aggiungere, con una micropipetta a pistone da 200 μ l (3.4.32), 150 μ l di reagente di terminazione (3.4.12) e porre in agitazione per 30 secondi;

Figura 3.8: provette pirex e pallone e vials pronte per corsa gas-cromatografica

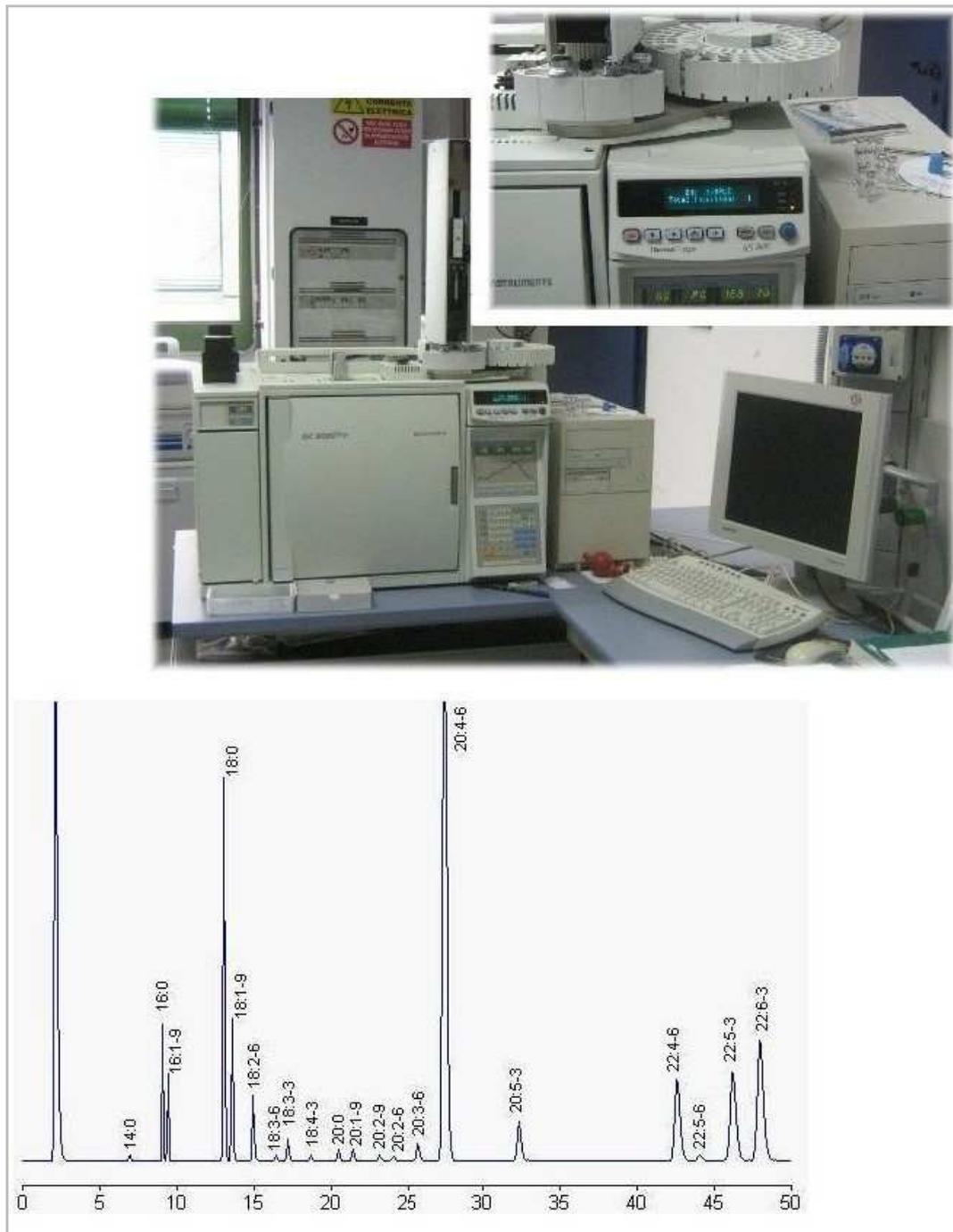


6. centrifugare (3.4.19) a 8000 giri per 10 minuti;
7. prelevare 1 ml di surnatante, utilizzando una micropipetta a pistone da 1000 μ l (3.4.32);
8. inserire nella vial (3.4.23) (*fig. 3.8*) il surnatante prelevato e sigillare con ghiera munita di setto (3.4.24) utilizzando l'apposita pinza (3.4.25).

3.8- Determinazione gascromatografica (GC)

1. impostare i parametri di lavoro come indicato in (3.4.22);
2. inserire le vials nel campionatore automatico del gascromatografo;
3. dare il via al sistema dopo aver accertato che sia nella condizione di pronto.

Figura 3.9: gascromatografo e picchi cromatografici dei diversi acidi



3.9- Espressione dei risultati

L'analisi quantitativa viene eseguita con il metodo dello standard interno per confronto con la curva di calibrazione precedentemente costruita utilizzando il software specifico (3.4.27). La concentrazione di ogni singolo acido grasso sul campione viene così espressa:

$$[C] = \frac{Q_{RC}}{P_C} \cdot FAi \cdot 100$$

Dove:

[C] : concentrazione di acido grasso nel campione in mg/100gr.

Q_{RC} : quantità di estere metilico di acido grasso da curva di calibrazione in mg.

P_C : peso del campione in g.

FAi : fattore di conversione da estere metilico a corrispondente acido grasso.

Fattore di conversione da estere metilico					
Acido grasso		Fai	Acido grasso		Fai
1	butyric acid	0,8627	20	linolelaidic acid	0,9524
2	caproic acid	0,8923	21	linolenic acid	0,9520
3	caprylic acid	0,9114	22	gamma-linolenic acid	0,9520
4	capric acid	0,9247	23	arachidic acid	0,9570
5	undecanoic acid	0,9300	24	cis-11-eicosenoic acid	0,9568
6	lauric acid	0,9346	25	cis-11,14-eicosadienoic acid	0,9566
7	tridecanoic acid	0,9386	26	cis-11,14,17-eicosatrienoic acid	0,9563
8	myristic acid	0,9421	27	cis-8,11,14-eicosatrienoic acid	0,9563
9	myristoleic acid	0,9417	28	arachidonic acid	0,9560
10	pentadecanoic acid	0,9453	29	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	0,9557
11	cis-10-pentadecenoic acid	0,9449	30	heneicosanoic acid	0,9589
12	palmitic acid	0,9481	31	behenic acid	0,9605
13	palmitoleic acid	0,9477	32	erucic acid	0,9603
14	heptadecanoic acid	0,9507	33	cis-13,16-docosadienoic acid	0,9601
15	cis-10-heptadecenoic acid	0,9503	34	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	0,9590
18	stearic acid	0,9530	35	tricosanoic acid	0,9620
17	oleic acid	0,9527	36	lignoceric acid	0,9963
18	elaidic acid	0,9527	37	nervonic acid	0,9630
19	linoleic acid	0,9524			

3.10- Controlli

- A. Controllo buon funzionamento GC:** prima di ogni serie di campioni viene iniettata una miscela di standard (3.4.16) allo scopo di verificare il buon funzionamento del GC controllando il rispetto dei tempi di eluizione dei vari esteri metilici che compongono lo standard.
- B. Controllo bianco GC:** all'inizio di ogni serie di campioni o della costruzione della curva di taratura, viene iniettato un bianco costituito da esano, per accertarsi di eventuali malfunzionamenti o della presenza di interferenti nel sistema.
- C. Controllo standard GC:** prima di ogni nuova serie di campioni vengono iniettati gli standard, preparati come al punto (3.4.16).

3.11- Validazione

Per verificare la ripetibilità delle misure per i diversi acidi grassi e quindi per validare la metodica si è proceduto nella seguente maniera:

In un turno di analisi si sono preparate 10 soluzioni standard a diverso grado di diluizione e si è proceduto all'analisi. I dati analitici ottenuti per ciascun acido grasso sono stati utilizzati per calcolare il valore medio, la deviazione standard e il coefficiente di variabilità (CV%).

3.12- Applicazione della metodica per l'analisi del profilo acidico di latte raccolto da bovine in prova riceventi diversi livelli di CLA con un additivo rumino-protetto

La metodica di analisi è stata applicata per analizzare campioni di latte provenienti da una sperimentazione in corso presso l'azienda sperimentale "Lucio Toniolo" dell'Università di Padova, situata in Legnaro (PD). La prova, della durata complessiva di 73 giorni, è stata suddivisa in due fasi: una fase preliminare (per definire la procedura ottimale di somministrazione di un integratore contenente olio idrogenato di soia) ed una fase sperimentale (con somministrazione di un integratore rumino-protetto

contenente isomeri CLA, in seguito descritto). Sono state utilizzate 15 bovine di razza frisona suddivise in tre gruppi omogenei per produzione, giorni di lattazione, body condition score e ordine di parto. I tre gruppi sperimentali sono indicati con le sigle HCLA (high conjugated linoleic acid), LCLA (low conjugated linoleic acid) e CTR (controllo). Terminata la fase di adattamento (AD - prima settimana), è cominciata la fase di sperimentazione vera e propria. Questa era costituita da tre periodi di 14 giorni, di somministrazione dei CLA (o di placebo), intervallati da 7 giorni di sospensione (*tab 3.1*). La dieta somministrata è in linea con le esigenze nutritive di vacche da latte con una produzione media giornaliera di latte pari a 25 litri (NRC, 2001). Durante la prova uno degli integratori lipidici usati era una miscela di acidi grassi protetta da una microcapsula lipidica e denominato “CLA-lutrell”, l’altro invece era “olio idrogenato di soia” l’involucro lipidico costituente le microcaspule. Per quanto riguarda il profilo acidico (*tab. 3.2*) l’olio idrogenato di soia è caratterizzato da alte percentuali di C16:0 e C18:0, che rappresentano quasi la totalità degli acidi grassi. Nel “CLA-Lutrell” oltre ad concentrazioni di acido palmitico (C16:0) e acido stearico (C18:0), sono presenti significative quantità di acido oleico (C18:1 trans 9) e acido linoleico (C 18:2 cis 9, trans 11 e C 18:2 trans 10, cis 12).

Tabella 3.1: articolazione dei periodi per ogni box con relativi trattamenti

PERIODI	BOX 1	BOX 2	BOX 3
	(4 Vacche)	(4 Vacche)	(4 Vacche)
ADATTAMENTO	AD	AD	AD
(7 d)			
TRATTAMENTO 1	CTRL	CLA 40	CLA 80
- Settimana 1			
- Settimana 2			
SOSPENSIONE			
- Settimana 3			
TRATTAMENTO 2	CLA 40	CLA 80	CTRL
- Settimana 1			
- Settimana 2			
SOSPENSIONE			
- Settimana 3			
TRATTAMENTO 3	CLA 80	CTRL	CLA 40
- Settimana 1			
- Settimana 2			
SOSPENSIONE			
- Settimana 3			

Tabella 3.2: composizione acidica dei supplementi lipidici utilizzati

Acidi grassi, g/100 g di grasso	Olio idrogenato di soia	CLA-Lutrell
- C16:0	10,3	8,5
- C18:0	77,2	48,5
- C18:1	<0,1	0,0
- C18:1 trans 9	0,1	8,5
- C 18:1 trans 11	0,0	0,2
- C 18:2	0,1	0,8
- C 18:2 cis 9, trans 11	0,0	9,9
- C 18:2 trans 10, cis 12	0,0	9,6
- C20:0	0,0	0,4
- Altri acidi grassi	1,0	1,47
- Totale acidi grassi	88,7	87,9
Altre sostanze	11,3	12,1

Una volta catturate le bovine (tramite le rastrelliere autocatturanti) veniva loro miscelato circa un chilo di unifeed con la dose giornaliera di integratore (fig 3.10).

Figura 3.10: somministrazione integratore



Un volta terminato l'integratore veniva messo a disposizione l'unifeed come di consueto. La quantità di latte prodotta da ogni singola vacca è stata registrata dal computer collegato al sistema di mungitura ogni giorno della prova. Nei giorni previsti è stato prelevato un campione di latte per ogni vacca sia nella mungitura della mattina che in quella della sera.

Il campione di latte veniva versato in tre provette (fig10):

- ❖ 1 provetta da 50 ml per analisi quantitativa e qualitativa degli acidi grassi (i campioni da me analizzati nei laboratori del Dipartimento di Scienze Animali) (fig. 3.11);

Figura 3.11: provetta da 50 ml per analisi quantitativa



- ❖ 1 provetta da 50 ml addizionata di conservante (Bronopol tecnico – 2 bromo, 2 nitro, 1-3 propandiole in quantità pari a 0,02 g/100 ml latte) per l'analisi qualità presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Animali (fig. 3.12);

Figura 3.12: provetta da 50 ml addizionata di conservante



- ❖ 1 provetta da 100 ml per analisi attitudine casearia del latte effettuata presso il Laboratorio Latte dell'Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari di Veneto Agricoltura situato a Tione in provincia di Vicenza (fig. 3.13).

Figura 3.13: provetta da 100 ml per analisi attitudine casearia



Queste provette il mattino erano riempite per metà. L'altra metà veniva aggiunta nella mungitura della sera. Durante il prelievo, il latte è stato agitato affinché la quantità di grasso non si concentrasse sulla superficie. Questo è stato un procedimento fondamentale per garantire l'attendibilità dei dati, riguardanti la quantità di grasso. Dopo la mungitura serale tutti i campioni in sacchetti numerati e datati, venivano conservati in congelatore a -18 C°.

3.13 - Analisi statistica per i quadrati latini

Tutti i dati raccolti relativi all'ingestione di sostanza secca e della composizione del latte, prima di effettuare l'elaborazione statistica, sono stati ridotti a medie settimanali. I dati relativi alla produzione giornaliera dei singoli acidi grassi, si sono ottenuti mediante la moltiplicazione dei valori medi di produzione di latte per il contenuto di grasso nel latte per il contenuto dei singoli acidi grassi. I dati analitici sono stati sottoposti ad analisi statistica della varianza utilizzando il pacchetto statistico SAS/STAT (2000).

3.13.1 - modello standard

$$y = \mu + \text{Periodo} + \text{Box} + \text{Trattamento} + e$$

3.13.2 - Modello testato

Main Plot



$$y = \mu + \text{Periodo} + \text{Box} + \text{Trattamento} + \text{Animale} + (\text{Animale} * \text{Periodo}) + (\text{Animale} * \text{Box}) + (\text{Animale} * \text{Trattamento}) + \text{errore}$$

Periodo	è rappresentato dalla 2° settimana delle 3, in cui ad ogni singolo box veniva somministrato l'integratore con il seguente periodo di sospensione.
Box	è rappresentato dai tre box composti rispettivamente da 4 vacche.
Trattamento	è rappresentato dai tre livelli di integrazione: 0, 40 e 80 g/d di CLA lutrell.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 - retta di taratura

La retta di taratura è preparata su standards di **F.A.M.E** (Fatty acid methyl ester) a quantità nota (come precedentemente riportato). Nella retta del singolo estere metilico si nota un **Kb** che rappresenta il coefficiente angolare della regressione di y verso x (concentrazione) nelle analisi di regressione del componente (n) ed un **Kc** che è l'intercetta dell'asse Y nell'analisi di regressione. Il parametro che indica l'esattezza della curva di calibrazione è il **fattore di calcolo** o **CF**: l'alto valore indica che ad ogni livello di concentrazione la risposta è molto accurata. Il **CF** viene così calcolato:

c	Concentrazioni	$r2a = (N * Se - Sa * Sc) ^ 2$ $r2b = (N * Sb - Sa ^ 2) * (N * Sh - Sc ^ 2)$ $CF = r2a / r2b$
Y	Area	
Sa	Sum of c	
Sb	Sum of c ^ 2 * w	
Sc	Sum of Y	
Sd	Sum of c ^ 3	
Se	Sum of c * Y	
Sf	Sum of c ^ 4	
Sg	Sum of c ^ 2 * Y	
Sh	Sum of Y ^ 2	
N	Number of Standards	

Dall'analisi dei parametri delle rette di calibrazione (*grafico 4.1a,b e tabella 4.1*) si può notare che, nel caso dei due isomeri oggetto di studio, i valori del fattore di calcolo siano elevati. Più le curve di calibrazione sono accurate e più avremo dei valori di concentrazione precisi dei vari analiti. Analizzando la curva di calibrazione del CLA C18:1 *cis-9, trans-11* (*grafico 4.1a*) vediamo che il valore di correlazione è pari a 0,9998, stessa cosa per il CLA C18:1 C18:2 *trans10,cis12* con valore di 0,9994 (*grafico 4.1b*). Anche per i restanti acidi grassi sono state eseguite delle rette di calibrazione, questa procedura ha permesso di ottenere un cromatogramma preciso, completo e leggibile.

Grafico 4.1: retta di taratura dei CLA: 9-cis, 11-trans e 10-trans, 12-cis

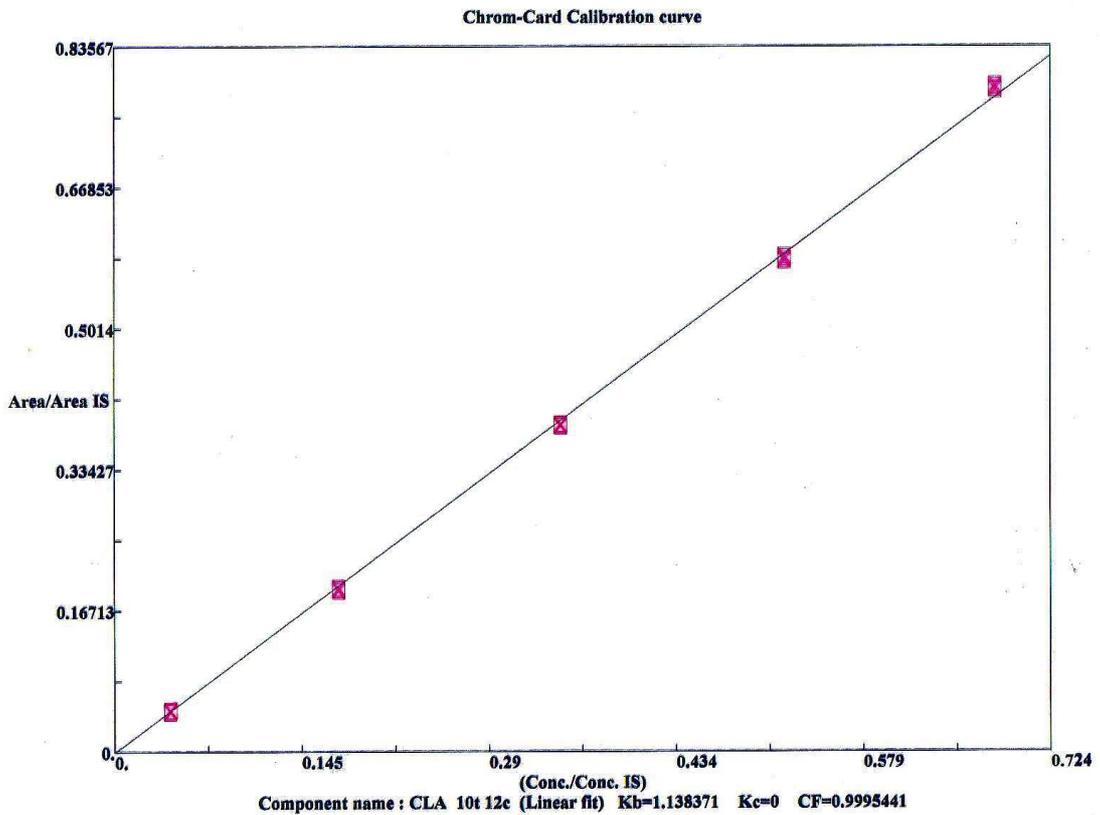
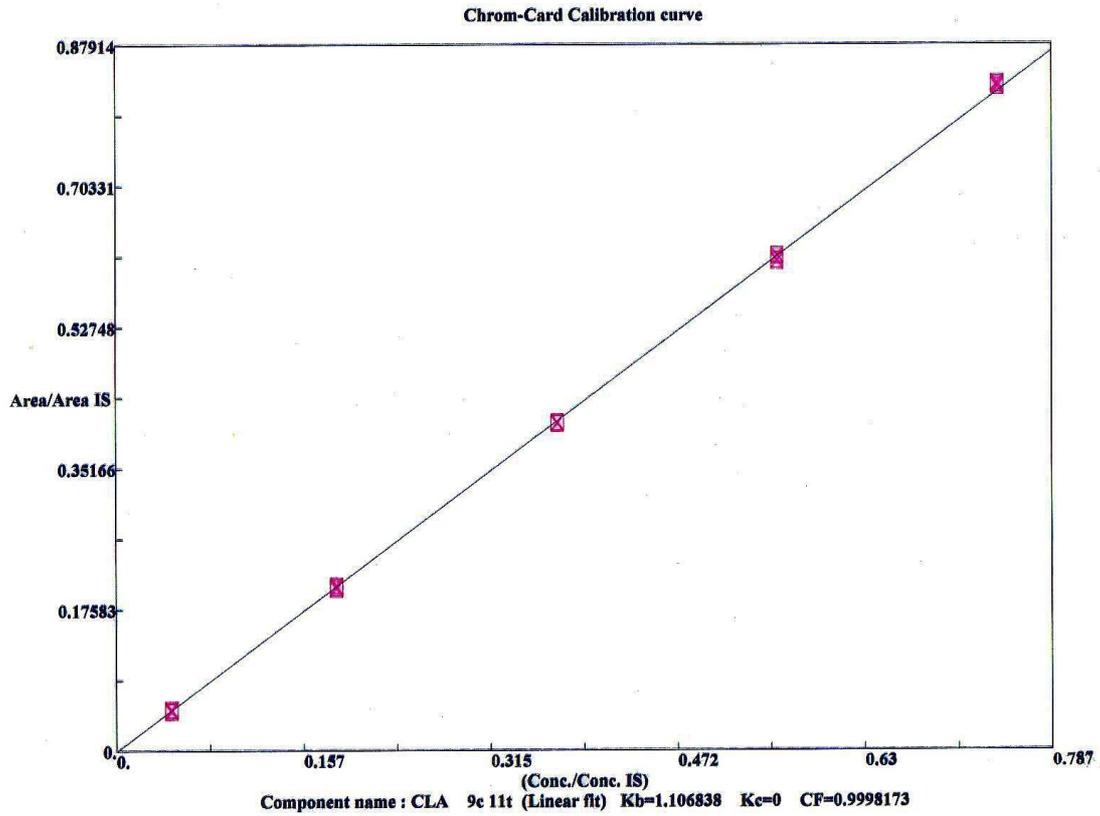


Tabella 4.1: Fattori di calibrazione degli altri acidi grassi esterificati considerati

Fattori di calibrazione 08-01-2008								
F.A.M.E.			KB			CF		
F.A.M.E.	KB	CF	F.A.M.E.	KB	CF	F.A.M.E.	KB	CF
1	C4:0	0,9342890	0,9809412	19	C18:2n6t	0,9750847	0,9997732	
2	C6:0	1,1846610	0,9802431	20	C18:2n6c	0,9734679	0,9997941	
3	C8:0	1,2768720	0,9811822	21	C18:3n6	0,9073661	0,9996739	
4	C10:0	1,2404990	0,9866695	22	C18:3n3	0,9721027	0,9997224	
5	C11:0	1,1704910	0,9909611	23	C20:1n9	0,9737270	0,9997833	
6	C12:0	1,1369560	0,9950190	24	C21:0	0,9992889	0,9994490	
7	C13:0	1,0929260	0,9974595	25	C20:2n6	0,9366587	0,9998353	
8	C14:0	1,0726050	0,9985459	26	C20:3n6c	0,8857140	0,9996707	
9	C14:1	1,0631000	0,9985425	27	C22:0	0,9573187	0,9991132	
10	C15:0	1,0485530	0,9992814	28	C20:4n6	0,8081464	0,9914823	
11	C15:1	1,0587000	0,9992021	29	C20:3n3c	1,0062810	0,9961120	
12	C16:0	1,0466050	0,9995850	30	C22:1n9c13	0,9455464	0,9998586	
13	C16:1	1,0242340	0,9995242	31	C20:5n3c	0,7761223	0,9916235	
14	C17:0	0,9137313	0,9996663	32	C23:0	1,3464710	0,9371406	
15	C17:1	1,0152570	0,9997349	33	C22:2n6	0,8830949	0,9996825	
16	C18:0	1,0023670	0,9997169	34	C24:0	0,9941068	0,9996322	
17	C18:1n9t	1,0005840	0,9997770	35	C24:1	0,9941068	0,9996322	
18	C18:1n9c	1,0202890	0,9997147	36	C22:6n3 DHA	0,7455982	0,9993265	

4.2 – Valutazione della ripetibilità delle misure

Per verificare la ripetibilità della misura al solo GC sono state effettuate 10 misure ripetute della stessa soluzione. Nella tabella che segue (*tab. 4.2*) sono riportati i valori letti nelle diverse ripetizioni eseguite e le valutazioni statistiche effettuate, ovvero la media dei valori, la deviazione standard, il valore massimo ed il valore minimo trovato ed infine il coefficiente di variabilità (CV%). Da un'analisi di questi dati possiamo mettere in evidenza che generalmente le misure diventano più accurate all'aumentare degli atomi di carbonio. In generale si nota che mediamente la deviazione standard trovata nelle ripetizioni effettuate è pari a 1,63% con valore minimo di 0,35% nel caso dell'acido oleico (C18:1 *cis n-9*) ed un valore massimo di 7,58% per l'acido cervonico (C22:6 *n3*). I valori più accurati li possiamo comunque trovare nelle misure relative agli acidi grassi compresi tra i 14 ed i 18 atomi di carbonio con valori di deviazione standard mediamente pari a 0,85% variando da un minimo di 0,484% nel caso dell'acido stearico (C18:0), fino ad un massimo di 1,345% per il C17:1 *n7*. I restanti acidi grassi

mediamente hanno una deviazione standard pari a 1,98%, valore doppio rispetto agli acidi grassi compresi tra il C14:0 ed il C18:1.

Tabella 4.2: valori ripetizioni e valutazioni statistiche effettuate

Nome campione	C4:0	Caproico C6:0	Caprylico C8:0	Caprico C10:0	Undecanoico C11:0	Laurico C12:0	Tridecanoico C13:0	Myristico C14:0	C14:1
1ª ripetizione	2,43	4,09	4,72	5,04	2,50	5,03	2,42	4,83	2,34
2ª ripetizione	2,46	4,12	4,75	5,04	2,52	5,05	2,41	4,77	2,30
3ª ripetizione	2,61	4,25	4,86	5,12	2,54	5,11	2,40	4,79	2,33
4ª ripetizione	2,62	4,33	4,92	5,20	2,55	5,10	2,42	4,81	2,32
5ª ripetizione	2,60	4,31	4,94	5,22	2,57	5,19	2,46	4,87	2,33
6ª ripetizione	2,56	4,25	4,87	5,18	2,56	5,16	2,47	4,92	2,35
7ª ripetizione	2,61	4,29	4,98	5,28	2,57	5,11	2,42	4,81	2,33
8ª ripetizione	2,63	4,31	4,99	5,25	2,59	5,19	2,47	4,87	2,36
9ª ripetizione	2,57	4,24	4,91	5,22	2,59	5,22	2,48	4,94	2,34
10ª ripetizione	2,56	4,24	4,88	5,19	2,58	5,14	2,45	4,81	2,34
media	2,56	4,24	4,88	5,17	2,56	5,13	2,44	4,84	2,33
dev.st	0,069	0,079	0,088	0,084	0,031	0,062	0,029	0,055	0,017
max	2,63	4,33	4,99	5,28	2,59	5,22	2,48	4,94	2,36
min	2,43	4,09	4,72	5,04	2,50	5,03	2,40	4,77	2,30
% max su media	102,52	101,96	102,16	102,08	101,39	101,69	101,78	101,96	100,98
% min su media	94,74	96,40	96,69	97,32	97,68	98,12	98,40	98,56	98,49
% dev.st su media	2,704	1,860	1,812	1,624	1,208	1,206	1,177	1,133	0,722

Nome campione	C15:0	C15:1 cis-10	C16:0	C16:1 n7	C17:0	C17:1 n7	C18:0	C18:1 n9trans	C18:1 cis-n9	C18:2 n6trans
1ª ripetizione	2,32	2,04	6,85	2,13	2,09	2,08	4,21	2,07	4,30	2,25
2ª ripetizione	2,31	2,02	6,80	2,11	2,07	2,00	4,24	2,09	4,32	2,25
3ª ripetizione	2,32	2,02	6,88	2,11	2,05	2,00	4,21	2,06	4,28	2,28
4ª ripetizione	2,31	2,03	6,94	2,12	2,10	1,99	4,18	2,02	4,29	2,30
5ª ripetizione	2,33	2,05	6,95	2,13	2,07	1,98	4,20	2,03	4,33	2,33
6ª ripetizione	2,33	2,06	6,98	2,20	2,08	2,00	4,22	2,05	4,33	2,32
7ª ripetizione	2,30	2,03	6,91	2,12	2,08	1,99	4,24	2,03	4,31	2,31
8ª ripetizione	2,35	2,06	6,94	2,14	2,08	2,01	4,24	2,04	4,31	2,28
9ª ripetizione	2,33	2,06	6,97	2,14	2,07	2,01	4,22	2,04	4,30	2,30
10ª ripetizione	2,35	2,04	6,96	2,13	2,08	2,01	4,23	2,05	4,30	2,32
media	2,32	2,04	6,92	2,13	2,08	2,01	4,22	2,05	4,31	2,29
dev.st	0,018	0,017	0,059	0,026	0,013	0,027	0,020	0,020	0,015	0,027
max	2,35	2,06	6,98	2,20	2,10	2,08	4,24	2,09	4,33	2,33
min	2,30	2,02	6,80	2,11	2,05	1,98	4,18	2,02	4,28	2,25
% max su media	101,21	101,00	100,84	103,17	101,00	103,64	100,49	102,02	100,48	101,45
% min su media	99,03	98,83	98,29	98,73	98,80	98,86	98,98	98,82	99,47	98,26
% dev.st su media	0,755	0,832	0,848	1,237	0,649	1,345	0,484	0,971	0,350	1,181

Nome campione	C18:2 cis-n6	C20:0	C18:3 -n6	C20:1 -n9	C18:3 -n3	C21:0	C20:2 -n6	C22:0	C20:3 n6cis
1° ripetizione	1,96	3,92	1,68	1,89	1,68	2,01	1,68	3,82	1,48
2° ripetizione	1,97	3,95	1,67	1,88	1,67	2,00	1,67	3,88	1,49
3° ripetizione	1,95	3,94	1,64	1,85	1,65	1,99	1,65	3,79	1,47
4° ripetizione	1,98	3,94	1,64	1,83	1,63	1,96	1,65	3,78	1,43
5° ripetizione	1,96	3,94	1,65	1,82	1,62	1,91	1,61	3,77	1,40
6° ripetizione	1,94	3,94	1,65	1,83	1,65	1,98	1,63	3,75	1,40
7° ripetizione	1,95	3,98	1,58	1,83	1,63	1,98	1,60	3,81	1,39
8° ripetizione	1,94	3,89	1,66	1,83	1,64	1,93	1,60	3,77	1,41
9° ripetizione	1,94	3,91	1,64	1,84	1,65	1,94	1,58	3,75	1,44
10° ripetizione	1,94	3,92	1,64	1,83	1,64	1,98	1,61	3,80	1,42
media	1,95	3,93	1,64	1,84	1,64	1,97	1,63	3,79	1,43
dev.st	0,015	0,025	0,026	0,023	0,018	0,032	0,035	0,040	0,035
max	1,98	3,98	1,68	1,89	1,68	2,01	1,68	3,88	1,49
min	1,94	3,89	1,58	1,82	1,62	1,91	1,58	3,75	1,39
% max su media	101,46	101,17	102,07	102,42	102,29	102,20	103,18	102,43	103,88
% min su media	99,15	98,90	96,32	98,73	98,63	97,03	97,11	98,85	97,15
% dev.st su media	0,769	0,631	1,578	1,259	1,115	1,629	2,147	1,050	2,406

Nome campione	C22:1 cis13n9	C20:3 n3cis	C20:4 n6	C22:2 -n6	C24:0	C20:5 n3cis	C24:1 cis15n9	C22:6 n3	aree totali
1° ripetizione	1,77	1,64	3,48	1,71	3,67	1,29	1,69	0,89	100
2° ripetizione	1,79	1,65	3,48	1,72	3,67	1,32	1,68	0,90	100
3° ripetizione	1,76	1,63	3,44	1,66	3,62	1,27	1,62	0,83	100
4° ripetizione	1,72	1,58	3,44	1,61	3,62	1,21	1,66	0,78	100
5° ripetizione	1,78	1,59	3,37	1,60	3,54	1,22	1,57	0,77	100
6° ripetizione	1,68	1,57	3,39	1,65	3,50	1,19	1,60	0,78	100
7° ripetizione	1,70	1,57	3,37	1,63	3,65	1,24	1,61	0,75	100
8° ripetizione	1,68	1,58	3,35	1,58	3,50	1,22	1,56	0,74	100
9° ripetizione	1,71	1,57	3,34	1,59	3,57	1,21	1,63	0,74	100
10° ripetizione	1,73	1,59	3,46	1,62	3,59	1,24	1,59	0,75	100
media	1,73	1,60	3,41	1,64	3,59	1,24	1,62	0,79	
dev.st	0,041	0,030	0,053	0,048	0,064	0,040	0,045	0,060	
max	1,79	1,65	3,48	1,72	3,67	1,32	1,69	0,90	
min	1,68	1,57	3,34	1,58	3,50	1,19	1,56	0,74	
% max su media	103,26	103,02	102,12	105,33	102,18	106,21	104,40	113,26	
% min su media	96,86	98,22	98,02	96,59	97,37	96,21	96,34	92,91	
% dev.st su media	2,340	1,895	1,558	2,926	1,783	3,238	2,751	7,584	

4.3 - Composizione acidica del latte

Secondo le analisi effettuate nei laboratori del Dipartimento di Scienze Animali con la somministrazione di CLA è stata osservata una diminuzione generalizzata degli acidi grassi tra cui spicca un forte abbassamento dei C16 e C16:1.

Tabella 4.3: Composizione del grasso del latte di vacche trattate con 0, 40 e 80 g/d di integratore CLA.

Variabile	Treatment				Significatività degli effetti		
	Controllo	CLA40	CLA80	SEM	Trattamento	Lineare	Quadratica
Acidi grassi, g/100g grasso							
4:0	4,09	4,29	4,20	0,05	0,23		
6:0	2,15 ^A	2,13 ^A	2,04 ^B	<0,01	0,008	0,005	0,03
8:0	1,16	1,15	1,11	<0,02	0,23		
10:0	2,37	2,38	2,31	0,05	0,60		
12:0	2,70	2,71	2,63	0,07	0,78		
14:0	9,55	9,66	9,61	0,11	0,82		
14:1	0,74	0,74	0,72	0,01	0,64		
15:0	1,52	1,58	1,54	0,05	0,70		
16:0	30,81	28,96	27,9	0,61	0,15	0,08	0,65
16:1	1,59	1,56	1,50	0,03	0,32		
17:0	0,94	1,02	1,02	0,01	0,24		
18:0	9,91	10,22	10,52	0,49	0,73		
18:1 <i>trans</i> 11	0,70	0,71	0,79	0,03	0,26		
18:1 <i>cis</i> -9	17,30	18,69	18,92	0,53	0,28		
18:1 <i>cis</i> 11	0,64 ^a	0,69 ^b	0,69 ^b	<0,01	0,01	0,01	0,03
18:1 (altri)	1,07	1,23	1,25	0,05	0,23	0,08	0,18
18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	2,50	2,54	2,66	0,03	0,14	0,08	0,41
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,43^a	0,48^b	0,51^b	0,007	0,02	0,01	0,27
18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0,004^a	0,021^{ab}	0,039^b	0,003	0,05	0,03	0,90
18:2 (altri)	0,27	0,26	0,29	<0,01	0,09	0,14	0,07
18:3	0,43	0,43	0,46	0,005	0,14	0,08	0,32
20:0	0,13	0,14	0,14	0,005	0,96		
Altri	1,90	1,99	1,94	0,04	0,43		

^{a,b,c} valori di significatività P<0,05

^{A,B,C} valori di significatività P<0,01

Prima di iniziare la sperimentazione è stata analizzata la qualità del latte di ogni singola bovina. L'analisi ha evidenziato che il latte aveva un contenuto elevato di C 14:0 (circa il 10%), C 16:0 (circa il 30%) e C 18:1 *cis*-9 (circa il 20 %).

Il latte conteneva, inoltre, quantitativi molto bassi di C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e valori pressoché nulli di C18:2 *trans*10,*cis*12, gli isomeri CLA oggetto della sperimentazione. Nella tabella sopra riportata (*tab. 4.3*) possiamo osservare i risultati delle analisi effettuate durante la prova sperimentale.

Durante la sperimentazione i valori di composizione di latte sono rimasti in linea con quelli ante-prova per quanto riguarda le bovine sottoposte ad integrazione mentre, per gli animali che hanno ricevuto dosi crescenti di integratore (pari a 40 e 80 g/d), si è notata una riduzione significativa degli acidi grassi a media e corta catena (C6:0 e C16:0).

All'aumentare della quantità di integratore fornito agli animali, si è notato un aumento significativo degli acidi grassi mono e poli insaturi con 18 atomi di carbonio ovvero gli acidi grassi oleico, linoleico e linolenico. Gli acidi grassi che hanno subito un trasferimento nel latte significativamente più marcato sono l'acido vaccenico (C18:1 *cis*-11) e i due isomeri CLA oggetto di sperimentazione (CLA C18:2 *cis*9, *trans*11 e CLA C18:2 *trans*10,*cis*12).

Va osservato che la presenza nel latte del CLA C18:2 *trans*10,*cis*12, è aumentata in modo lineare all'aumentare delle dosi di integratore, infatti, nella tesi di controllo era di 0,004% aumentando a 0,021% fino a 0,039% rispettivamente per le tesi a basso e ad alto dosaggio (pari a 40 e 80 g/d). Anche per il CLA C18:2 *cis*9, *trans*11 si è notato un aumento lineare partendo da un valore di 0,43% per la tesi di controllo fino ad aumentare a 0,48 e 0,51% rispettivamente per integrazioni pari a 40 e 80 g/d.

Come nelle sperimentazioni di Perfield et Al. (*Tabella 4.4*), abbiamo riscontrato che la diminuzione degli acidi grassi interessa soprattutto quelli a corta e media catena. Questi dati sono in linea con i dati da noi ottenuti nel corso della prova sperimentale (*tab. 4.3*).

I risultati, ottenuti dalla sperimentazione di Perfield, possono essere confrontati con quelli ottenuti dalla sperimentazione presente, in quanto la dose di CLA somministrata è stata paragonabile e l'integratore fornito era nella stessa forma fisica e prodotto con lo stesso metodo di protezione.

Tabella 4.4: dati di produzione di acidi grassi nel latte bovino (Perfield et al, 2002)

Fatty acid, %	Treatment			SEM	ps
	Control	AP-CLA	LE-CLA		
4.00	4.24 ^a	3.96 ^b	3.96 ^b	0.13	<0.001
6.00	2.15 ^a	1.65 ^b	1.56 ^b	0.08	<0.001
8.00	1.13 ^a	0.83 ^b	0.72 ^c	0.05	<0.001
10.00	2.30 ^a	1.66 ^b	1.45 ^c	0.11	<0.001
12.00	2.44 ^a	1.94 ^b	1.75 ^c	0.09	<0.001
14.00	9.38 ^a	7.99 ^b	7.19 ^c	0.30	<0.001
14.01	0.70 ^a	0.59 ^b	0.58 ^b	0.09	0.01
15.00	0.75	0.76	0.73	0.02	0.30
16.00	25.32 ^a	22.83 ^b	22.77 ^b	1.74	<0.001
16.01	1.09	0.96	1.03	0.14	1.11
17.00	0.47 ^c	0.51 ^b	0.54 ^a	0.01	<0.001
18.00	14.19 ^b	15.68 ^a	15.86 ^a	0.69	<0.01
18:1 trans-4	0.012 ^b	0.031 ^a	0.026 ^a	0.004	<0.01
18:1 trans-5	0.009 ^b	0.022 ^a	0.018 ^{ab}	0.003	0.03
18:1 trans-6-8	0.35 ^c	0.48 ^a	0.45 ^b	0.01	<0.001
18:1 trans-9	0.33 ^c	0.42 ^a	0.40 ^b	0.01	<0.001
18:1 trans-10	0.49 ^b	0.59 ^a	0.61 ^a	0.001	0.001
18:1 trans-11	1.75 ^b	2.06 ^a	2.12 ^a	0.08	<0.001
18:1 trans-12	0.62 ^c	0.77 ^a	0.73 ^b	0.01	<0.001
18:1 cis-9	25.03 ^b	28.31 ^a	28.95 ^a	1.28	<0.001
18:2 cis-9, cis-12	3.61 ^c	3.93 ^b	4.41 ^a	0.19	<0.001
18:2 cis-9, trans-11	0.57 ^b	0.83 ^a	0.80 ^a	0.05	<0.001
18:2 trans-10, cis-12	<0.01 ^b	0.08 ^a	0.09 ^a	0.01	<0.001
18.03	0.50 ^b	0.53 ^a	0.56 ^a	0.03	<0.01
20.00	0.107 ^b	0.114 ^a	0.115 ^a	0.003	0.05
Other	2.46 ^b	2.50 ^{ab}	2.61 ^a	0.05	0.03
Summation					
<C16	23.10 ^a	19.37 ^b	17.94 ^c	0.28	<0.001
C16 and C16:1	26.41 ^a	23.79 ^b	23.80 ^b	1.88	<0.001
>C16	50.50 ^c	56.85 ^b	58.26 ^a	1.94	<0.001
Desturase index					
14:1/(14:0+14:1)	0.070	0.069	0.072	0.008	0.78
16:1/(16:0+16:1)	0.040	0.040	0.043	0.003	0.30
18:1/(18:0+18:1)	0.639	0.644	0.645	0.009	0.87
c9≠11 CLA/(18:1≠11+c9,≠11 CLA)	0.248 ^b	0.288 ^a	0.273 ^a	0.008	<0.001

^{a,b,c} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0,05$).

¹ Supplements were amide-protected CLA (AP-CLA) and lipid-encapsulated CLA (LE-CLA).

² Values represent and average of d 6 and 7 of supplementation.

³ Statistical probability of treatment effects.

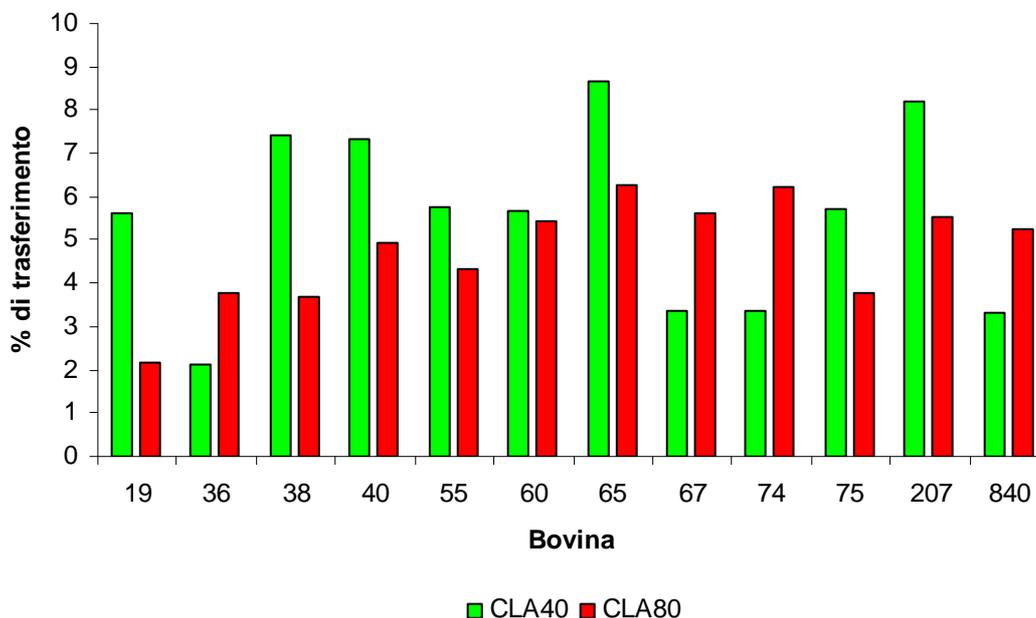
4.4 - Valutazione della variabilità individuale dei profili acidi del latte

Le quantità dell'isomero CLA C18:2 *trans10,cis12* apportate quotidianamente attraverso l'integrazione nella razione sono risultate pari a 3,072 g/d e 6,144 g/d rispettivamente per i livelli di integrazione pari a 40 e 80 g/d. Le percentuali di trasferimento nel latte dell'isomero CLA C18:2 *trans10,cis12* sono risultate pari a 6,51% per CLA 40 e 5,55% per CLA80. Le percentuali sono state calcolate mediante le seguenti formule:

- **CLA40:** $0,20 / (40 * 0,80 * 0,096) * 100$;
- **CLA80:** $0,34 / (40 * 0,80 * 0,096) * 100$;

dove 0,20 e 0,34 g/d sono le quantità di isomero prodotto con il latte nelle bovine alimentate con livelli di 40 e 80 g/d di CLA rispettivamente, mentre 80% e 9,6% sono i contenuti di grasso e di C18:2 *trans10,cis12* nell'integratore.

Grafico 4.2: percentuali di trasferimento dell'isomero CLA *trans10 cis 12* nelle singole bovine



Nel grafico 4.2 si può notare come la percentuale di trasferimento dell'isomero CLA *trans10,cis12* nel latte sia molto variabile a livello individuale. I livelli di trasferimento del CLA *trans10,cis12* si attestano su livelli medi del $5,54 \pm 2,13\%$ variando da un

minimo di 2,1% ad un massimo di 8,7% per le bovine che ricevevano l'integrazione con bassi livelli di CLA (40 g/d). Per gli animali che hanno ricevuto l'integrazione ad alto dosaggio di CLA la percentuale di trasferimento è stata inferiore rispetto al basso dosaggio attestandosi ad un livello medio di $4,7 \pm 1,2\%$ variando da un minimo di 2,2% fino ad arrivare ad un valore massimo di 6,3%.

5. CONCLUSIONI

La tesi svolta ha permesso di arrivare alla stesura di una metodica di valutazione quantitativa degli acidi grassi più avanzata della metodica attualmente operativa presso il Dipartimento di Scienze Animali. Le modifiche apportate hanno riguardato la scelta della colonna di separazione, una colonna capillare lunga 100m che ha permesso di separare una miscela di standard contenente 37 acidi grassi. Essendo nuovo lo standard e nuova la colonna si è reso necessario ricostruire le rette di taratura. Con la nuova metodica, utilizzata per migliorare l'individuazione del profilo acidico dei grassi, si è definito, diversamente dalla metodica precedentemente utilizzata, il contenuto dei singoli coniugati dell'acido linoleico. Sulla base della letteratura pregressa, i risultati ottenuti dall'analisi del profilo acidico del latte sono risultati confrontabili in particolar modo i livelli dei singoli isomeri dei CLA. Nel corso delle procedure di validazione della nuova metodica, la correlazione delle rette di taratura relative ai due isomeri CLA C18:2 *cis*9,*trans*11 e CLA *trans*10,*cis*12 sono risultate pari a 0,9998 e 0,9994 rispettivamente. La verifica della ripetibilità delle misure ha evidenziato che le misure più accurate si possono rilevare a livello degli acidi grassi compresi tra 14 e 18 atomi di carbonio con valori medi di CV pari a 0,85% variando da 0,484% nel caso dell'acido stearico (C18:0), fino ad un massimo di 1,345% per quanto riguarda il C17:1 *n*7.

In questa tesi si i risultati ottenuti dalle analisi effettuate sul latte bovino, per gli animali che hanno ricevuto dosi crescenti di CLA C18:2 *cis*9, *trans*11 e CLA *trans*10,*cis*12 pari a 40 e 80 g/d, si è notata una riduzione significativa degli acidi grassi saturi quali il caproico (C6:0) ed il palmitico (C16:0). Accanto a questi risultati si è notato un aumento anche degli acidi grassi mono e poli insaturi quali l'acido vaccenico (C18:1 *cis*-11) e i due isomeri CLA oggetto di tesi (CLA C18:2 *cis*9, *trans*11 e CLA *trans*10,*cis*12).

Se accanto a questi dati appena descritti analizziamo la risposta all'integratore vista come variabilità individuale, notiamo che le percentuali di trasferimento nel latte dell'isomero CLA C18:2 *trans*10,*cis*12 sono risultate pari a 6,51% per CLA 40 e 5,55% per CLA80. Le percentuali sono però state molto variabili a livello individuale con livelli di trasferimento, del suddetto isomero, su livelli medi del $5,54 \pm 2,13\%$.

6. BIBLIOGRAFIA:

- Antongiovanni M., Lercker G., Serchiari P. (2007). Metodi di analisi per lo studio della frazione lipidica del latte, dei prodotti di origine animale e degli alimenti zootecnici. Plus, Pisa.
- 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.
- Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari J.M. (1999). Proceedings of the American Society of Animal Science.
- Bauman DE, Lock AL, Corl BA, Ip C., Salter AM, Parodi PW. (2006). In: Ruminant physiology. Sejrsen K., Hvelplund T., Nielsen MO (ed.) Wageningen Academic Publishers. Pp. 529-551.
- Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M. (1993). Tecniche di produzione animale. Liviana Editrice.
- Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M. (1999). Fondamenti di zootecnica. Liviana Editrice.
- Buccioni A, Petacchi F, Antongiovanni M. (2002). Firenze Accademia dei Georgofili Quaderni I pp. 97-128
- Chouinard P. Yvan (1999). Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. American Society for Nutritional Sciences 1579-1584.
- Christie W.W., (1982). Lipid Analysis 2nd edition.
- Christie, W.W. (1982). A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl ester. J. Lipid Res. 23: 1072-1075.
- Chistopherson S.& Glass R.L. (1969). Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essential non-alcoholic solution. J. Dairy Sci. 52: 1289-1290
- Dawson R.M.C., Kemp P. (1970). Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. In Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Phillipson A.T., editions Oriel Press. Newcastle upon Tyne. U.K. pp. 504-518.

- Dhiman T.R., Satter L.D., Pariza M.W., Galli M.P., Albright K., Tolosa M.X. (2005) - Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in oleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science*. 83: 1016-1027.
- Baars B.G.J., Miliazza A., (1997) – Introduzione pratica alla gascromatografia. Morgan- Edizioni tecniche. 3.3: 78-93.
- Folch, J., Less, M. and Stanley, G. H. S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*,226, 497-509.
- Biblioteca Ercolani, (2008). <http://erclib.vet.unibo.it/> .
- Gurr M., (1997). Biological properties of some cows milk components. *Lipid Technol.* 9: 70-73
- Gurr M., (1998). Dietary $\omega 6/\omega 3$ polyunsaturates balance: is it important? *Lipid Technol.* 10: 14-16
- Heinemann FS., Ozols J. (2003). Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 68 pp. 123-133
- Ip C., Jiang C., Thompson H.J. and Scimeca A.J. (1997). *Carcinogenesis* 18:755-759
- Jahreis G., Fritsche J., Mockel P., Schone F., Moller U., and Steinhart H. (1999). *Nutr. Res.* 19(10):1541– 1549.
- Jiang J., Wolk A., Vessby B. (1999). *Am J. Clin. Nutr.* 70: 21.
- Kepler CR., Tucker WP, Tove SB (1966). Intermediates and products of the Biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*.*Journal of Biological Chemistry*. 241 pp. 1350-1354
- Khanal RC., Dhiman TR, (2004). *Pakistan Journal of Nutrition* 3 pp. 72-81
- Khosla P., Sundram K., (1996). Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol. *Prog. Lipid. Res.* 35: 93-132
- Kramner J.K.G., Fellner V., Dugan M.E.R., Saver F.D., Mossoba M.M., Yurawecz M. (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
- Lock AL., Garnsworthy PC. (2003) *Livestock Production Science* 769 pp.47-59

- McGuire M.A., McGuire M.K. (1999). Proc. American Soc. Anim. Sci. 118.
- N.R.C. National Research Council (1996) – Carcinogens and anticarcinogens human diet. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Ntambi JM., Miyazaki M. (2004). Progress in Lipid Research 43 pp. 91-104
- Nutritionvalley, (2008). I Lipidi o Grassi. <http://www.nutritionvalley.it/>
- Pariza M.W., Park Y., Cook M.E. (2001). Prog. Lipid Res. 40: 283.
- Parodi P.W., (1994) Conjugated linoleic acid: An anticarcinogenic fatty acids present in milk fat. Australian J. Dairy Tech. 49: 93-97
- Parodi P.W. (2003). In Sébédio L., Christie W.W., Adlof R.O. ed. Vol II, pp. 101-122, AOCS press, Chainpaign, IL.
- Secchiari P., Serra A., Mele M. (2005). Il latte in Alimenti e Salute. A cura di Cocchi M. e Mordenti A. CLUEB, Bologna 347-398.
- Sehat N., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Mossola M.M., Kramer J.K.G, Ku K. (1998). Lipids, 33, 217-221.
- Romeo G.,(2001). Cibi funzionali manna o ciarlataneria? Così carne e latte ci proteggono. Le Scienze. 399: 118-124
- SAS/STAT (2000) – User’s Guide. Statistic, Version 6 Edition. Statistical Analysis Institute, Inc., Cary, NC.
- SINU – Società Italiana Nutrizione Umana. (2002). Pubblicazioni – Lipidi. <http://www.sinu.it/>
- Williams C.M.,(2000). Dietary fatty acids and human health. Ann. Zootech. 49: 165-180.

7. ABBREVIAZIONI

LDL	lipoproteine a bassa densità (Low Density Lipoprotein)
HDL	lipoproteine ad alta densità (High Density Lipoprotein)
MUFA	Mono Unsaturated Fatty Acid (ac. grassi mono insaturi)
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid (ac. grassi poli insaturi)
ω3	omega 3
ω6	omega 6
ω9	omega 9
CLA	Conjugated linoleic acids (coniugati dell'acido linoleico)
EPA	acido eicosapentanoico
DHA	acido docoesanoico
ARA	acido arachidonico
VA	acido vaccenico
RA	acido rumenico
SCD	enzima Stearoil CoA-Desaturasi
LA	acido linoleico
AA	acido arachidonico
GC	gascromatografia
HPLC	High Pressure Liquid Cromatography (cromatografia liquida ad alta pressione)
TMSCHN₂	metilazione con trimetilsilil diazometano
TLC	argentata Thin Layer Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Ag	HPLC cromatografia a ioni argento
IEC	cromatografia a scambio ionico
PTFE	Politetrafluoroetilene
HCLA	high conjugated linoleic acid
LCLA	low conjugated linoleic acid
CTR	controllo
F.A.M.E	Fatty acid methyl ester